

UNIVERSITE LILLE 2 – DROIT ET SANTE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Hélène MOCHE

Le 3 septembre 2014

**Utilisation du carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) comme
témoin positif génotoxique nanoparticulaire
et étude de la génotoxicité de candidats nanovecteurs de
médicaments**

Jury :

Rapporteurs

Mme Armelle BAEZA-SQUIBAN, Professeur, Université Paris Diderot Paris 7

M. François SICHEL, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie

Examineurs

Mme Valérie FESSARD, Directeur de recherche, Anses

Mme Nancy CLAUDE, Docteur, Institut de Recherches Internationales Servier

M. Fabrice NESSLANY, Docteur, Institut Pasteur de Lille (co-encadrant de thèse)

M. Dany CHEVALIER, Maître de conférences, Université Lille 2 (directeur de thèse)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury ainsi que les personnes qui m'ont encadrée :

Les Professeurs Armelle Baeza-Squiban et François Sichel qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail et le Docteur Valérie Fessard de participer au jury comme examinateur.

Les membres de mon Comité de suivi de thèse, pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour mon travail, les Docteurs Jérôme Rose, Rémy Maximilien, Anne Platel, Catherine de La Moureyre-Spire et Nancy Claude et le Professeur Daniel Marzin.

Le Docteur Nancy Claude, d'avoir permis la réalisation de cette thèse Cifre au sein des Laboratoires Servier, et d'avoir veillé à son bon déroulement.

Madame Elisabeth Lorge, pour sa participation active à l'encadrement de mes travaux, en particulier lors de mes séjours à Biologie Servier.

Le Docteur Dany Chevalier, mon directeur de thèse, pour son implication, l'intérêt qu'il a porté à mon travail et ses nombreux conseils.

Je tiens finalement à remercier très chaleureusement le Docteur Fabrice Nesslany, pour son accueil au sein du Laboratoire de toxicologie génétique de l'Institut Pasteur de Lille, la qualité de son encadrement, sa disponibilité et ses conseils tout au long de cette thèse.

Je remercie par ailleurs l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, qui a financé ce travail.

Je tiens également à remercier très sincèrement l'ensemble du Laboratoire de toxicologie génétique de l'Institut Pasteur de Lille :

J'ai énormément apprécié de travailler avec vous tous, votre accueil et l'ambiance chaleureuse ont grandement participé à rendre agréables ces années de thèse.

Smaïl, merci de m'avoir formée au test des comètes, et d'avoir toujours répondu présent quand j'avais besoin d'un coup de main. Séverine, Gwen, Doris, Aurélie S, Gonzague, Céline, Eric, également un grand merci de m'avoir formée et /ou aidée si efficacement pour tous les autres tests. C'était un réel plaisir de travailler avec vous tous.

Martine et Odile, merci pour votre aide avec tous les détails et problèmes administratifs.

Merci également à Anne d'avoir partagé son expérience et ses conseils sur le déroulement de la thèse !

Fred, Alex, Sophie, Brigitte, Valérie, Emilie, Eulalie, Charles, Jeanne, merci à vous aussi, voisines de bureaux, amateurs de sushis, ou simplement compagnons de pauses café, de participer à la bonne ambiance générale !

Et enfin, un grand merci à toutes celles qui ont participé à mon intégration à Lille, à nos repas à 11h30 avec les poules et toutes les sorties en dehors du boulot, Lauren, Kelly, Julie, Séverine, Aurélie R, Alizée, Anne, Steph, merci beaucoup !

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble du centre Biologie Servier :

Je vous suis très reconnaissante pour l'accueil chaleureux avec lequel j'ai été reçue lors de chacun de mes séjours à Gidy.

Au laboratoire de Toxicologie génétique, en particulier Sandrine, Jacques, Béatrice, Pascale et Cédric pour leur aide technique très efficace.

Au laboratoire de Toxicogénomique, en particulier le Docteur Catherine de La Moureyre-Spire de m'avoir aidé pour l'analyse des microarrays et Béatrice et Marie-Pierre pour leur efficacité et leur aide très précieuse pour la partie technique.

Merci également à Odile et Sylvia pour votre efficacité pour l'organisation pratique et administrative.

Au groupe des Jeunes, merci pour les soirées et les « repas jeunes » du vendredi midi !

Et merci à tous les passagers du minibus, en particulier les conducteurs !

Je remercie toutes les personnes des laboratoires extérieurs avec lesquelles j'ai eu l'occasion de travailler :

Le Docteur Sylvie Chevillard qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, et le Docteur Vincent Paget pour son implication, son travail remarquable et ses explications sur les tests de la plate-forme.

Le Professeur Jean-Pierre Benoît qui m'a accueillie au laboratoire MINT, le Docteur Guillaume Bastiat et M. Gaël Le Roux pour l'initiation à la formulation des nanovecteurs.

Le Docteur Hervé Vezin pour ses explications et les expérimentations de RPE.

Le Docteur Nicolas Barois pour sa disponibilité pour les observations de microscopie électronique.

Pour finir, je voudrais remercier du fond du cœur ceux qui m'ont apporté un soutien sans faille tout au long de mes études :

Ma famille, mes parents, ma sœur et mon frère, d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir encouragée malgré la distance.

Vincent, merci pour ta présence, ta compréhension et de m'avoir supportée et encouragée, surtout ces derniers mois.

SOMMAIRE

Liste des collaborations	6
Liste des publications et communications scientifiques.....	7
Liste des principales abréviations	8
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux.....	12
Préambule	13
PARTIE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	15
CHAPITRE 1. NANOMATÉRIAUX ET NANOTOXICOLOGIE.....	17
1.1. Définitions.....	18
1.1.1. Définitions de l'ISO	18
1.1.2. Définitions de la Commission européenne	19
1.2. Utilisations des nanomatériaux.....	21
1.3. Nanotoxicologie	23
1.3.1. Principales voies d'exposition aux nanomatériaux	23
1.3.1.1. Voie respiratoire	23
1.3.1.2. Voie digestive.....	24
1.3.1.3. Voie cutanée	25
1.3.1.4. Autres voies.....	25
1.3.2. Translocation et distribution des nanomatériaux.....	26
1.3.3. Internalisation cellulaire des nanomatériaux.....	27
1.3.4. Particularités de la toxicité des nanomatériaux.....	29
1.3.4.1. Immunotoxicité	29
1.3.4.2. Toxicité pour la reproduction.....	31
1.3.4.3. Toxicité cardio-vasculaire	31
1.4. Caractérisation physico-chimique des nanomatériaux.....	32
1.4.1. Importance de la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux pour les essais de toxicité	32
1.4.1.1. Taille et distribution de taille	33
1.4.1.2. Etat d'agglomération ou d'agrégation.....	34
1.4.1.3. Surface spécifique	34
1.4.1.4. Forme	34
1.4.1.5. Structure cristalline.....	35
1.4.1.6. Charge de surface ou potentiel zêta.....	35
1.4.1.7. Composition chimique / revêtement de surface.....	35

1.4.1.8. Pureté.....	35
1.4.2. Exemples de méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux.....	36
1.4.2.1. Diffusion dynamique de la lumière.....	36
1.4.2.2. Microscopie électronique à transmission (MET).....	37
1.4.2.3. Mesure du potentiel zêta.....	38
CHAPITRE 2. GENOTOXICITE DES NANOMATERIAUX.....	41
2.1. Mécanismes de génotoxicité des nanomatériaux.....	42
2.1.1. Mécanismes primaires.....	42
2.1.1.1. Interactions avec l'ADN.....	42
2.1.1.2. Interactions avec d'autres constituants cellulaires.....	42
2.1.1.3. Implication d'espèces réactives de l'oxygène.....	43
2.1.2. Mécanismes secondaires.....	45
2.2. Les principaux tests de génotoxicité et leur adéquation pour l'évaluation des nanomatériaux.....	47
2.2.1. Dommages primaires à l'ADN.....	47
2.2.1.1. Test des comètes.....	47
2.2.1.2. Détection des foyers γ -H2AX.....	50
2.2.2. Mutations géniques.....	51
2.2.2.1. Essai de mutation réverse sur bactéries (Test d'Ames).....	51
2.2.2.2. Essai de mutation génique sur cellules de lymphome de souris au locus TK.....	52
2.2.2.3. Essai de mutation génique sur cellules de rongeurs transgéniques.....	53
2.2.2.4. Test de mutation génique <i>in vivo</i> Pig-a.....	54
2.2.3. Dommages chromosomiques.....	55
2.2.3.1. Essai d'aberrations chromosomiques.....	55
2.2.3.2. Test des micronoyaux.....	56
2.2.4. Tests de screening.....	59
2.2.4.1. Test GADD45a-GFP ou GreenScreen HC.....	59
2.2.5. Adéquation des tests de génotoxicité pour l'évaluation des nanomatériaux.....	60
2.3. La batterie de tests réglementaire pour l'évaluation de la génotoxicité des médicaments.....	62
2.4. Spécificités pour l'évaluation de la génotoxicité des médicaments sous forme nanoparticulaire.....	63
2.5. Intérêt d'un témoin positif sous forme nanoparticulaire pour les essais de génotoxicité <i>in vitro</i>.....	64

CHAPITRE 3. LE CARBURE DE TUNGSTENE-COBALT (WC-Co)	67
3.1. Présentation	67
3.2. Toxicité du WC-Co	68
3.2.1. Etudes épidémiologiques	68
3.2.2. Etudes de toxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	68
3.2.2.1. <i>Génotoxicité</i>	68
3.2.2.2. <i>Toxicité du mélange WC-Co</i>	69
3.2.2.3. <i>Mécanisme oxydant</i>	70
CHAPITRE 4. LES NANOMÉDICAMENTS	71
4.1. Intérêts des nanomédicaments	72
4.2. Les nanomédicaments sur le marché	73
4.2.1. Les nano-vecteurs	75
4.2.1.1. <i>Les liposomes</i>	75
4.2.1.2. <i>Les nanoparticules polymériques</i>	75
4.2.1.3. <i>Les nanoparticules protéiques</i>	76
4.2.1.4. <i>Les nano-émulsions</i>	76
4.2.2. Les nanocristaux de principe actif	76
4.2.3. Les agents de contraste	77
4.3. Exemples de candidats nanomédicaments en développement	77
4.4. Les nanodiamants	78
4.4.1. Méthodes de production des nanodiamants	78
4.4.2. Utilisations des nanodiamants en médecine	78
4.4.2.1. <i>Vectorisation de molécules</i>	78
4.4.2.2. <i>Imagerie</i>	78
4.4.3. Toxicité des nanodiamants	79
4.5. Les nanocapsules lipidiques	80
4.5.1. Formulation des nanocapsules lipidiques	80
4.5.2. Utilisation de nanocapsules lipidiques pour la vectorisation de principes actifs	81
4.5.3. Toxicité des nanocapsules lipidiques	81

PARTIE 2. RESULTATS ET DISCUSSION 83

CHAPITRE 1. UTILISATION DU CARBURE DE TUNGSTENE-COBALT (WC-Co) COMME TEMOIN POSITIF GENOTOXIQUE NANOPARTICULAIRE ET ETUDE DES MECANISMES D’ACTION.....85

1.1. Utilisation du WC-Co comme témoin positif de référence sous forme nanoparticulaire dans les essais de géotoxicité <i>in vitro</i>	85
1.1.1. Présentation de l’article 1	85
1.1.2. Article 1.....	86
1.2. Mécanismes d’action géotoxique des WC-Co NP	112
1.2.1. Présentation de l’article 2	112
1.2.2. Article 2.....	113
1.3. La cytotoxicité et la géotoxicité des nanoparticules de WC-Co dépendent du type cellulaire : le rôle clé de la production d’ERO	135
1.3.1. Présentation de l’article 3	135
1.3.2. Article 3.....	137
1.4. Etude préliminaire de la géotoxicité <i>in vivo</i> des WC-Co NP	169
1.4.1. Matériel et méthodes.....	169
1.4.1.1. <i>Suspension des WC-Co NP</i>	169
1.4.1.2. <i>Animaux</i>	169
1.4.1.3. <i>Test Pig-a</i>	170
1.4.1.4. <i>Test des comètes in vivo</i>	170
1.4.2. Résultats	171
1.4.2.1. <i>Test de mutation génique in vivo Pig-a</i>	171
1.4.2.2. <i>Test des comètes in vivo</i>	172
1.4.3. Discussion	173

CHAPITRE 2. ETUDE DE LA GENOTOXICITE IN VITRO DE CANDIDATS NANOVECTEURS DE MEDICAMENTS175

2.1. Etude de la géotoxicité de nanoparticules de diamant	175
2.1.1. Matériel et méthodes.....	175
2.1.1.1. <i>Nanoparticules de diamant</i>	175
2.1.1.2. <i>Culture cellulaire</i>	175
2.1.1.3. <i>Traitement des cellules</i>	176
2.1.1.4. <i>Test des comètes in vitro en conditions alcalines</i>	176
2.1.1.5. <i>Test des micronoyaux in vitro sur cellules 16-HBE</i>	177
2.1.1.6. <i>Analyse statistique</i>	177
2.1.2. Résultats	178
2.1.2.1. <i>Etude des lésions primaires de l’ADN</i>	178
2.1.2.2. <i>Etude des dommages chromosomiques</i>	179
2.1.3. Discussion	181

2.2. Etude de la génotoxicité de nanocapsules lipidiques	182
2.2.1. Matériel et méthodes.....	182
2.2.1.1. <i>Nanocapsules lipidiques</i>	182
2.2.1.2. <i>Caractérisation des nanocapsules lipidiques</i>	182
2.2.1.3. <i>Culture cellulaire</i>	183
2.2.1.4. <i>Test des micronoyaux</i>	183
2.2.1.5. <i>Test des comètes</i>	183
2.2.1.6. <i>Analyse statistique</i>	184
2.2.2. Résultats	184
2.2.2.1. <i>Caractéristiques des nanocapsules lipidiques</i>	184
2.2.2.2. <i>Test des micronoyaux</i>	185
2.2.2.3. <i>Test des comètes</i>	187
2.2.3. Discussion	190

PARTIE 3. DISCUSSION GENERALE – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
 **191**

<i>DISCUSSION GENERALE</i>	193
<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	203

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 205

Liste des collaborations

Dr Sylvie Chevillard, Dr Vincent Paget
Laboratoire de Cancérologie expérimentale
CEA, Fontenay-aux-Roses

Dr Nicolas Barois
Microscopie électronique
Plate-forme BioImaging Center Lille-Nord de France (BICeL)
Institut de Biologie de Lille

Dr Hervé Vezin
Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)
Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR)
Université Lille 1

Pr Jean-Pierre Benoît, M. Gaël Le Roux
Laboratoire Micro et Nanomédecines Biomimétiques (MINT)
UMR INSERM 1066, Angers

Liste des publications et communications scientifiques

Publications :

Moche H, Chevalier D, Barois N, Lorge E, Claude N, Nesslany F. (2014). Tungsten carbide-cobalt as a nanoparticulate reference positive control in *in vitro* genotoxicity assays. *Toxicol Sci.* 137(1):125-34.

Moche H, Chevalier D, Vezin H, Claude N, Lorge E, Nesslany F. (soumis dans *Mutation Research* le 26.06.2014). Mechanisms involved in the *in vitro* genotoxicity of tungsten carbide-cobalt (WC-Co) nanoparticles.

Paget V, Moche H, Kortulewski T, Grall R, Irbah L, Nesslany F, Chevillard S. (soumis dans *Toxicological Sciences* le 16.06.2014). Human cell line-dependent WC-Co nanoparticle cytotoxicity and genotoxicity: a key role of ROS production.

Communications orales :

Colloque SFTG (Société Française de Toxicologie Génétique) – ARET (Association pour la Recherche en Toxicologie), Juin 2014, Paris. Les nanoparticules de WC-Co : témoin positif de référence pour les essais de génotoxicité *in vitro*? Moche H, Chevalier D, Vezin H, Claude N, Lorge E, Nesslany F.

International Conference on Environmental Mutagens, Novembre 2013, Foz do Iguaçu, Brésil. Tungsten carbide-cobalt as a nanoparticulate reference positive control in *in vitro* genotoxicity assays. Moche H, Chevalier D, Barois N, Lorge E, Claude N, Nesslany F.

Communications affichées :

International Conference on Environmental Mutagens, Novembre 2013, Foz do Iguaçu, Brésil. Tungsten carbide-cobalt as a nanoparticulate reference positive control in *in vitro* genotoxicity assays. Moche H, Chevalier D, Barois N, Lorge E, Claude N, Nesslany F.

Journée André Verbert, Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Septembre 2012. Tungsten carbide-cobalt as a nanoparticulate reference positive control in *in vitro* genotoxicity assays. Moche H, Chevalier D, Barois N, Lorge E, Claude N, Nesslany F.

Liste des principales abréviations

AFM : Microscopie à force atomique

Afssaps : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament

AP : Apurique/apyrimidique

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

BET : Brunauer, Emmet et Teller

CARPA : Complement activation-related pseudoallergy, pseudo-allergie liée à l'activation du complément

DLS : Dynamic light scattering, diffusion dynamique de la lumière

DMPO : 5,5-diméthyl-pyrroline N-oxide

DRX : Diffraction des rayons X

Endo III : Endonucléase III

EPR : Enhanced permeability and retention

ERN : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FC : Fold-change

FDA : Food and Drug Administration

FPG : Formamidopyrimidine ADN N-glycosylase

GADD45a : Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha

GC : Chromatographie en phase gazeuse

GFP : Green fluorescent protein

GPI : Glycosylphosphatidyl inositol

HARN : High aspect ratio nanostructures

hOGG1 : 8-oxo-guanine glycosylase 1 humaine

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase

IARC : International Agency for Research on Cancer, Centre International de Recherche sur le Cancer

ICH : International Conference on Harmonisation

ICP-MS : Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif

iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

JRC : Joint Research Center

MAP kinases : Mitogen-activated protein kinases

MEB : Microscopie électronique à balayage
MET : Microscopie électronique à transmission
MLA : Mouse lymphoma assay
MPO : Myéloperoxydase
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCL : Nanocapsule lipidique
ND : Nanodiamant
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques
PEG : Polyéthylène glycol
PLA : Poly(acide lactique)
PLGA : Poly(acide lactique-coglycolique)
RICC : Augmentation relative du nombre de cellules
RPD : Doublement relatif de la population
RPE : Résonance paramagnétique électronique
SAXS : Small angle X-ray scattering, diffusion des rayons X aux petits angles
SCENIHR : Scientific Committee for Newly Identified Health Risks
SPION : Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
TFT : Trifluorothymidine
TFTMP : Trifluorothymidine monophosphate
TK : Thymidine kinase
TMP : Thymidine monophosphate
WC-Co : Carbure de tungstène-cobalt
XPRT : Xanthine-guanine phosphoribosyl transférase

Liste des figures

Figure 1 : Classification des nanomatériaux. D'après ISO (2008, 2010).	19
Figure 2 : Evolution du nombre de produits de consommation contenant des nanomatériaux référencés entre 2005 et 2010 dans l'inventaire du « Project on Emerging Nanotechnologies ».	21
Figure 3 : Dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires en fonction de leur taille (Oberdörster et al., 2005).	24
Figure 4 : Biocinétique des nanomatériaux (Oberdörster et al., 2005).	27
Figure 5 : Paramètres physico-chimiques influençant l'internalisation cellulaire des nanomatériaux (Rauch et al., 2013).	28
Figure 6 : Mécanismes d'internalisation cellulaire des nanomatériaux (Chou et al., 2011).	29
Figure 7 : Caractéristiques physico-chimiques étudiées dans le projet européen Nanogénotox et méthodes utilisées (Nanogenotox, 2013).	33
Figure 8 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS)	37
Figure 9 : Représentation schématique du potentiel zêta	38
Figure 10 : Principe de la mesure du potentiel zêta (Malvern Instruments).	39
Figure 11 : Différents mécanismes pouvant entraîner la formation d'ERO intracellulaires par les nanomatériaux. 1 : via la formation d'ERO extracellulaires ; 2 : via la formation d'ERO dans les vésicules ; 3 : par l'intermédiaire de la dissolution des nanomatériaux ; 4 : directement par les nanomatériaux libres dans le cytoplasme ; 5 : Formation d'ERO par les mitochondries en réponse à l'interaction cellulaire avec les nanomatériaux. D'après Simon-Deckers (2008).	44
Figure 12 : Les différentes lésions oxydatives de l'ADN. D'après Favier (2003).	45
Figure 13 : Aspects des comètes en fonction de l'importance de la fragmentation de l'ADN.	48

Figure 14 : Principe du test Pig-a (Litron Laboratories).	55
Figure 15 : Marquage pancentromérique (jaune) ou centromérique spécifique d'un chromosome donné (blanc) associé au test des micronoyaux (Fenech et al., 2011). A : micronoyau formé à partir d'un fragment acentrique, B : micronoyau formé à partir d'un chromosome entier, C : non disjonction entre les chromatides sœurs d'un chromosome.	58
Figure 16 : Proposition de mécanisme de réduction de l'oxygène par le WC-Co (Lison et al., 1995).	70
Figure 17 : Différentes structures de nanomédicaments sur le marché ou en développement (Bamrungsap et al., 2012).	71
Figure 18 : Représentation schématique d'une nanocapsule lipidique (NCL) (Roger, 2009).	80
Figure 19 : Principe de la mesure d'impédance.	136
Figure 20 : Test Pig-a chez des rats exposés par voie intraveineuse aux WC-Co NP pendant 3 jours.	171
Figure 21 : Test des comètes <i>in vivo</i> chez des souris traitées par voie intranasale avec des WC-Co NP, à raison de 3 administrations répétées. A : poumon, B : rate, C : foie, D : rein.	172
Figure 22 : Lésions primaires et lésions oxydatives de l'ADN dans des cellules 16-HBE exposées pendant 4h à différentes concentrations de NDs 20 nm (A), 50 nm (B) ou 100 nm (C).	178
Figure 23 : Lésions primaires et lésions oxydatives de l'ADN dans des cellules T84 exposées pendant 4h à différentes concentrations de NDs 20 nm (A), 50 nm (B) ou 100 nm (C).	179
Figure 24 : Test des micronoyaux sur cellules 16-HBE exposées pendant 4h à différentes concentrations de NDs de trois tailles différentes (20nm, 50nm et 100nm), suivi d'une période de recouvrement de 44h.	180
Figure 25 : Test des micronoyaux sur cellules 16-HBE exposées en continu pendant 48h à différentes concentrations de NDs 20nm.	180
Figure 26 : Fréquence de cellules micronucléées (%) dans le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse sur lymphocytes humains exposés pendant 24h aux	

nanocapsules lipidiques (NCL) suivi d'une période de recouvrement de 20h. A,B : NCL de 25 nm ; C,D : NCL de 55 nm ; E,F : NCL de 100 nm, de charge neutre, négative ou positive. 186

Figure 27 : Test des comètes sur lymphocytes humains après 24h d'exposition aux nanocapsules lipidiques (NCL) de 25 nm (A), 55 nm (B) ou 100 nm (C) de trois charges différentes. 188

Figure 28 : Test des comètes sur lymphocytes humains après 4h d'exposition aux nanocapsules lipidiques (NCL) de 25 nm (A), 55 nm (B) ou 100 nm (C) de trois charges différentes. 189

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de domaines d'applications des nanomatériaux (Anses, 2014). 22

Tableau 2 : Médicaments sous forme nanoparticulaire à indication thérapeutique ayant obtenu une AMM en France. D'après Etheridge et al. (2013), Thériaque et Ansm. 74

Tableau 3 : Médicaments sous forme nanoparticulaire à indication diagnostique ayant obtenu une AMM en France. D'après Etheridge et al. (2013), Thériaque et Ansm. 75

Tableau 4 : Caractéristiques des nanocapsules lipidiques. 185

Préambule

Les nanomatériaux manufacturés entrent dans la composition d'une grande variété de produits de la vie courante d'ores et déjà présents sur le marché et concernent un grand nombre de secteurs industriels (électronique, transport, bâtiment, textile, cosmétique, médical...). Le développement des nanotechnologies s'accompagne de questionnements quant à l'état des connaissances concernant l'évaluation des risques associés aux nanomatériaux, tant pour la population générale que professionnelle, ou encore pour l'environnement (Anses, 2014). En parallèle à l'avancée technologique, une nouvelle branche de la toxicologie, consacrée à l'étude de la toxicité des nanomatériaux, a émergé, sous le nom de nanotoxicologie. Ces études s'avèrent toutefois très complexes, car il existe de très nombreux nanomatériaux, et chacune de leurs caractéristiques physico-chimiques peut potentiellement influencer leur toxicité. Par ailleurs, les tests utilisés en routine pour l'évaluation des produits chimiques ne s'avèrent pas toujours adaptés à l'évaluation des nanomatériaux. Dans ce contexte, notre travail a suivi deux grands axes, le premier consacré à l'étude d'un candidat nanomatériau génotoxique de référence, puis nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la génotoxicité de candidats nanovecteurs de médicaments. Ce travail de recherche a été principalement réalisé au sein du Laboratoire de toxicologie génétique de l'Institut Pasteur de Lille et du centre Biologie Servier. L'étude des nanomatériaux impliquant une approche multidisciplinaire, plusieurs collaborations ont été mises en place dans ce travail ; elles sont détaillées au début de ce manuscrit (p. 6).

Ce manuscrit est divisé en trois parties principales. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique permettant de situer le contexte du sujet, notamment les principales thématiques spécifiques aux nanomatériaux développées dans ce travail : nanotoxicologie, caractérisation physico-chimique des nanomatériaux, évaluation de la génotoxicité des nanomatériaux. Les différents nanomatériaux étudiés dans la partie expérimentale seront également présentés. La deuxième partie présente et discute les résultats obtenus pour les deux aspects du sujet. Un premier chapitre est consacré à l'évaluation du carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) comme témoin

nanoparticulaire génotoxique de référence et à l'étude des mécanismes d'action impliqués dans la génotoxicité des nanoparticules de WC-Co. La majorité des résultats obtenus pour le carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) est présentée sous forme d'articles publiés ou soumis. Les résultats d'une étude préliminaire sur la génotoxicité *in vivo* des nanoparticules de WC-Co, ne permettant pas de tirer des conclusions définitives mais qui nous paraissent intéressants, sont également présentés à la suite des articles. Le second chapitre présente l'évaluation de la génotoxicité *in vitro* de deux types de candidats nanovecteurs de médicaments, des nanodiamants et des nanocapsules lipidiques. Finalement, une discussion générale est présentée dans la dernière partie, suivie d'une conclusion et de perspectives.

PARTIE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. Nanomatériaux et nanotoxicologie

Les nanomatériaux peuvent être d'origine naturelle ou anthropogénique. Des nanoparticules sont produites lors d'événements naturels tels que l'activité volcanique, les feux de forêt ou les conversions gaz-particules. Les nanomatériaux d'origine anthropogénique non-intentionnelle peuvent provenir des émissions de moteurs, de phénomènes de combustion ou de fumées. Enfin les nanomatériaux manufacturés ont une origine anthropogénique intentionnelle (Oberdörster et al., 2005). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons exclusivement à cette dernière catégorie de nanomatériaux, produits intentionnellement pour leurs propriétés intéressantes de nombreux secteurs industriels ; la terminologie « nanomatériau » fera donc référence aux nanomatériaux manufacturés. Dans ce chapitre, nous aborderons différentes définitions des nanomatériaux et quelques-unes de leurs principales utilisations. Nous présenterons ensuite différents aspects de la toxicologie des nanomatériaux : la toxicocinétique, les paramètres physico-chimiques influençant leur toxicité, et certaines particularités de la toxicité des nanomatériaux.

1.1. Définitions

Illustrant la complexité du sujet, la définition même du terme « nanomatériau » pose de nombreuses questions. Les définitions proposées font encore l'objet de nombreuses discussions scientifiques, réglementaires, institutionnelles ainsi qu'au sein de la société civile (Anses, 2014). En effet, plusieurs définitions différentes co-existent au niveau international. Ces définitions sont susceptibles d'évoluer en fonction des avancées technologiques et scientifiques. Ainsi, il est prévu que celle de la Commission européenne soit réexaminée pour décembre 2014¹. Parmi les différentes définitions, celles de la Commission Européenne et de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) sont présentées ci-dessous.

1.1.1. Définitions de l'ISO

Afin d'harmoniser les terminologies utilisées dans le domaine des nanotechnologies, l'ISO a édité des Spécifications techniques (ISO, 2008, 2010), dans lesquelles sont définies les principales terminologies. Le terme nanomatériau constitue la terminologie la plus générale, défini comme « un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique », avec l'échelle nanométrique correspondant à une « gamme de dimensions s'étendant approximativement de 1 nm à 100 nm ». Les nanomatériaux regroupent donc des nano-objets, possédant « une, deux ou trois dimensions externes à l'échelle nanométrique », et les matériaux nanostructurés, possédant « une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique ». Les nanoparticules font partie des nano-objets et possèdent leurs trois dimensions externes à la nano-échelle. Elles diffèrent ainsi des nanofeuillets et des nanofibres, dont respectivement une et deux dimensions externes sont à la nano-échelle, les autres dimensions étant significativement plus grandes (ISO, 2008). Les relations entre ces différentes terminologies sont représentées dans la Figure 1.

¹ Journal officiel de la Commission européenne. Recommandation de du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011H0696&qid=1397751778438&from=EN>. Consulté le 17.04.2014.

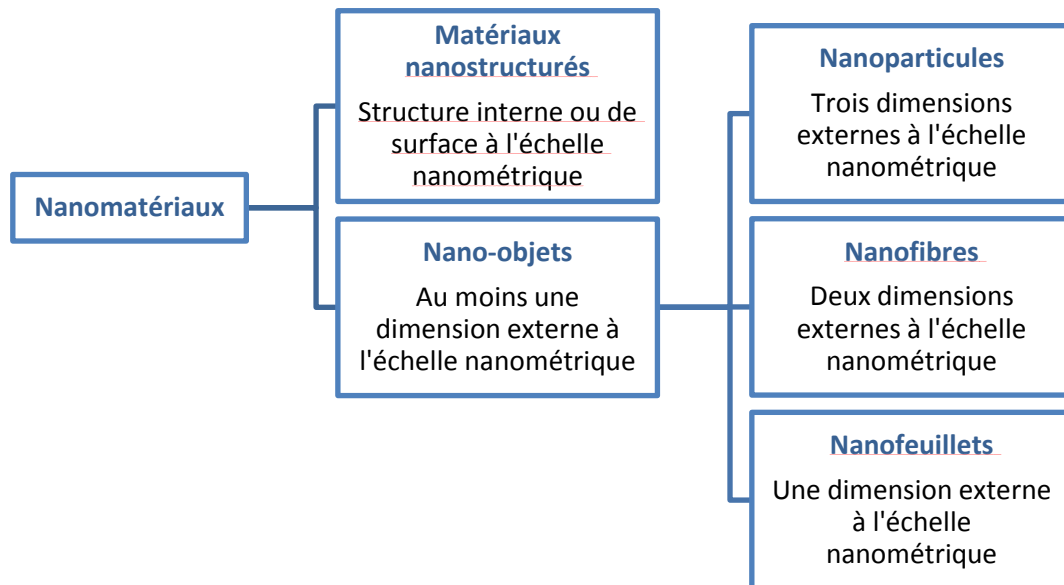


Figure 1 : Classification des nanomatériaux. D'après ISO (2008, 2010).

Des définitions des termes agrégats et agglomérats sont également données dans ces Spécifications techniques. Ainsi, un agrégat est « un ensemble de particules comprenant des particules fortement liées ou fusionnées dont l'aire de la surface externe résultante peut être significativement plus petite que la somme des aires de surface calculées de chacun des composants. Les forces assurant la cohésion d'un agrégat sont des forces intenses, par exemple liaisons covalentes ou forces résultant d'un frittage ou d'un enchevêtrement physique complexe » (ISO, 2008). Au contraire, un agglomérat est « un ensemble de particules faiblement liées, d'agrégats ou mélange des deux dont l'aire de surface externe résultante est similaire à la somme des aires de surface de chacun des composants. Les forces assurant la cohésion d'un agglomérat sont des forces faibles, par exemple forces de Van der Waals ou un simple enchevêtrement physique » (ISO, 2008).

1.1.2. Définitions de la Commission européenne

La Commission européenne a également publié une recommandation pour la définition des nanomatériaux dans le Journal officiel de L'Union européenne du 18

octobre 2011², afin d'assurer un cadre réglementaire dans le domaine des nanotechnologies. Cette définition repose sur les travaux du Joint Research Center (JRC) et du Scientific Committee for Newly Identified Health Risks (SCENIHR).

Un nanomatériau est ainsi défini comme « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm »². Il est toutefois spécifié que dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50 % fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil compris entre 1 % et 50 %. Par ailleurs, une dérogation est apportée pour les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone à paroi simple présentant une ou plusieurs dimensions externes inférieures à 1 nm, qui sont à considérer comme des nanomatériaux².

Les termes agrégats et agglomérats sont également définis dans cette recommandation : un agglomérat comme « un amas friable de particules ou d'agrégats dont la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels » et un agrégat comme « une particule constituée de particules soudées ou fusionnées », une particule étant « un minuscule fragment de matière possédant des contours physiques bien définis »².

La définition de la Commission européenne ne fait pas de distinction entre les différents nano-objets décrits dans la définition de l'ISO, sa définition est plutôt orientée vers une condition liée à la distribution de taille des constituants d'un matériau. Par ailleurs, les matériaux nanostructurés de la définition de l'ISO sont exclus de la définition de la Commission européenne. Ces différences sont liées à des objectifs différents pour la Commission européenne, qui propose une définition afin de mettre en place un cadre réglementaire, et pour l'ISO, qui a une finalité plutôt technico-industrielle.

² Journal officiel de la Commission européenne. Recommandation de du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011H0696&qid=1397751778438&from=EN>. Consulté le 17.04.2014.

1.2. Utilisations des nanomatériaux

Les nanomatériaux intéressent de plus en plus d'industriels de secteurs aussi nombreux que variés, et de nombreux produits de consommation contenant des nanomatériaux sont commercialisés. Certains de ces produits, commercialisés dans 30 pays de différentes régions du monde, sont référencés dans un inventaire disponible sur le site internet du « Project on Emerging Nanotechnologies »³ créé par le Woodrow Wilson International Center for Scholars en collaboration avec le Virginia Tech Center for Sustainable Nanotechnology. En janvier 2014, 1684 produits de consommation étaient enregistrés dans la base de données, répartis en plusieurs catégories, la plus représentée étant la santé et le bien-être avec 848 articles. Un historique permet de suivre l'évolution du nombre de produits référencés, en constante augmentation (Figure 2).

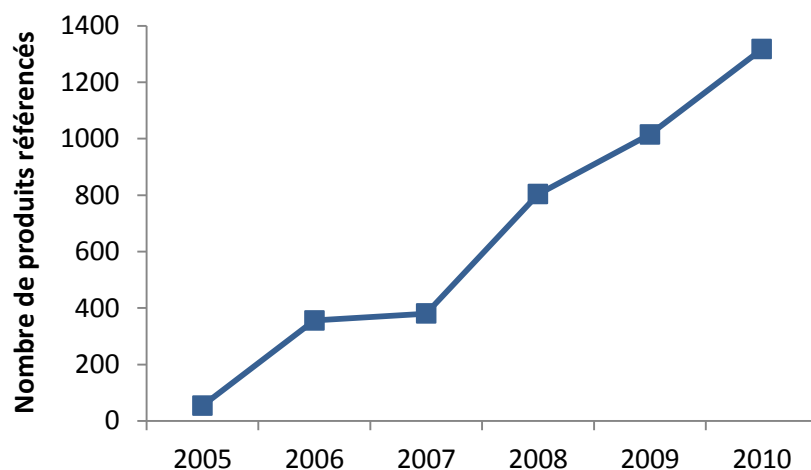


Figure 2 : Evolution du nombre de produits de consommation contenant des nanomatériaux référencés entre 2005 et 2010 dans l'inventaire du « Project on Emerging Nanotechnologies »³.

Parmi les nanomatériaux les plus fréquents recensés dans la base de données³, l'argent est retrouvé dans 410 produits, notamment des textiles ou des produits de soin corporel pour ses propriétés antibactériennes. Le dioxyde de titane (TiO_2) est utilisé notamment dans les protections solaires ou comme agent antiagglomérant ou pigment dans 197 produits de consommation. Le carbone est retrouvé dans 76 articles, par exemple sous forme de nanotubes de carbone dans des raquettes de tennis et des vélos pour leur résistance. La silice (SiO_2) est présente dans 42 produits de consommation, notamment d'entretien automobile ou pour la protection de différentes surface, et 38 articles, principalement des protections solaires, contiennent de l'oxyde de zinc (ZnO).

³ Project on Emerging Nanotechnologies. Consumer Products Inventory. <http://www.nanotechproject.org/cpi/> Consulté le 12.03.14.

Cet inventaire n'est cependant pas exhaustif, et des nanomatériaux peuvent également par exemple être utilisés pour la formulation de médicaments, comme présenté plus en détail dans le CHAPITRE 4.

D'autres exemples de domaines d'utilisation des nanomatériaux ou de produits finis contenant des nanomatériaux sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Exemples de domaines d'applications des nanomatériaux (Anses, 2014).

Nanomatériaux	Domaines d'applications	Exemples de produits finis*
Nano-oxydes	Matériaux composites structuraux – Composants anti-UV – Polissage mécano-chimique des substrats dans la microélectronique – Applications photocatalytiques, BTP	Additifs alimentaires, peintures, cosmétiques, encres, pneumatiques
Matériaux nanométralliques	Secteurs antimicrobiens et/ou de la catalyse – Couches conductrices des écrans. les capteurs ou encore les matériaux énergétiques	Pansements, films alimentaires, revêtements (réfrigérateur), plans de travail. vitres ou murs autonettoyant. vêtements, matériaux en contact de denrées alimentaires, emballages alimentaires ingérables
Noirs de carbone	Transports, BTP, imprimerie	Pneumatiques, encres, peintures
Matériaux nanoporeux	Aérogels pour isolation thermique dans les domaines de l'électronique, de l'optique et de la catalyse – Domaine bio-médical pour des applications de type vectorisation ou encore implants	Membranes de filtration de l'eau, peintures, colles, fertilisants,
Nanotubes de carbone	Nanocomposites conducteurs électriques – Matériaux structuraux – nanoélectronique, biomédical	Raquette de tennis, écran souple, pare-chocs, phares, batteries, pneumatiques
Nanomatériaux massifs	Transports, BTP, équipements sportifs	Revêtements durs – Composants structuraux pour l'industrie aéronautique, l'automobile, les conduites pour les industries pétrolières et gazières, le domaine sportif ou encore le secteur anticorrosion
Dendrimères	Domaine médical – Domaine cosmétique	administration de médicaments, détection rapide
<i>Quantum dots</i>	Applications optoélectroniques (écrans)	Cellules photovoltaïques, encres et peintures pour applications de type marquage anti-contrefaçon
Fullerènes	Secteurs du sport (nanocomposites) et des cosmétiques	Mascaras, crèmes de beauté, balles de golf
Nanofils	Électronique, opto-électronique, photo-voltaïque	Applications dans les couches conductrices des écrans ou encore les cellules solaires ainsi que les dispositifs électroniques

1.3. Nanotoxicologie

Le développement des nanomatériaux a conduit à l'émergence d'une nouvelle branche de la toxicologie, la nanotoxicologie, qui étudie les effets de l'exposition aux nanomatériaux sur la santé humaine et l'environnement. Dans ce travail, nous nous intéresserons uniquement aux effets des nanomatériaux sur la santé humaine. L'absorption des nanomatériaux dans l'organisme peut avoir lieu à partir de différentes voies d'exposition, principalement respiratoire, digestive ou cutanée. Certains nanomatériaux pourront franchir les barrières biologiques à partir de l'organe exposé vers d'autres organes par des mécanismes de translocation, résultant en une toxicité potentielle à différents niveaux de l'organisme. Ainsi, nous aborderons dans la première partie de ce chapitre les parties absorption et distribution du processus de toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme, élimination), la plupart des nanomatériaux n'étant pas métabolisés (Landsiedel et al., 2012). Les principales spécificités de la nanotoxicologie seront ensuite présentées, à l'exception de la génotoxicité, qui fera l'objet d'un chapitre spécifique.

1.3.1. Principales voies d'exposition aux nanomatériaux

1.3.1.1. Voie respiratoire

Le système respiratoire représente une voie d'entrée majeure dans l'organisme pour les nanomatériaux. Les particules inhalées se déposent différemment dans les voies respiratoires en fonction de leur taille. Ainsi, alors que les particules de taille micrométrique vont principalement se déposer au niveau des voies respiratoires supérieures, celles de taille nanométrique peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires. Le mécanisme principal de déposition des nanoparticules inhalées est la diffusion liée à leur déplacement lorsqu'elles entrent en collision avec les molécules d'air. D'autres mécanismes liés à la gravité ou l'inertie concernent seulement les particules de plus grande taille (Oberdörster et al., 2005). La Figure 3 présente la distribution d'après un modèle mathématique prédictif (International Commission on Radiological Protection, 1994) des particules inhalées lors d'une respiration nasale dans le tractus respiratoire, divisé en trois compartiments : naso-pharyngé, trachéo-bronchique et alvéolaire. La quantité de particules déposées ainsi que leur site de dépôt varie en fonction de leur taille : par exemple, environ 50% des nanoparticules de 20 nm se déposent dans la région alvéolaire, contre seulement 15% environ des nanoparticules de 1 μm . La taille ainsi que l'état d'agglomération des nanomatériaux sont donc des facteurs importants influençant le dépôt des nanomatériaux dans le tractus respiratoire. En effet, le dépôt

des agglomérats ou agrégats, présentant une taille plus importante, sera différent de celui des nanomatériaux isolés.

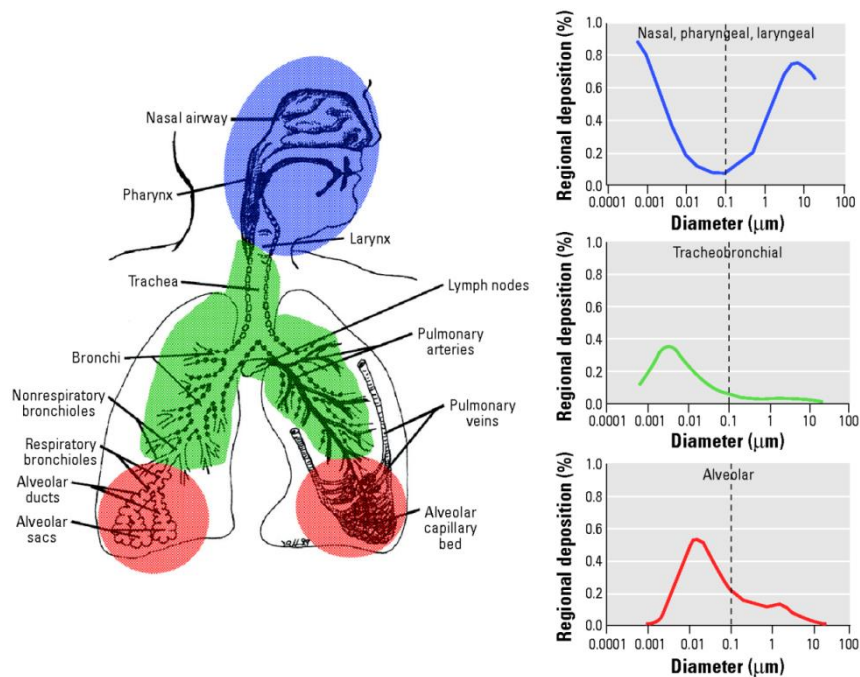


Figure 3 : Dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires en fonction de leur taille (Oberdörster et al., 2005).

Les nanomatériaux déposés dans les voies respiratoires peuvent faire l'objet d'une élimination par clairance mucociliaire en direction du carrefour aéro-digestif pour les compartiments trachéo-bronchique et naso-pharyngé, ou d'une phagocytose par les macrophages alvéolaires (Andujar et al., 2009). Il a également été décrit que les nanomatériaux pourraient accéder par translocation à l'épithélium et l'interstitium pulmonaires puis à la circulation sanguine ou au système lymphatique (Andujar et al., 2009; Oberdörster et al., 2005).

1.3.1.2. Voie digestive

Des nanomatériaux peuvent se retrouver dans le tractus gastro-intestinal par le phénomène de clairance mucociliaire après inhalation ou directement après ingestion de nanomatériaux présents dans les aliments ou l'eau, ou de médicaments sous forme nanoparticulaire. Des résultats contradictoires pour l'absorption intestinale des nanomatériaux sont rapportés dans la littérature (Landsiedel et al., 2012).

1.3.1.3. Voie cutanée

L'exposition par voie cutanée peut avoir lieu lors de manipulations de nanomatériaux au poste de travail dans le cas d'une exposition professionnelle. La population générale peut quant à elle être exposée aux nanomatériaux par voie cutanée lors de l'application de cosmétiques contenant des nanomatériaux, notamment les protections solaires, ou lors du port de vêtements contenant des nanomatériaux par exemple. La pénétration cutanée de nanoparticules de TiO₂ et de ZnO a particulièrement été étudiée, ces deux types de nanomatériaux étant fréquemment utilisés dans les protections solaires. Les résultats d'un grand nombre d'études de pénétration cutanée *in vitro* et *ex vivo* sur peau animale et humaine indiquent une présence des nanoparticules de TiO₂ limitée aux couches supérieures de la peau. Néanmoins, ces études ont été réalisées sur des temps courts (72 heures maximum), avec des particules souvent non caractérisées selon les connaissances actuelles notamment en termes de taille, de forme cristalline ou d'enrobage (Anses, 2014). Dans une étude *in vivo* sur des mini-porcs traités par des applications répétées de nanoparticules de TiO₂ pendant 22 jours, des nanoparticules de TiO₂ ont été retrouvées dans l'épiderme, et également en très faible quantité dans le derme des animaux (Sadrieh et al., 2010). Des études d'absorption cutanée *in vitro* (modèle de peau animale et humaine) et chez le volontaire sain ont montré la présence de nanoparticules de ZnO limitée aux couches supérieures de la peau (Anses, 2014). Concernant d'autres nanomatériaux, Larese Filon et al. (2011) ont montré dans un essai *in vitro* sur cellules de Franz que des nanoparticules d'or étaient capables de traverser la peau saine et lésée, et des nanoparticules ont été retrouvées dans toutes les couches de la peau incluant le derme. Les résultats rapportés dans la littérature concernant la peau lésée semblent contradictoires et il est probable que toute lésion de la peau de nature pathologique ou d'origine exogène puisse favoriser l'absorption des nanomatériaux (Anses, 2014). De plus, la flexion de la peau pourrait entraîner une augmentation de l'absorption cutanée des nanomatériaux (Larese Filon et al., 2011; Oberdörster et al., 2005). Toutefois dans la majorité des études cliniques ou *in vivo* (porc, mini-porc, souris), les nanomatériaux n'étaient pas capables de traverser la peau intacte, et n'étaient donc pas disponibles au niveau systémique (Landsiedel et al., 2012).

1.3.1.4. Autres voies

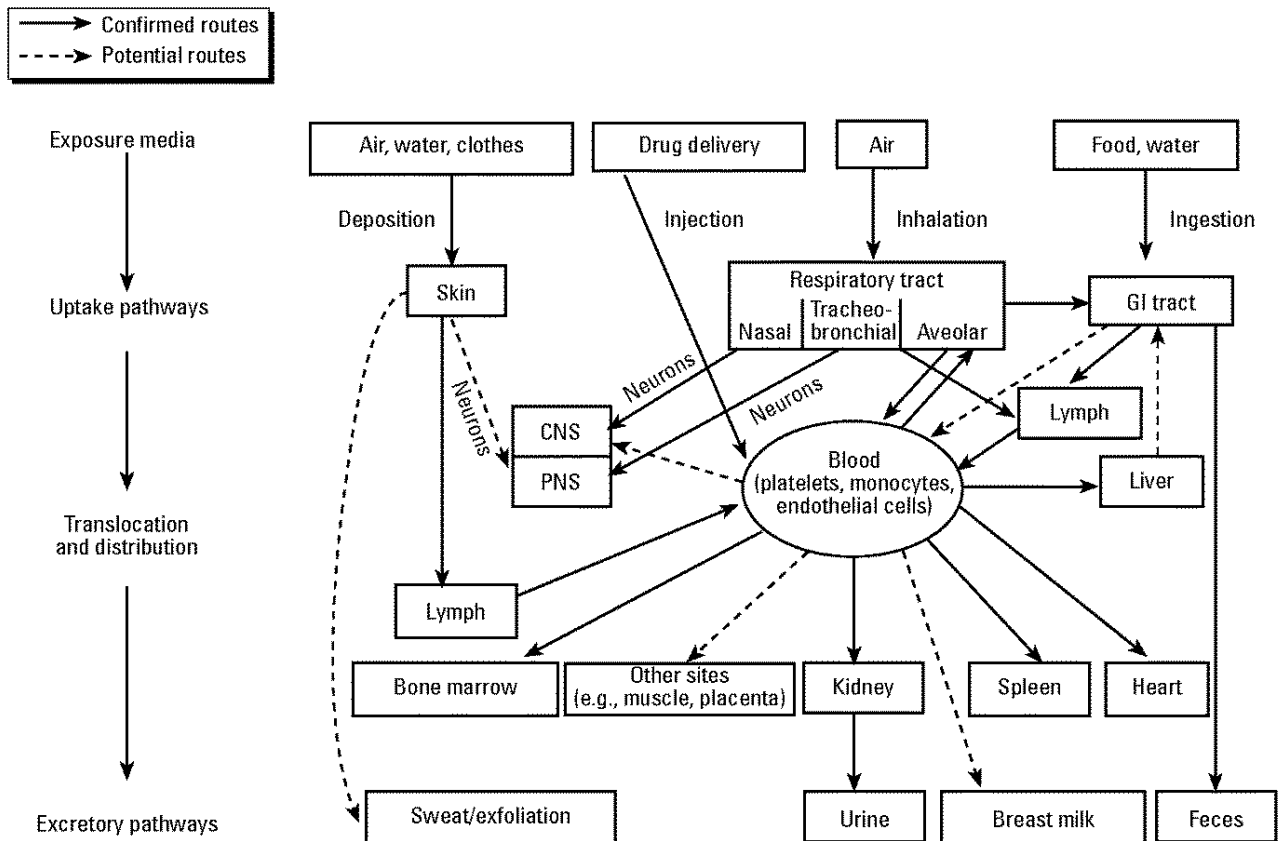
Les différentes voies parentérales peuvent également constituer des voies d'exposition à certains nanomatériaux, notamment dans le cas des nanomédicaments. Les voies sous-cutanée, intradermique ou intramusculaire sont les voies principales pour l'administration de vaccins, et pourraient donc constituer une voie d'exposition à des

nanomatériaux utilisés comme adjuvants vaccinaux. Les voies intraveineuses ou intrapéritonéales peuvent également être utilisées pour l'administration de nanomédicaments. L'exposition à des nanomatériaux pourrait également avoir lieu par la voie oculaire, par exemple dans le cas de projections.

1.3.2. Translocation et distribution des nanomatériaux

Certains nanomatériaux peuvent à partir de l'organe d'exposition passer dans la circulation sanguine et/ou lymphatique par des mécanismes de translocation, et peuvent être distribués dans l'organisme. Certains organes sont plus particulièrement ciblés par les nanomatériaux, notamment les organes du système réticulo-endothélial contenant de nombreux macrophages : le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse (Landsiedel et al., 2012). Certains nanomatériaux, par exemple des nanomatériaux fonctionnalisés avec du polyéthylène glycol (PEG) peuvent toutefois échapper à la capture par les macrophages et sont ainsi distribués plus largement dans d'autres organes, tels que le cœur ou les reins. Si certaines voies de translocation ont été confirmées, notamment les mécanismes de translocation épithéliale et interstitielle pulmonaires vers la circulation sanguine ou lymphatique, d'autres sont encore hypothétiques (Figure 4). Certains auteurs suggèrent une translocation des nanomatériaux au niveau du système nerveux central après exposition respiratoire selon deux mécanismes hypothétiques : une translocation vers la circulation systémique avec un passage à travers la barrière hémato-encéphalique ou une translocation neuronale à partir de la muqueuse olfactive via le bulbe olfactif, suivie d'une migration axonale vers le système nerveux central (Andujar et al., 2009; Oberdörster et al., 2005). Toutefois ce deuxième mécanisme, montré chez des rongeurs, est plus hypothétique chez l'homme, dont le système olfactif est plus rudimentaire avec une muqueuse olfactive nasale de moindre surface (Oberdörster et al., 2005).

La pénétration des nanomatériaux dans l'organisme entraîne à leur surface la formation spontanée d'une couche de protéines, appelée « corona ». La composition de la corona est complexe ; si par exemple le nanomatériau se trouve dans la circulation sanguine, il peut interagir avec chacune des protéines plasmatiques, qui ne s'adsorbent cependant toutes pas avec la même affinité. La formation de la corona peut avoir pour conséquence une augmentation ou une diminution de l'agglomération des nanomatériaux (Landsiedel et al., 2012). La composition de la corona pourrait jouer un rôle dans le passage des barrières dans l'organisme mais également dans le contrôle de l'internalisation cellulaire ou encore de l'exocytose des nanomatériaux (Anses, 2014).



CNS : central nervous system ; PNS : peripheral nervous system ; GI tract : gastrointestinal tract

Figure 4 : Biocinétique des nanomatériaux (Oberdörster et al., 2005).

1.3.3. Internalisation cellulaire des nanomatériaux

Les nanomatériaux peuvent pénétrer dans les cellules par plusieurs mécanismes, en fonction de la nature des cellules et des caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux (Figure 5). L'internalisation cellulaire des nanomatériaux dépend ainsi de leur composition, leur taille, leur forme, leur charge de surface, la composition de la corona et des éventuelles modifications de surface. Les différents mécanismes d'internalisation des nanomatériaux dans les cellules sont présentés dans la Figure 6.

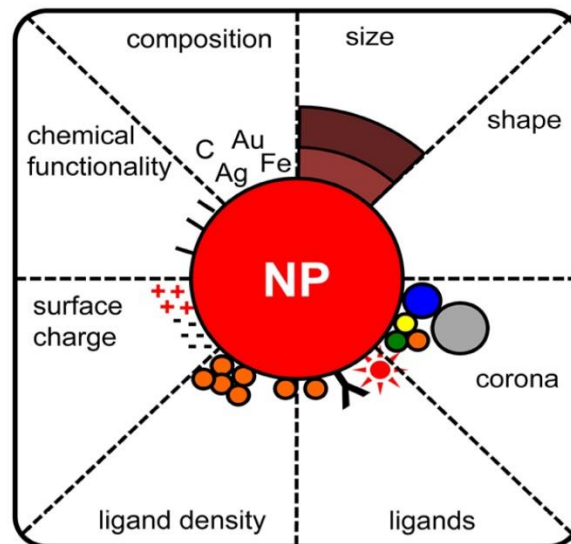


Figure 5 : Paramètres physico-chimiques influençant l'internalisation cellulaire des nanomatériaux (Rauch et al., 2013).

La plupart des cellules peuvent internaliser les nanomatériaux par des mécanismes de pinocytose, incluant la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose cavéole-dépendante et l'endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles (Chou et al., 2011; Panariti et al., 2012). En revanche, seules certaines cellules spécialisées telles que les macrophages et les neutrophiles sont capables de phagocytose. La phagocytose consiste en l'ingestion de particules de grande taille, au préalable opsonisées dans la circulation sanguine, dans des vésicules de diamètre supérieur à 250 nm appelées phagosomes. (Chou et al., 2011; Panariti et al., 2012). A l'exception de la macropinocytose qui consiste en la formation de vésicules de 1 à 5 μm (Panariti et al., 2012), les mécanismes de pinocytose concernent des particules de quelques nm à quelques centaines de nm. L'endocytose clathrine-dépendante permet l'internalisation de particules jusqu'à 200 nm, alors que les particules de taille supérieure à 200 nm et inférieure à 1 μm peuvent pénétrer dans les cellules préférentiellement par endocytose cavéole-dépendante (Rejman et al., 2004). L'endocytose clathrine-dépendante se produit dans des régions de la membrane cellulaire riches en protéines de clathrine, qui forment par polymérisation des structures semblables à des cages qui se séparent de la membrane cellulaire sous l'action de la dynamine et forment des vésicules (Panariti et al., 2012).

Certains nanomatériaux pourraient également être internalisés par diffusion passive à travers la membrane cellulaire. Ce mécanisme a particulièrement été étudié dans les globules rouges, dépourvus de mécanismes d'endocytose (Treuel et al., 2013).

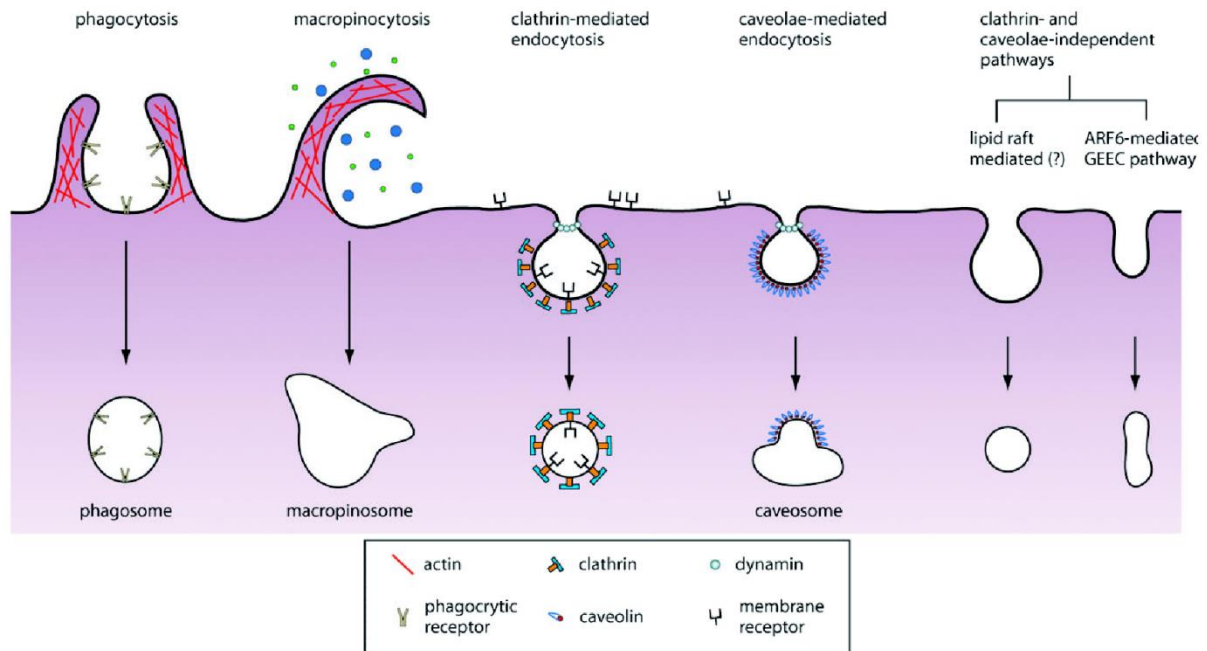


Figure 6 : Mécanismes d'internalisation cellulaire des nanomatériaux (Chou et al., 2011).

1.3.4. Particularités de la toxicité des nanomatériaux

La toxicité des nanomatériaux présente quelques spécificités, liées à leurs propriétés particulières. C'est notamment le cas pour l'immunotoxicité, la toxicité pour la reproduction, la toxicité cardio-vasculaire et la génotoxicité. Du fait du caractère central de la génotoxicité des nanomatériaux dans ce travail, le CHAPITRE 2 lui sera consacré.

1.3.4.1. Immunotoxicité

Certains nanomatériaux peuvent interagir avec le système immunitaire, et induire une immunostimulation ou une immunosuppression.

- Immunostimulation

Les nanomatériaux peuvent entraîner une libération de cytokines responsables d'une réaction inflammatoire notamment au niveau pulmonaire suivant l'inhalation de nanomatériaux (Afssaps, 2011). Ces réactions inflammatoires peuvent être associées à une production d'espèces réactives de l'oxygène (cf paragraphe 2.1.2).

Parmi les interactions avec le système immunitaire les plus décrites pour les nanomatériaux, certains peuvent entraîner une activation de la cascade du complément, induisant une pseudo-allergie liée à l'activation du complément (CARPA pour « complement activation-related pseudoallergy ») (Szebeni, 2005). Le syndrome CARPA a été mis en évidence pour des médicaments injectables sous forme de liposomes ou de micelles, ou pour des produits de contraste. Toutefois de nombreux types de nanomatériaux pourraient être capables d'induire un syndrome CARPA, puisqu'il a été montré que des nanotubes de carbone étaient capables d'activer le complément (Rybak-Smith and Sim, 2011). Le syndrome CARPA apparaît généralement très rapidement lors de la première administration du produit, et se caractérise le plus fréquemment par des rougeurs, une dyspnée, une douleur thoracique, une douleur dorsale. Il peut toutefois dans certains cas entraîner une réaction anaphylactique entraînant le décès du patient par dysfonction cardiaque (Szebeni et al., 2011). Le syndrome CARPA n'est pas détecté avec les tests standards d'allergie (Szebeni, 2005), et actuellement, la détection du potentiel de développement d'un syndrome CARPA est directement réalisée par un test d'activation du complément sur le sérum ou le sang des patients (Afssaps, 2011).

Quelques études rapportent une antigénicité pour des nanomatériaux, avec la formation d'anticorps spécifiques dirigés contre des fullerènes (Dobrovolskaia and McNeil, 2007). Par ailleurs, certains nanomatériaux ont des propriétés adjuvantes qui peuvent conduire à une exacerbation ou à une modification du type de réponse immunitaire à un antigène donné (réponse Th₁/Th₂) pouvant induire des réactions d'hypersensibilité ou d'allergie (Afssaps, 2011). Ces propriétés adjuvantes peuvent toutefois être recherchées pour la formulation de vaccins, permettant d'augmenter la réponse immunitaire induite par l'antigène (Dobrovolskaia and McNeil, 2007; Zolnik et al., 2010).

- Immunosuppression

Une immunosuppression pourrait être induite par une toxicité des nanomatériaux vis-à-vis des cellules immunitaires, les lymphocytes T ou B ou les cellules phagocytaires par exemple, ou vis-à-vis d'organes du système immunitaire, tel que le thymus (Zolnik et al., 2010)

1.3.4.2. Toxicité pour la reproduction

La possibilité d'un passage transplacentaire a été démontrée pour certains nanomatériaux dans quelques études. Notamment, des nanoparticules de silice (70 nm) et de TiO₂ (35 nm) administrées par voie intra-veineuse chez des souris gestantes ont été retrouvées dans le placenta ainsi que dans le foie et le cerveau des fœtus (Yamashita et al., 2011). Une autre étude chez la souris a montré que l'exposition maternelle à des nanoparticules de TiO₂ pourrait affecter l'expression de gènes impliqués dans le développement du système nerveux central (Shimizu et al., 2009). Dans une étude *ex vivo* sur des placentas humains perfusés, des nanoparticules de polystyrènes étaient capables de passer la barrière placentaire (Wick et al., 2010).

D'autres études ont montré que des nanomatériaux étaient capables de traverser la barrière hémato-testiculaire. Par exemple, des nanoparticules de TiO₂ pouvaient s'accumuler dans les testicules de souris et entraîner des malformations des spermatozoïdes (Gao et al., 2013). Chez des rats mâles prépubères, l'exposition à des nanoparticules d'argent par voie orale a induit un retard d'apparition de la puberté, ainsi que des anomalies des spermatozoïdes (Mathias et al., 2014).

Certains de ces résultats sont associés à l'utilisation de doses importantes, mais posent néanmoins la question de la toxicité des nanomatériaux pour la reproduction (Anses, 2014).

1.3.4.3. Toxicité cardio-vasculaire

Le risque spécifique aux nanomatériaux vis-à-vis du système cardiovasculaire consiste en des phénomènes thrombo-emboliques, liés à la formation d'agrégats en présence des protéines plasmatiques. Ce risque a été identifié dès l'utilisation des premiers médicaments sous forme nanoparticulaire et peut affecter diverses régions de l'organisme, notamment au niveau des plus petits vaisseaux, tels que la microcirculation périphérique et les vaisseaux cérébraux (Afsaps, 2011).

1.4. Caractérisation physico-chimique des nanomatériaux

1.4.1. Importance de la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux pour les essais de toxicité

Les caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux, notamment la taille et les propriétés de surface, sont des paramètres influençant directement leur interaction avec l'organisme et donc leur toxicité. En fonction de leur taille, les nanomatériaux sont distribués différemment dans l'organisme, notamment concernant les organes correspondant aux voies d'entrée dans l'organisme, telles que les voies respiratoires, et la translocation dans les organes secondaires. Les études de toxicologie *in vitro* sont également sensibles aux paramètres physico-chimiques des nanomatériaux, puisqu'ils sont internalisés dans les cellules de manière plus ou moins importante en fonction de leurs différentes propriétés physico-chimiques (Figure 5). Ces caractéristiques sont susceptibles d'être modifiées en fonction de l'état des nanomatériaux (sous forme de poudre ou en suspension) et des propriétés du milieu lorsqu'ils sont en suspension. Ainsi la présence de sérum dans le milieu peut modifier l'état d'agrégation des nanomatériaux (Murdock et al., 2008). La caractérisation physico-chimique des nanomatériaux dans le milieu utilisé constitue donc une étape essentielle préalable aux essais de toxicité : en l'absence de ces éléments, les résultats des études de toxicité n'ont qu'un intérêt limité, et la comparaison avec d'autres études sur des nanomatériaux semblables est difficile (Bouwmeester et al., 2011; Fubini et al., 2010; Warheit, 2008). La Figure 7 présente à titre d'exemple les différents paramètres physicochimiques étudiés dans le projet européen Nanogenotox et les méthodes de caractérisation mises en œuvre. Les principaux paramètres influençant la toxicité des nanomatériaux, identifiés dans plusieurs revues (Fubini et al., 2010; Pettitt and Lead, 2013; Warheit, 2008) et groupes de travail (OCDE, 2012), ainsi que des exemples de méthodes de mesure pour chacun d'entre eux sont présentés ci-dessous.

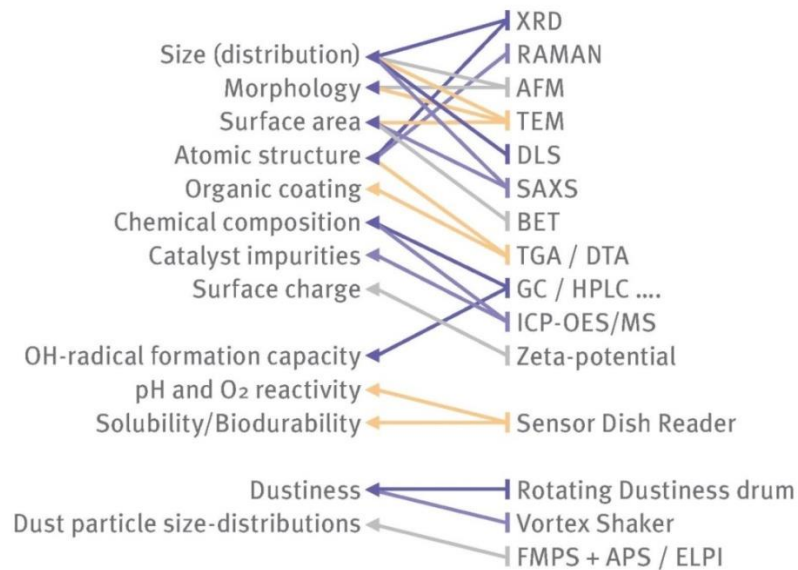


Figure 7 : Caractéristiques physico-chimiques étudiées dans le projet européen Nanogénotox et méthodes utilisées (Nanogénotox, 2013).

1.4.1.1. Taille et distribution de taille

La mesure de la taille des particules primaires concerne les nanomatériaux à l'état de poudre ou en suspension dans un milieu liquide. En effet, les nanomatériaux interagissent avec le milieu, pouvant entraîner une agglomération/agrégation ou au contraire une dispersion des agglomérats/agrégats. Une dissolution des nanomatériaux ou l'adsorption de composés du milieu sur les nanomatériaux peuvent également avoir lieu (OCDE, 2012).

La mesure de la taille des particules primaires pour les nanomatériaux sous forme de poudre peut être effectuée notamment par l'une des méthodes suivantes : microscopie électronique à transmission (MET) ou à balayage (MEB), microscopie à force atomique (AFM). L'analyse de la taille des nanomatériaux en suspension dans un milieu liquide peut être effectuée avec les mêmes méthodes, mais également par diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering) ou par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, Small Angle X-ray Scattering).

La taille d'une particule mesurée avec une méthode donnée peut différer de celle obtenue avec une autre méthode. En effet, la DLS donne une valeur de diamètre hydrodynamique, c'est-à-dire le diamètre de la particule et de sa couche de solvatation, alors que les techniques de microscopie donnent une valeur correspondant au diamètre

de la particule seule. L'utilisation de plusieurs méthodes de mesure peut donc permettre l'obtention de résultats complémentaires.

Lorsqu'un échantillon contient des nanomatériaux de tailles différentes, il est utile de mesurer la distribution de taille des particules afin d'obtenir une donnée représentative de l'échantillon.

1.4.1.2. Etat d'agglomération ou d'agrégation

Les suspensions de nanomatériaux peuvent être composées de nanomatériaux isolés, d'agglomérats, d'agrégats ou d'un mélange de ces différents états de dispersion. Les agglomérats sont des ensembles de particules primaires liées par des forces interparticulaires, notamment des interactions de Van der Waals. L'agglomération est un phénomène réversible, en fonction des caractéristiques du milieu. Au contraire, l'agrégation est un processus irréversible au cours duquel les nanoparticules sont liées entre elles par de fortes liaisons chimiques, telles que des liaisons covalentes ou des interactions électrostatiques. L'analyse de l'état de dispersion des suspensions de nanomatériaux peut être effectuée par microscopie électronique à transmission (MET) ou à balayage (MEB) (Bouwmeester et al., 2011). Les agglomérats/agrégats de taille supérieure à 1 µm peuvent être identifiés par diffraction laser.

1.4.1.3. Surface spécifique

La réactivité chimique d'une particule dépend de sa surface. La surface spécifique est inversement proportionnelle à la taille, et correspond à la surface d'un matériau accessible lorsqu'il est exposé à un absorbant gazeux ou liquide, généralement normalisé par rapport à la masse de l'échantillon. Ce paramètre est généralement étudié par la méthode Brunauer, Emmet et Teller (BET), qui consiste en une mesure de l'adsorption d'une monocouche d'un gaz inerte à la surface d'un solide (OCDE, 2012).

1.4.1.4. Forme

La forme des nanomatériaux influence leur internalisation cellulaire, ainsi des nanoparticules sphériques présentent une internalisation supérieure à celle de nanomatériaux en forme de bâtonnets (Fubini et al., 2010). Par ailleurs, les nanomatériaux possédant un ratio longueur/épaisseur élevé, appelés HARN pour « High

aspect ratio nanostructures » ont attiré l'attention, du fait de leur ressemblance morphologique avec les fibres telles que l'amiante (Bouwmeester et al., 2011; Pettitt and Lead, 2013). Il s'agit notamment des nanotubes de carbone. La détermination de la forme d'un nanomatériau peut être effectuée par des techniques de microscopie électronique, telles que la MET ou la MEB.

1.4.1.5. Structure cristalline

La structure cristalline des nanomatériaux, notamment pour la silice ou le titane, peut influencer leur toxicité. Par exemple, les nanoparticules de TiO₂ peuvent avoir une structure cristalline de type anatase, rutile ou brookite, chacune possédant des propriétés et réactivités différentes. La structure cristalline peut être étudiée par diffraction des rayons X (DRX).

1.4.1.6. Charge de surface ou potentiel zêta

La charge de surface des nanomatériaux joue également rôle dans leur toxicité, favorisant souvent l'internalisation cellulaire des nanomatériaux chargés positivement, du fait de la charge négative des membranes cellulaires. Elle est évaluée par le potentiel zêta (cf. partie 1.4.2.3).

1.4.1.7. Composition chimique / revêtement de surface

La description de la composition chimique des nanomatériaux concerne le cœur ainsi que la surface des nanomatériaux, notamment les éventuels revêtements et modifications de surface. Parmi les méthodes pouvant être utilisées, la spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS), la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ont été mises en œuvre dans le projet Nanogénotox (Nanogenotox, 2013)

1.4.1.8. Pureté

Des impuretés liées à la méthode de fabrication des nanomatériaux peuvent être contenus dans les nanomatériaux, notamment des résidus métalliques. Par ailleurs,

certains nanomatériaux peuvent adsorber à leur surface des composés chimiques présents dans l'environnement, parfois toxiques. On parle d'un effet « cheval de Troie » des nanomatériaux. Le fait d'être adsorbés sur des nanomatériaux peut augmenter l'absorption de ces composés dans l'organisme, notamment par voie respiratoire.

1.4.2. Exemples de méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux

La caractérisation des différents paramètres physico-chimiques des nanomatériaux requiert des équipements spécifiques et complexes, ainsi seuls ceux ayant été mis en œuvre dans ce travail de recherche seront développés ci-dessous.

1.4.2.1. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering, DLS), également appelée diffusion quasi-élastique de la lumière ou spectroscopie par corrélation de photons, permet la mesure du diamètre hydrodynamique de nanomatériaux isolés, d'agglomérats ou d'agrégats en suspension, de 1 nm à 6 μm environ. Les particules en suspensions sont soumises à un mouvement constant appelé mouvement Brownien, lié à la collision aléatoire avec les molécules entourant les particules.

Lors d'une mesure de DLS, la suspension est traversée par un faisceau laser. Les particules dispersent la lumière dans toutes les directions. On mesure alors la fluctuation de l'intensité du faisceau diffusé, lié au mouvement Brownien des particules. La vitesse des particules est corrélée à leur taille par la relation de Stokes-Einstein, les plus petites particules bougeant plus vite alors que les grosses particules bougent plus lentement (Figure 8).

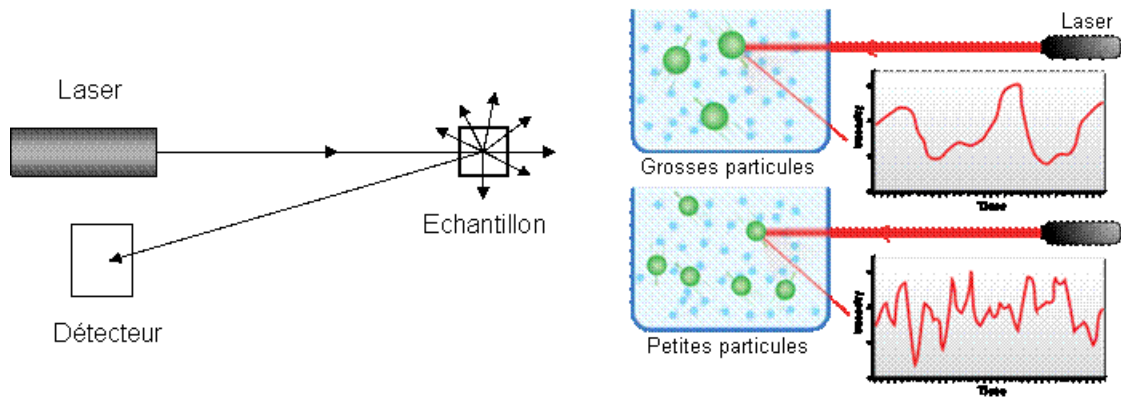


Figure 8 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS)

1.4.2.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

Cette technique possède de nombreux intérêts pour l'étude des nanomatériaux. Elle permet en effet de caractériser des nanomatériaux sous forme de poudre ou de suspensions dans différents milieux, permettant une analyse de la taille, de la forme ainsi que de l'état d'agglomération des nanomatériaux. En présence de cellules, la MET permet d'étudier l'internalisation des nanomatériaux dans les cellules, voire une étude de la distribution dans les différents organites cellulaires.

- Principe de la MET

La MET utilise les propriétés ondulatoires des électrons, permettant la génération d'un faisceau d'électrons qui interagit avec l'échantillon. Le faisceau d'électrons est transmis à travers l'échantillon puis dispersé et détecté sur un écran. L'utilisation d'électrons, qui possèdent une longueur d'onde plus courte que les photons utilisés en microscopie optique, permet d'obtenir un grandissement plus important et d'observer notamment les organites cellulaires, des protéines ou encore des nanomatériaux.

- Etude des suspensions de nanomatériaux

Les suspensions de nanomatériaux sont déposées sur une grille. L'observation est effectuée après séchage et permet l'étude de l'état d'agglomération des nanomatériaux. Une mesure de taille est possible par un système d'analyse d'image, permettant une analyse de la dispersion de taille. Au contraire de la taille obtenue par DLS qui correspond au diamètre hydrodynamique et prend en compte les éventuelles protéines

en surface des nanomatériaux, la taille mesurée à partir des images de MET correspond à la taille des nanomatériaux seuls.

- Etude de l'internalisation cellulaire des nanomatériaux

Après exposition avec les nanomatériaux, les cellules sont fixées puis incluses dans une résine, dans laquelle des coupes ultrafines de 80 à 100 nm d'épaisseur sont effectuées. Les coupes sont ensuite contrastées, et l'observation au microscope électronique permet d'étudier la présence des nanomatériaux dans les différents organites cellulaires.

1.4.2.3. Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta représente la charge de surface qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution. Lorsqu'une particule chargée est mise en solution, des ions de charge opposée vont être attirés à sa surface. Ces ions les plus proches de la particule forment la couche de Stern, les ions plus éloignés et moins fortement liés forment la couche diffuse. La particule modifie donc la distribution des ions, et est entourée par une couche ionique différente du reste de la solution, qui bouge avec la particule (couche de Stern et une partie de la couche diffuse). Le potentiel zêta correspond à la mesure du potentiel à l'interface entre cette couche et le reste de la solution, appelé plan de cisaillement (Figure 9).

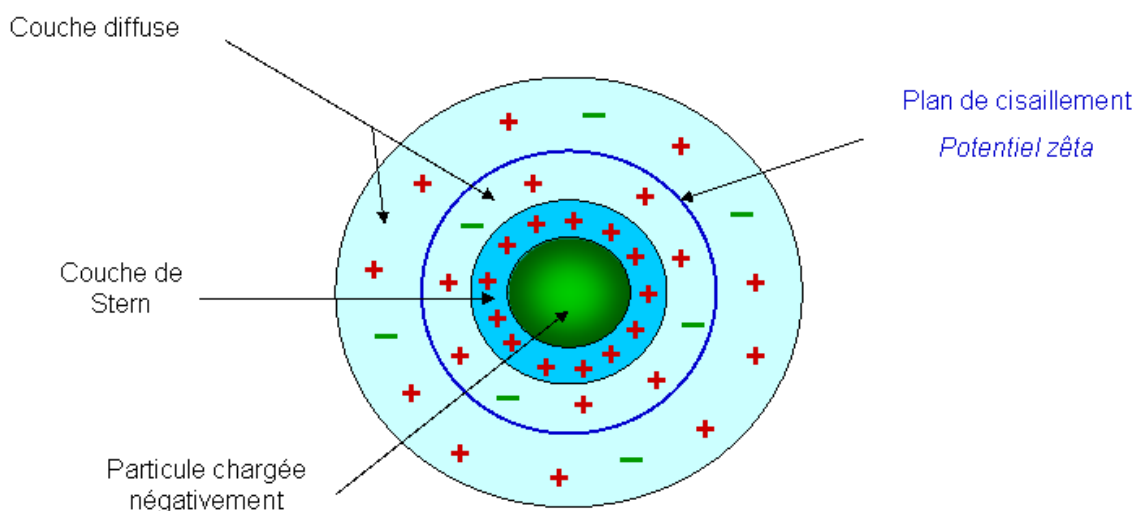


Figure 9 : Représentation schématique du potentiel zêta

Lorsqu'un champ électrique est appliqué à travers la suspension, les particules chargées migrent vers l'électrode de charge opposée avec une vitesse proportionnelle à l'intensité de leur potentiel zêta (Figure 10). On obtient alors une mesure de mobilité électrophorétique, qui est convertie en potentiel zêta en intégrant la viscosité du solvant.

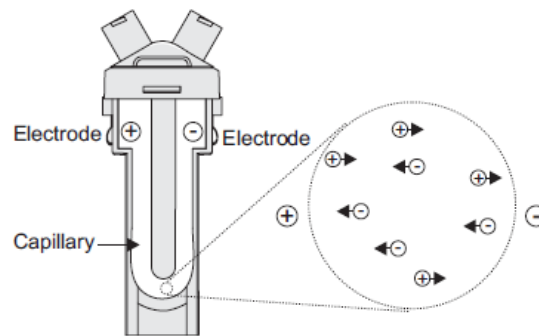


Figure 10 : Principe de la mesure du potentiel zêta (Malvern Instruments).

Pour les particules de taille et de densité suffisamment faibles pour rester en suspension, un potentiel zêta de valeur absolue élevée est signe d'une bonne stabilité de la suspension, les particules ayant tendance à se repousser ne vont donc pas s'agréger. Il est généralement considéré qu'une suspension est stable lorsque la valeur absolue de son potentiel zêta est supérieure à 30 mV. Le principal paramètre influençant la valeur du potentiel zêta est le pH : en milieu basique, les particules ont tendance à acquérir une charge plus négative, et inversement une charge plus positive en milieu acide.

CHAPITRE 2. Génotoxicité des nanomatériaux

Dans la première partie de ce chapitre, les différents mécanismes par lesquels les nanomatériaux peuvent entraîner une génotoxicité seront détaillés. Puis, les principaux tests de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* seront présentés, suivant une classification en fonction des évènements génotoxiques étudiés : lésions primaires de l'ADN, mutations géniques et dommages chromosomiques. Nous étudierons l'utilisation de chacun de ces tests pour l'évaluation des nanomatériaux dans la littérature, et essaierons de conclure sur la possibilité de les utiliser tels quels ou avec des modifications de protocole ou sur leur inadaptation pour l'évaluation des nanomatériaux. L'intérêt de la validation de nanomatériaux comme témoins positifs de référence dans les essais de génotoxicité sera ensuite abordé. Enfin, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'évaluation de la génotoxicité des nanomédicaments, que nous comparerons avec la réglementation en vigueur pour les médicaments classiques.

2.1. Mécanismes de génotoxicité des nanomatériaux

Les nanomatériaux peuvent induire une génotoxicité en absence d'inflammation par des mécanismes dits primaires. Cette génotoxicité peut être exercée par les nanomatériaux eux-mêmes, par des espèces réactives de l'oxygène (ERO) présentes à leur surface ou produites par les organites cellulaires tels que les mitochondries, ou par des ions toxiques libérés par certains nanomatériaux métalliques. Lorsque cette génotoxicité est liée à une inflammation, les mécanismes sont dits secondaires (Donaldson et al., 2010; Magdolenova et al., 2014; Singh et al., 2009).

2.1.1. Mécanismes primaires

2.1.1.1. Interactions avec l'ADN

En fonction de leurs caractéristiques, notamment de taille et de surface, certains nanomatériaux ont la capacité de pénétrer dans le noyau par les pores nucléaires ou par diffusion à travers la membrane nucléaire (Donaldson et al., 2010; Magdolenova et al., 2014; Singh et al., 2009). Les nanomatériaux peuvent également être internalisés dans le noyau lors de la mitose, lorsque la membrane nucléaire disparaît puis se reforme dans chaque cellule fille (Singh et al., 2009). Les nanomatériaux peuvent donc interagir directement avec les molécules d'ADN à différentes phases du cycle cellulaire, pendant l'interphase pour les nanomatériaux présents à l'intérieur du noyau, ou pendant la mitose lorsque l'ADN n'est plus protégé par la membrane nucléaire. Cette interaction peut mettre en cause les nanomatériaux eux-mêmes mais aussi des ERO générées à leur surface (Donaldson et al., 2010).

2.1.1.2. Interactions avec d'autres constituants cellulaires

- Interaction mécanique avec des constituants cellulaires

Il est généralement considéré que les nanomatériaux pourraient interagir avec des constituants cellulaires de dimensions comparables, tels que les microtubules (25 nm de diamètre) ou les filaments d'actine (7 nm de diamètre) et perturber le processus de division cellulaire (Gonzalez et al., 2008). Une interaction avec les filaments d'actine pourrait perturber la cytokinèse. Une interférence avec les microtubules et/ou les kinétochores pourrait entraîner une mauvaise ségrégation des chromatides. Ces interactions des nanomatériaux avec le fuseau mitotique ou des protéines associées

peuvent donc induire une anomalie du nombre de chromosomes, ou aneuploïdie (Gonzalez et al., 2008).

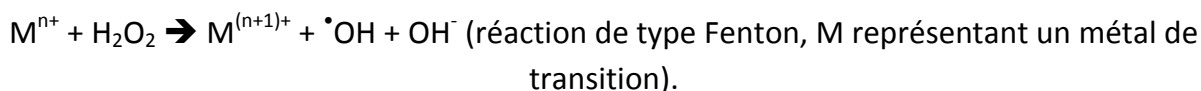
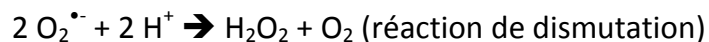
- Interaction des nanomatériaux avec des protéines

Des perturbations du cycle cellulaire peuvent également être induites par l'interaction de nanomatériaux avec des protéines kinases responsables de la régulation des événements du cycle cellulaire, tels que la réplication de l'ADN et la division cellulaire (Magdolenova et al., 2014). Certains nanomatériaux peuvent aussi interagir avec des protéines nucléaires impliquées dans la réplication ou la transcription de l'ADN, perturbant ainsi ces processus (Magdolenova et al., 2014).

Une génotoxicité indirecte peut également résulter d'une inhibition de la réparation de l'ADN (Donaldson et al., 2010). Ce mécanisme a été démontré pour plusieurs ions métalliques notamment par inactivation de protéines spécifiques de la réparation de l'ADN (Beyersmann and Hartwig, 2008). Ceci pourrait donc également être le cas notamment pour des nanomatériaux métalliques, du fait de leur plus grande affinité et réactivité vis-à-vis des protéines cellulaires (Donaldson et al., 2010).

2.1.1.3. Implication d'espèces réactives de l'oxygène

Plusieurs mécanismes sont susceptibles d'entraîner une augmentation des ERO intracellulaires par les nanomatériaux (Figure 11), induisant ainsi un stress oxydant, caractérisé par un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes des cellules. Des ERO peuvent ainsi être générées de manière intrinsèque à la surface de certains nanomatériaux. Des nanomatériaux peuvent également entraîner la production d'ERO suite à leur interaction avec des organites cellulaires tels que les mitochondries (Donaldson et al., 2010; Magdolenova et al., 2014). Ainsi du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pourrait être formé spontanément ou par des mécanismes enzymatiques par dismutation d'ions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) provenant notamment de la chaîne respiratoire ou de mécanismes enzymatiques, puis converti en radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) par des réactions de type Fenton (Donaldson et al., 2010). Ces réactions pourraient être facilitées dans le cas de certains nanomatériaux métalliques solubles ou en partie solubles pouvant libérer des métaux de transition tels que le fer, le chrome, le cobalt, le zinc, le cuivre ou le nickel, pouvant contribuer à la production de radicaux $\bullet OH$ par des réactions de type Fenton (Beyersmann and Hartwig, 2008; Magdolenova et al., 2014; Singh et al., 2009) :



H_2O_2 peut diffuser à travers les membranes cellulaire et nucléaire et réagir avec le fer lié à l'ADN générant des radicaux $\bullet\text{OH}$ à proximité de l'ADN (Singh et al., 2009)

Certains nanomatériaux peuvent également induire une diminution des défenses anti-oxydantes cellulaires (ex : déplétion en glutathion, inhibition d'enzymes anti-oxydantes), perturbant l'équilibre redox cellulaire et résultant en l'accumulation d'ERO endogènes (Donaldson et al., 2010; Magdolenova et al., 2014).

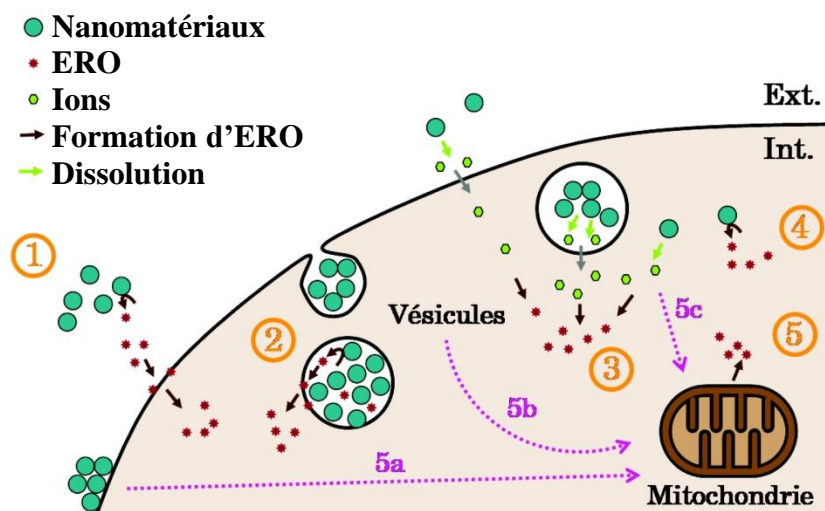


Figure 11 : Différents mécanismes pouvant entraîner la formation d'ERO intracellulaires par les nanomatériaux. 1 : via la formation d'ERO extracellulaires ; 2 : via la formation d'ERO dans les vésicules ; 3 : par l'intermédiaire de la dissolution des nanomatériaux ; 4 : directement par les nanomatériaux libres dans le cytoplasme ; 5 : Formation d'ERO par les mitochondries en réponse à l'interaction cellulaire avec les nanomatériaux. D'après Simon-Deckers (2008).

Les ERO, notamment le radical $\bullet\text{OH}$, très réactif, peuvent attaquer les protéines, les lipides et l'ADN. Dans ce dernier cas, les ERO peuvent induire un large spectre de lésions, représentées dans la Figure 12. L'attaque directe des ERO sur les bases peut entraîner des lésions des bases puriques et pyrimidiques, pouvant former de nombreuses bases oxydées (Cooke et al., 2003; Evans et al., 2004). Notamment, l'oxydation de la guanine conduit à la formation de 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-Gua ou 8-OH-Gua) ou d'un résidu formamidopyrimidique, la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Fapy-Gua). D'une façon similaire, l'oxydation de l'adénine forme

la 8-hydroxyadénine (8-OH-Ade) et la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (Fapy-Ade). L'oxydation des pyrimidines entraîne principalement la formation de cytosine glycol et de thymine glycol.

L'attaque des ERO sur le désoxyribose peut entraîner la formation de sucres modifiés, une perte de base résultant en la formation d'un site abasique ou apurique/aprimidique (AP), ou encore une cassure de brin d'ADN (Evans et al., 2004).

Par ailleurs, des lésions de l'ADN peuvent résulter de l'attaque des ERO sur les lipides ou les protéines. En effet, des éthéno-adduits peuvent être formés à partir des produits de la peroxydation lipidique (malone dialdéhyde, 4-hydroxynonanal), et des pontages ADN-protéines peuvent être générés à partir des protéines entourant l'ADN (histones, enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription) (Favier, 2003).

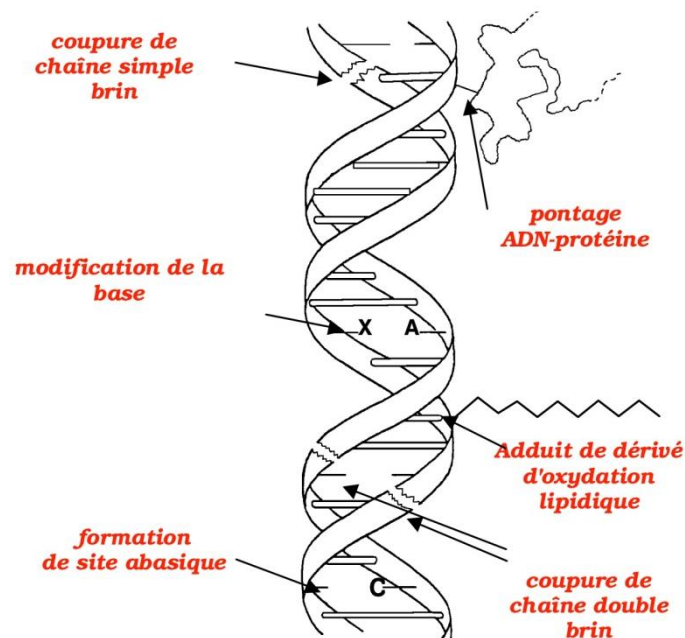


Figure 12 : Les différentes lésions oxydatives de l'ADN. D'après Favier (2003).

2.1.2. Mécanismes secondaires

La génotoxicité secondaire est également liée au stress oxydant, mais par l'intermédiaire de cellules du système immunitaire recrutées lors de l'inflammation (Donaldson et al., 2010; Manke et al., 2013; Singh et al., 2009). En effet, certains nanomatériaux peuvent constituer des stimuli induisant une réaction inflammatoire et l'activation des phagocytes (macrophages et polynucléaires neutrophiles) puis entraîner

une production d'ERO ou d'espèces réactives de l'azote (ERN) par différents systèmes enzymatiques. La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase transfère des électrons du NADPH à l' O_2 conduisant à la formation d'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Une seconde enzyme, la superoxyde dismutase, convertit $O_2^{\bullet-}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut ensuite être converti par la myéloperoxydase (MPO) en acide hypochlorique (HOCl). Par l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS), les phagocytes peuvent également produire des ERN, notamment l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Manke et al., 2013).

Ces ERO et ERN générés dans un premier temps comme mécanismes de défense peuvent dans le cas d'une inflammation chronique induire des dommages oxydatifs dans les cellules voisines, en particulier au niveau génétique (Donaldson et al., 2010).

Un phénomène d'inflammation peut également être déclenché par la production d'ERO suite à l'interaction des nanomatériaux avec des cellules par des mécanismes décrits ci-dessus (paragraphe 2.1.1.3). En réponse au stress oxydant, des voies de signalisation telles que les MAP kinases (Mitogen-activated protein kinases) et NF- κ B (nuclear factor-kappa B) peuvent être activées et conduire à la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-8, TNF- α) et finalement au déclenchement d'une inflammation et à la production de davantage d'ERO par les cellules inflammatoires, générant un cercle vicieux (Manke et al., 2013; Singh et al., 2009).

2.2. Les principaux tests de génotoxicité et leur adéquation pour l'évaluation des nanomatériaux

2.2.1. Dommages primaires à l'ADN

2.2.1.1. Test des comètes

Rydberg et Johanson en 1978 ont été les premiers à décrire une méthode permettant de quantifier les dommages à l'ADN dans des cellules individualisées incluses dans un gel d'agarose. Le protocole a par la suite subi plusieurs modifications permettant d'améliorer la sensibilité du test, ou de détecter des lésions spécifiques telles que les lésions oxydatives.

Le test des comètes peut être réalisé *in vitro* après traitement de lignées cellulaires ou de cultures primaires, ou *in vivo* après traitement des animaux et isolement des cellules à partir de différents organes. Une ligne directrice OCDE est actuellement en préparation pour le test des comètes *in vivo* (OCDE, 2013a).

- Test standard

Le test des comètes consiste en une électrophorèse de noyaux cellulaires inclus dans un gel d'agarose. Le protocole décrit par Singh et al. (1988) avec une électrophorèse en conditions alcalines (pH>13) permet la détection du plus grand nombre de lésions (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000) :

- cassures simple-brin, résultants d'interactions directes avec l'ADN ou liées au système de réparation de l'ADN par excision de nucléotide
- cassures double-brin, occasionnées par des rayonnements ionisants ou consécutives à la réparation de cassures simple-brin
- sites alcali-labiles tels que les sites apuriques et apyrimidiques et les phosphotriesters.

Les pontages ADN-ADN et ADN-protéines peuvent également être identifiés, mais une adaptation du protocole est alors nécessaire, permettant d'observer une diminution de la migration d'ADN par rapport au témoin négatif, en prolongeant l'électrophorèse.

Les cellules individualisées sont incluses dans un gel d'agarose et déposées sur une lame de microscope. Une étape de lyse permet d'éliminer les membranes cellulaires

puis l'incubation dans un tampon alcalin ($\text{pH} > 13$) entraîne le déroulement de l'ADN. Un champ électrique est ensuite appliqué, entraînant la migration de l'ADN chargé négativement vers l'anode. Sous l'effet du champ électrique, la migration des petits fragments d'ADN va être plus importante que celle de l'ADN intact. Après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium par exemple, et observation au microscope à fluorescence, les noyaux non endommagés composés de molécules d'ADN intactes forment des sphères compactes, alors que les noyaux endommagés apparaissent sous forme de comètes, les fragments d'ADN migrant vers l'anode constituant la queue de la comète (Figure 13). Une quantification de la fragmentation de l'ADN peut être obtenue grâce à un logiciel d'analyse d'image. Plusieurs paramètres peuvent être utilisés pour évaluer la fragmentation de l'ADN, notamment le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète, que nous avons utilisé dans nos travaux expérimentaux.

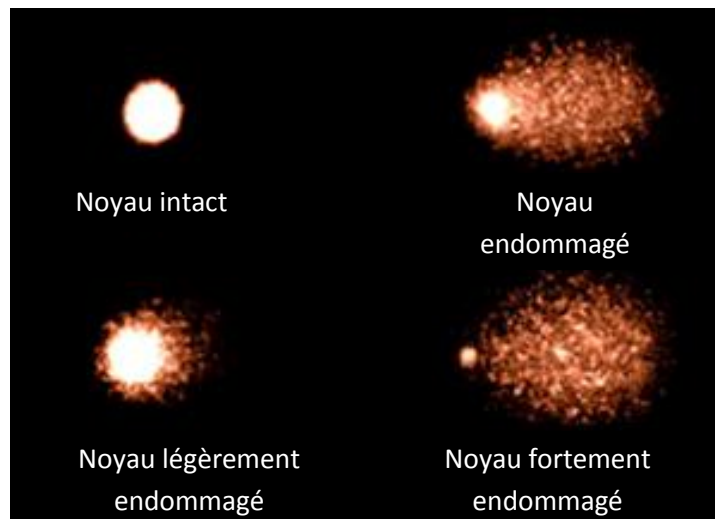


Figure 13 : Aspects des comètes en fonction de l'importance de la fragmentation de l'ADN.

- *Test modifié pour la détection des lésions oxydatives*

La modification du protocole standard en incluant une étape de digestion de l'ADN par une endonucléase après la lyse des membranes cellulaires permet la détection des lésions oxydatives à l'ADN (Collins et al., 1993). Ces enzymes sont impliquées dans la réparation de l'ADN par excision de base, et possèdent une activité glycosylase spécifique, excisant la base endommagée et créant un site apurique/apyrimidique (AP), et une activité AP-lyase, qui convertit le site abasique en cassure simple brin (Collins, 2014). Une augmentation de la fragmentation de l'ADN après incubation avec l'enzyme en comparaison avec celle observée sans enzyme indique donc la présence de bases

oxydées. Trois enzymes sont particulièrement utilisées pour l'étude des lésions oxydatives, chacune possédant une spécificité de substrats qui lui est propre : la formamidopyrimidine ADN N-glycosylase (FPG), la 8-oxo-guanine glycosylase 1 humaine (hOGG1) et l'endonucléase III (Endo III ou Nth).

La protéine Endo III est une ADN glycosylase identifiée chez *Escherichia coli*, possédant de très nombreux substrats. Elle reconnaît de nombreuses lésions de bases pyrimidiques, dont des pyrimidines oxydées, notamment la thymine glycol et l'uracile glycol, ainsi que la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (Fapy-Ade) (Dizdaroglu, 2005).

L'enzyme FPG est également une ADN glycosylase présente dans les bactéries *Escherichia coli*. Elle détecte des bases oxydées, telles que la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-Gua ou 8-OH-Gua) et les formamidopyrimidines dérivées de l'adénine (Fapy-Ade) et de la guanine (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, Fapy-Gua). La FPG excise également la 8-hydroxyadénine (8-OH-Ade), la 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-méthylformamidopyrimidine (méthyl-Fapy-Gua), produit de la méthylation de l'adénine, et des lésions de bases pyrimidiques comme la 5-hydroxycytosine (5-OH-Cyt) et la 5-hydroxyuracil (5-OH-Ura). Elle détecte également des lésions liées à l'alkylation, par exemple les N7-alkylguanines (Collins, 2009; Dizdaroglu, 2005; Speit et al., 2004).

L'enzyme hOGG1 est l'homologue humaine de la FPG, et reconnaît spécifiquement la 8-oxoGua et la méthyl-Fapy-Gua (Smith et al., 2006). hOGG1 ne détecte pas les dommages liés à l'alkylation ni les sites apuriques ou apyrimidiques (AP) produits spontanément à partir des guanines méthylées, et semble donc être l'enzyme la plus spécifique pour la détection des dommages oxydatifs à l'ADN.

- *Utilisation du test des comètes pour l'évaluation des nanomatériaux*

Le test des comètes est l'un des tests de génotoxicité les plus utilisés pour l'évaluation de la génotoxicité des nanomatériaux. Une revue publiée en 2013 référence ainsi 67 études sur les nanomatériaux utilisant le test des comètes avec un protocole standard ou modifié avec des enzymes de réparation de l'ADN pour la détection notamment des lésions oxydatives (Magdolenova et al., 2014). L'utilisation d'enzymes permettant la détection des lésions oxydatives de l'ADN présente d'ailleurs un intérêt certain, les mécanismes oxydants étant fréquemment décrits pour les nanomatériaux.

Toutefois des risques d'interactions avec les nanomatériaux ont été suggérés pour le test des comètes. Ainsi, la présence de nanomatériaux dans le gel d'agarose à proximité de l'ADN pourrait induire des dommages additionnels pendant le test, donnant lieu à une surestimation des dommages induits par certains nanomatériaux

(Magdolenova et al., 2014). Une interaction entre certains nanomatériaux et les composés fluorescents utilisés pour marquer l'ADN pourrait également être possible.

Par ailleurs, Kain et al (2012) ont mis en évidence que la présence de nanomatériaux dans l'agarose pouvait également entraîner une diminution de l'activité des enzymes utilisées pour la détection des lésions oxydatives de l'ADN, telles que la FPG. Leurs travaux ont confirmé que certains nanomatériaux, ou des ions libérés par les nanomatériaux, notamment des nanoparticules d'argent, étaient capables de diminuer l'activité de la FPG, probablement par une interaction avec la structure en doigt de zinc de l'enzyme. Ce type d'interaction est donc susceptible de résulter en une sous-estimation des dommages oxydatifs à l'ADN induits par certains nanomatériaux.

2.2.1.2. Détection des foyers γ -H2AX

Ce test permet la détection des cassures double-brin de l'ADN, induites directement ou consécutivement à une autre lésion de l'ADN (Takahashi and Ohnishi, 2005). En réponse aux cassures double-brin de l'ADN, l'histone H2AX est phosphorylée au niveau de la sérine 139 de son extrémité C-terminale (Rogakou et al., 1998). La forme phosphorylée de H2AX, appelée γ -H2AX peut être utilisée comme marqueur de génotoxicité, à l'aide d'anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de γ -H2AX. L'histone phosphorylée γ -H2AX forme des foyers dans le noyau qui peuvent être visualisés après marquage par microscopie, avec une corrélation entre le nombre de foyers γ -H2AX et le nombre de cassures double-brin (Rogakou et al., 1999). La phosphorylation de H2AX peut être détectée par immunocytochimie, cytométrie en flux ou Western blot (Takahashi and Ohnishi, 2005).

- Utilisation pour l'évaluation des nanomatériaux

Le test de détection des foyers γ -H2AX a été utilisé dans quelques études portant sur des nanomatériaux (Magdolenova et al., 2014), et a donné des résultats positifs pour des nanoparticules de TiO₂ (Toyooka et al., 2012; Trouiller et al., 2009), de SiO₂ (Sergent et al., 2012) et des nanotubes de carbone (Guo et al., 2011). Des résultats négatifs ont été obtenus avec des nanodiamants (Paget et al., 2013). Aucune de ces études n'a rapporté d'interactions des nanomatériaux avec le protocole expérimental.

2.2.2. Mutations géniques

2.2.2.1. Essai de mutation réverse sur bactéries (Test d'Ames)

Le test d'Ames est un test de mutagenèse sur cellules procaryotes décrit dans les années 1970 par Bruce Ames (Ames, 1973), permettant de mettre en évidence des mutations ponctuelles résultant de la substitution, de l'addition ou de la délétion d'une plusieurs paires de bases. Il fait l'objet de la ligne directrice n°471 de l'OCDE (1997). Les produits mutagènes sont mis en évidence par les mutations réverses qu'ils induisent dans des souches bactériennes auxotrophes pour un acide-aminé. Il s'agit généralement de souches de *Salmonella typhimurium* auxotrophes pour l'histidine. Ces bactéries présentent en effet une mutation au niveau d'un gène responsable de la synthèse de l'histidine, ce qui les rend incapables de synthétiser l'histidine et dépendantes d'un apport extérieur en histidine. L'exposition des bactéries à un produit mutagène provoque la formation de bactéries mutées prototrophes capables de synthétiser l'histidine et capables de se développer dans un milieu sélectif pauvre en histidine. L'augmentation par rapport au taux spontané du nombre de révertants en présence du produit à étudier dans le milieu sélectif est donc une indication de l'activité mutagène. Les différentes souches de *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100 ou TA102) ou d'*Escherichia coli* (dans ce cas auxotrophes pour le tryptophane) utilisées permettent de mettre en évidence plusieurs types de mutations tels que des substitutions de paires de bases et des décalages du cadre de lecture.

- Utilisation pour l'évaluation des nanomatériaux

Le test d'Ames a été utilisé dans plusieurs études portant sur divers nanomatériaux, mais les résultats obtenus étaient généralement négatifs, alors que ces nanomatériaux induisaient des réponses positives dans d'autres tests de génotoxicité (Doak et al., 2012; Magdolenova et al., 2014). La principale explication consiste en l'absence d'internalisation des nanomatériaux par les bactéries, liée à une incapacité d'endocytose par les bactéries ainsi qu'à l'imperméabilité de la paroi bactérienne vis-à-vis de la diffusion des nanomatériaux. De plus, les phénomènes aneugènes ne sont pas détectables chez es bactéries. Le test d'Ames ne semble donc pas approprié pour l'évaluation des nanomatériaux (Doak et al., 2012).

2.2.2.2. Essai de mutation génique sur cellules de lymphome de souris au locus TK

Il existe plusieurs tests permettant d'évaluer le potentiel mutagène *in vitro* d'un produit sur des cellules de mammifères, décrits dans la ligne directrice de l'OCDE n°476 (OCDE, 1997b). Leur principe repose sur la mise en évidence de mutations induites sur les loci de la thymidine kinase (TK), de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) ou de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XPRT). Ces tests peuvent être réalisés sur plusieurs types cellulaires, comprenant les cellules de lymphome de souris L5178Y, ainsi que les lignées CHO, AS52 et V79 de cellules de hamster chinois et TK6 de cellules lymphoblastoïdes humaines. Nous approfondirons dans la suite de ce paragraphe uniquement le test sur cellules de lymphome de souris L5178Y au locus TK, également appelé test du lymphome de souris (MLA, mouse lymphoma assay), qui a été utilisé dans notre travail de recherche.

Les cellules hétérozygotes pour le gène de la thymidine kinase (L5178Y TK^{+/-}) sont exposées à la substance à étudier. Puis, elles sont remises en culture afin de déterminer le taux de survie des cellules et de permettre l'expression phénotypique de la mutation. Au terme de ce temps d'expression, les cellules sont exposées à la trifluorothymidine (TFT), agent sélectif des cellules mutantes TK^{-/-}. Cet analogue de la thymidine est toxique pour les cellules non mutantes, hétérozygotes TK^{+/-}, dans lesquelles la thymidine kinase phosphoryle la TFT en un dérivé trifluorothymidine monophosphate (TFTMP), qui sera incorporé aux acides nucléiques à la place de la thymidine monophosphate (TMP), provoquant ainsi la mort cellulaire par inhibition de la synthèse d'ADN. En revanche, les cellules mutantes TK^{-/-} qui, par perte de l'enzyme thymidine kinase, ne peuvent pas phosphoryler la TFT en TFTMP deviennent donc capables de survivre et de se multiplier en présence de TFT, formant des colonies. Parmi les mutants TK^{-/-}, deux types de colonies sont observés : des grandes colonies qui ont une vitesse de croissance normale, et des petites colonies qui ont une croissance ralentie. Des études sur la nature moléculaire et cytogénétique de ces deux types de colonies ont montré que les grandes colonies correspondent à des mutations géniques du locus TK (substitutions, délétions de paires de bases), alors que les petites colonies correspondent à des dommages génétiques plus importants se manifestant dans le caryotype et correspondant à des aberrations chromosomiques concernant le chromosome 11, portant le gène TK actif, ou n'importe quel autre chromosome dans une cellule mutante TK^{-/-} (Moore et al., 1985).

- *Utilisation pour l'évaluation des nanomatériaux*

Quelques études utilisant les tests de mutation génique sur cellules de mammifères pour l'évaluation de nanomatériaux ont été publiées. Il s'agit principalement du test au locus HPRT, et les résultats n'étaient pas forcément concordants entre les différentes études, probablement à cause d'une variabilité de caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux (Doak et al., 2012; Wang et al., 2007a, 2007b). Concernant le test au locus TK, une étude a été retrouvée dans la littérature montrant une augmentation de mutants après exposition de cellules de lymphome de souris à des nanoparticules d'argent (Mei et al., 2012).

Ces essais sur cellules de mammifères pourraient donc remplacer le test d'Ames pour l'évaluation des nanomatériaux, toutefois les données disponibles sont encore très limitées (Doak et al., 2012).

2.2.2.3. Essai de mutation génique sur cellules de rongeurs transgéniques

Pour ces essais, on utilise des rats ou des souris transgéniques qui comportent de multiples copies de transgènes incluant un gène rapporteur intégrés dans leur ADN génomique. Après exposition des animaux avec le produit à tester suivie d'une période permettant l'expression d'éventuelles mutations, les tissus d'intérêts sont prélevés. L'ADN génomique est isolé et transféré par l'intermédiaire d'un phage λ ou d'un plasmide dans des bactéries hôtes démunies du gène rapporteur. Le phénotype du gène rapporteur est alors analysé dans les bactéries. Une ligne directrice de l'OCDE n°488 (OCDE, 2013b) est disponible pour un certain nombre d'essais : les souris bactériophage *lacZ* (MutaTMMouse), les souris plasmide *lacZ*, les souris et rats *gpt* delta (*gpt* et Spi-) et les souris et rats *lacI* (Big Blue®). Le paramètre utilisé pour évaluer la mutagenèse est normalement la fréquence des mutants, toutefois une analyse moléculaire des mutations peut fournir des informations supplémentaires.

L'inconvénient majeur des tests de mutations géniques sur rongeurs transgéniques est l'étendue des ressources techniques nécessaires, et la faible disponibilité des animaux transgéniques. Cela conduit à des coûts élevés, et seuls 2 ou 3 centres proposent ces tests en prestation dans le monde (ECHA, 2012).

- *Utilisation pour l'évaluation des nanomatériaux*

Quelques études utilisant des animaux transgéniques sont disponibles sur des nanomatériaux : des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) de 40 nm et des fullerènes C60 induisaient des mutations chez des souris *gpt* delta (Xu et al., 2009) et des nanotubes de carbone à paroi multiples induisaient des mutations dans les poumons de souris *gpt* delta (Kato et al., 2013) alors que des nanoparticules de TiO₂ de 22 nm n'induisaient pas de mutations dans la rate et le foie de souris plasmide *LacZ* (Louro et al., 2014).

2.2.2.4. Test de mutation génique *in vivo* Pig-a

Le gène Pig-a (phosphatidylinositol-glycane classe A) code pour une sous-unité du complexe N-acétylglucosamine transférase, impliquée dans la synthèse de la protéine d'ancrage glycosylphosphatidyl inositol (GPI). De nombreuses protéines exprimées à la surface des cellules eucaryotes sont attachées à la membrane par une protéine d'ancrage GPI. Chez l'homme, le gène PIG-A été mis en évidence lors d'études sur une maladie hématologique, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. Cette maladie est caractérisée par une déficience de la synthèse de la protéine d'ancrage GPI, induisant une déficience en plusieurs protéines de surface, dont certaines impliquées dans la protection des érythrocytes vis-à-vis du complément, conduisant à une hémolyse dépendante du complément. Takeda et al. (1993) ont montré que des mutations de ce gène, localisé sur le chromosome X, étaient associées à la déficience de synthèse de la protéine d'ancrage GPI.

Le test Pig-a est réalisé majoritairement chez des rats ou des souris. Des prélèvements sanguins sont réalisés à différents temps après le traitement et les globules rouges (érythrocytes et réticulocytes) sont marqués avec un anticorps fluorescent, anti-CD59 pour le rat ou anti-CD24 pour la souris. Une mutation du gène Pig-a dans les précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, en induisant une déficience en GPI, entraîne l'absence de protéines normalement fixées au GPI, telles que CD59 ou CD24, à la surface des érythrocytes et des réticulocytes. Après prélèvement sanguin, l'analyse par cytométrie en flux permet de différencier les cellules mutantes non marquées avec l'anticorps anti-CD59 ou anti-CD24, et les cellules non-mutantes marquées avec l'anticorps anti-CD59 ou anti-CD24 (Bryce et al., 2008) (Figure 14).

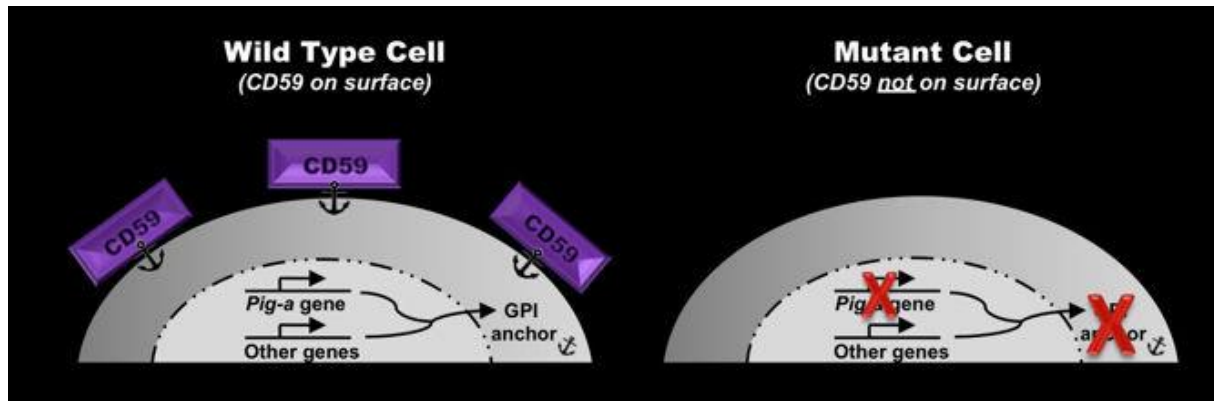


Figure 14 : Principe du test Pig-a (Litron Laboratories⁴).

- Utilisation pour l'évaluation des nanomatériaux

Le test Pig-a a été utilisé dans quelques études pour l'évaluation de nanomatériaux, notamment des nanoparticules d'argent (Li et al., 2013) et de TiO₂ anatase (Sadiq et al., 2012). Bien que l'exposition de la moelle osseuse aux nanomatériaux ait été confirmée par des analyses de microscopie électronique ou par l'observation d'une cytotoxicité sur la moelle osseuse, ces deux études n'ont pas mis en évidence d'augmentation de la fréquence de mutants.

2.2.3. Dommages chromosomiques

2.2.3.1. Essai d'aberrations chromosomiques

L'essai d'aberrations chromosomiques, également appelé test d'analyse de métaphases, peut être effectué *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cultures primaires de cellules, par exemple des lymphocytes humains stimulés avec un agent mitogène tel que la phytohémagglutinine A, ou *in vivo* sur des cellules de moelle osseuse de rongeurs. Les lignes directrices de l'OCDE n°473 (OCDE, 1997c) et n°475 (OCDE, 1997d) sont disponibles respectivement pour les essais *in vitro* et *in vivo*. Il consiste en l'observation d'aberrations chromosomiques structurales et numériques dans des cellules bloquées en métaphase par ajout de colchicine ou de colcémide. Les aberrations de structure peuvent être de type chromatidien ou de type chromosomique, et comportent des lacunes ou gaps, correspondant à une brèche inférieure à la largeur d'une chromatide, des délétions ou des cassures de chromatide ou de chromosome, et

⁴ Litron Laboratories. http://www.litronlabs.com/in_vivo_mutation.html. Consulté le 18.06.2014.

des échanges intra- ou inter-chromosomes. Les aberrations numériques sont représentées par des cellules polyploïdes, contenant des copies multiples d'un nombre haploïde de chromosomes, par exemple 3n ou 4n chromosomes. Certaines cellules peuvent présenter une endoreduplication, consistant en une réduplication des chromosomes se produisant en absence d'une séparation des centromères formant ainsi des diplochromosomes possédant 4 chromatides.

- *Utilisation pour l'évaluation des nanomatériaux*

Quelques études présentant des résultats de tests d'aberrations chromosomiques, principalement *in vitro*, sont disponibles dans la littérature pour des nanomatériaux (Magdolenova et al., 2014). Parmi ces études, certains nanomatériaux induisent des aberrations chromosomiques. Par exemple, des nanoparticules de TiO₂ anatase et des nanotubes de carbone à simple paroi ou à parois multiples ont induit des aberrations de type chromatidiennes et chromosomiques dans des cultures de lymphocytes humains après une exposition de 48h (Catalán et al., 2012). Des aberrations de types chromatidiennes ont également été observées dans des cellules souches mésenchymateuses humaines exposées à des nanoparticules d'argent (Hackenberg et al., 2011). D'un point de vue technique, la présence de nanomatériaux sur les lames peut perturber l'analyse de certaines métaphases (Catalán et al., 2012).

2.2.3.2. Test des micronoyaux

Les premiers micronoyaux, également appelés corps de Howell-Jolly, ont été décrits dans les érythrocytes par Howell et Jolly. L'observation d'une association entre les micronoyaux et l'exposition à des agents environnementaux a ensuite conduit à l'utilisation du test des micronoyaux, qui consiste à mettre en évidence un ou plusieurs micronoyaux dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux sont générés au cours d'une division cellulaire lorsque l'ADN présente des cassures double-brin induisant des cassures de chromosomes (clastogénèse) ou lors de dysfonctionnements de l'appareil mitotique entraînant la perte de chromosome(s) entier(s) (aneuploïdie). Ce test permet donc de détecter des agents clastogènes et aneugènes.

- *Le test des micronoyaux in vitro*

La ligne directrice de l'OCDE n°487 (OCDE, 2010) est disponible pour le test des micronoyaux *in vitro* dans différentes lignées cellulaires (L5178Y, CHO, V79) et sur des cultures primaires de lymphocytes humains.

Il est nécessaire que les cellules aient effectué une mitose afin de permettre la formation des micronoyaux. Dans les lignées cellulaires, la démonstration d'une prolifération cellulaire peut être effectuée par exemple par mesure du doublement relatif de la population cellulaire (RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC). Les lymphocytes humains qui, au contraire des lignées cellulaires, ne possèdent pas de capacité intrinsèque de prolifération, peuvent être stimulés *in vitro* par un agent mitogène tel que la phytohémagglutinine A. Toutefois la réponse des lymphocytes à la phytohémagglutinine A peut varier en fonction des donneurs dont proviennent les lymphocytes, et induire une différence de proportion de cellules ayant effectué une division. L'utilisation de cytochalasine B, un inhibiteur de la cytokinèse qui empêche la polymérisation de l'actine, permet de contrôler la présence d'une division cellulaire dans le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse (Fenech and Morley, 1985). Les micronoyaux sont donc comptabilisés dans le cytoplasme des cellules binucléées, ayant subi une division cellulaire. Il peut toutefois s'avérer utile de comptabiliser également les micronoyaux dans les cellules mononucléées, puisque Elhajouji et al. (1998) ont montré que suite à un échappement mitotique, les produits aneugènes pouvaient induire une polyploidie et des micronoyaux dans des cellules mononucléées. Une augmentation du nombre de cellules mononucléées micronucléées dans le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse suggère donc un mécanisme aneugène.

- *Le test des micronoyaux in vivo*

Le test des micronoyaux sur érythrocytes de rongeurs provenant de la moelle osseuse ou du sang périphérique est le test *in vivo* le plus couramment réalisé de la batterie réglementaire. Il est décrit dans la ligne directrice de l'OCDE n°474 (OCDE, 1997e). Le test des micronoyaux peut également être réalisé *in vivo* ou *ex vivo* sur d'autres organes, par exemple le foie (Suzuki et al., 2009), le côlon (Ohyama et al., 2002), la rate (Benning et al., 1994) ou les poumons (Muller et al., 2008).

- Informations mécanistiques

La distinction entre les micronoyaux contenant des fragments acentromériques de chromosomes provenant de mécanismes clastogènes et ceux contenant un ou plusieurs chromosomes entiers provenant de mécanismes aneugènes est possible par des techniques de marquage cytogénétique. Les kinétochores peuvent être identifiés grâce à un marquage immunofluorescent, et la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) permet de marquer différentes régions des chromosomes, telles que les centromères ou les télomères. Ainsi en utilisant des sondes centromériques marquant les centromères de tous les chromosomes (sonde pancentromérique) ou bien les centromères d'une paire de chromosomes donnée (sonde centromérique spécifique à un chromosome), différents mécanismes aneugènes (perte chromosomique ou non disjonction des chromatides sœurs) et clastogènes peuvent être identifiés (Figure 15).

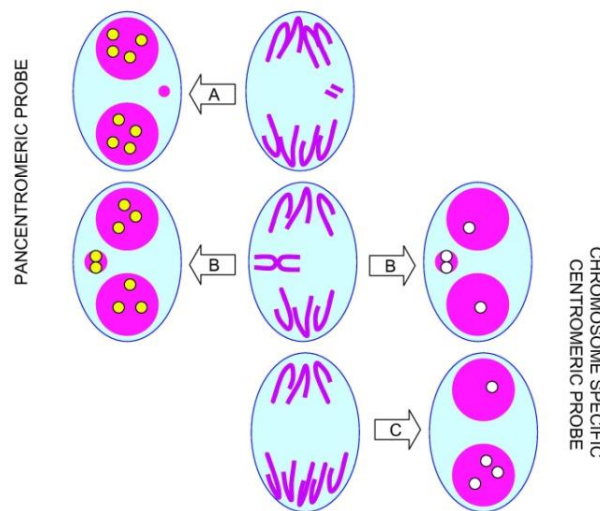


Figure 15 : Marquage pancentromérique (jaune) ou centromérique spécifique d'un chromosome donné (blanc) associé au test des micronoyaux (Fenech et al., 2011). A : micronoyau formé à partir d'un fragment acentrique, B : micronoyau formé à partir d'un chromosome entier, C : non disjonction entre les chromatides sœurs d'un chromosome.

- Utilisation pour l'évaluation des nanomatériaux

La pertinence de l'utilisation du test des micronoyaux *in vivo* sur cellules hématopoïétiques pour l'évaluation des nanomatériaux dépend de la toxicocinétique de chaque nanomatériau, et de l'exposition de la moelle osseuse. Les tests des micronoyaux *in vivo* ou *ex vivo* à partir d'organes plus exposés (colon, poumons, foie, rate) pourraient donc être préférables.

Concernant le test des micronoyaux *in vitro*, quelques limites ont été mises en évidence. Il a notamment été montré que la cytochalasine B, utilisée dans le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse, pouvait interférer avec l'internalisation des nanomatériaux (Gonzalez et al., 2011). En effet, la cytochalasine B interfère avec la formation des microfilaments d'actine nécessaires à l'endocytose (Doak et al., 2012). Il est donc recommandé de ne pas exposer les cellules en même en même temps avec les nanomatériaux et la cytochalasine B, mais plutôt d'ajouter la cytochalasine B pendant la période de recouvrement, ou de l'ajouter quelques heures après le début du traitement par les nanomatériaux s'il n'y a pas de période de recouvrement. Des résultats différents ont d'ailleurs été obtenus suivant différents schéma de traitement de cellules MCL-5 avec des nanoparticules d'oxyde de fer (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION) recouvertes de dextran : une augmentation significative et concentration-dépendante du nombre de micronoyaux a été observée dans le cas d'expositions consécutives des cellules avec les SPION puis la cytochalasine B, alors que lors d'une co-exposition avec les SPION et la cytochalasine B, aucune induction de micronoyaux n'a été détectée (Doak et al., 2009).

Par ailleurs, des agrégats de nanomatériaux peuvent gêner l'analyse microscopique, en induisant des faux-positifs lorsqu'ils sont confondus avec des micronoyaux, ou des faux-négatifs lorsqu'ils recouvrent la quasi-totalité du cytoplasme et empêchent ainsi la détection des micronoyaux dans des cellules exposées aux nanomatériaux. Ce problème technique pourrait être réduit par l'utilisation de marqueurs fluorescents de l'ADN (à condition que les nanomatériaux n'interfèrent pas non plus avec l'analyse de la fluorescence).

2.2.4. Tests de screening

2.2.4.1. Test *GADD45a-GFP* ou *GreenScreen HC*

Le gène *GADD45a* (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha) est un membre d'un groupe de gènes dont les transcrits sont induits dans des conditions d'arrêt de croissance ou par l'action d'agents génotoxiques. La transcription de ce gène en réponse à des lésions de l'ADN est régulée par des mécanismes p53-dépendants et indépendants. Le test *GreenScreen HC* (HC: human cells), développé récemment (Hastwell et al., 2006), repose sur l'utilisation d'un rapporteur dans lequel le promoteur de *GADD45a* est fusionné avec le gène de la protéine fluorescente verte (GFP, green fluorescent protein). Deux souches de cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 sont utilisées : la lignée test qui contient le plasmide avec le rapporteur GFP et la lignée contrôle qui contient un plasmide modifié ne permettant pas la production de protéine

GFP fonctionnelle. Un produit génotoxique induit donc une augmentation de la fluorescence de la lignée test. La lignée contrôle permet d'éliminer des biais éventuels liés à des produits fluorescents ou induisant une fluorescence cellulaire indépendamment de l'expression de GADD45a. Afin d'obtenir l'induction moyenne de GFP par cellule, la valeur de fluorescence est divisée par la densité cellulaire, obtenue par une mesure d'absorbance. Un protocole modifié permet d'effectuer des essais avec activation métabolique (Hastwell et al., 2006).

- *Utilisation pour l'évaluation des nanomatériaux*

Aucune étude utilisant le test GADD45a-GFP pour l'évaluation de nanomatériaux n'est rapportée dans la littérature (Doak et al., 2012). Toutefois, nous avons fait un essai avec des nanoparticules de carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) (résultats non présentés) en utilisant le kit GreenScreen® HC (Gentronix). Nous avons observé une interférence des nanoparticules avec la mesure d'absorbance, résultant en une sous-estimation de la cytotoxicité et donc de la valeur d'induction moyenne de GFP par cellule. Avec le protocole standard, les nanoparticules de WC-Co étaient donc évaluées comme non génotoxiques. Toutefois, après correction de la valeur de densité cellulaire par des comptages sur cellules de Malassez, les nanoparticules de WC-Co étaient évaluées comme génotoxiques. L'utilisation du test GADD45a-GFP pour des nanomatériaux est conditionnée par des contrôles d'interactions des nanomatériaux avec les mesures d'absorbance et de fluorescence, ce qui est généralement recommandé (Kroll et al., 2009). Dans le cas d'une interaction avec les mesures d'absorbance, une évaluation en parallèle de la cytotoxicité pourrait être mise en place, mais résulte en une augmentation non négligeable de la durée des manipulations, critère important pour un test de screening.

2.2.5. Adéquation des tests de génotoxicité pour l'évaluation des nanomatériaux

Globalement, les tests de génotoxicité *in vivo* ou *in vitro* sur cellules de mammifères semblent pertinents pour l'évaluation des nanomatériaux. Toutefois, certains tests nécessitent des protocoles adaptés, et le recul est encore trop limité pour assurer avec certitude que tous sont réellement adéquats. Pour les essais *in vivo*, la voie d'exposition et l' (ou les) organe(s) étudié(s) doivent être choisis en fonction des conditions d'exposition humaine et de la toxicocinétique du nanomatériau.

En revanche, le test de mutations géniques *in vitro* sur bactéries n'apparaît pas adapté pour l'évaluation des nanomatériaux, bien qu'il puisse s'avérer utile pour mettre en évidence des effets mutagènes provenant d'impuretés, de produits de relargage et/ou de dégradation (Afssaps, 2011).

2.3. La batterie de tests réglementaire pour l'évaluation de la génotoxicité des médicaments

Les tests de génotoxicité requis avant la mise sur le marché des médicaments à usage humain sont décrits dans la ligne directrice ICH (International Conference on Harmonisation) S2(R1) (2011). Il s'agit d'une batterie de tests étudiant différents événements génétiques, permettant ainsi une évaluation la plus complète possible de la génotoxicité. Chaque test est par ailleurs décrit dans une ligne directrice de l'OCDE, finalisée ou en cours de finalisation. Deux options sont proposées sans préférence pour l'une ou l'autre, bien que la première, plus utilisée, bénéficie d'un plus grand recul :

- Option 1 :

- Un test de mutation génique sur bactéries (ligne directrice OCDE n°471).

- Un test évaluant les dommages chromosomiques (essai d'aberrations chromosomiques *in vitro* (ligne directrice OCDE n°473) ou test des micronoyaux *in vitro* (ligne directrice OCDE n°487)) ou un test de mutation génique sur cellules de mammifère *in vitro* (ligne directrice OCDE n°476).

- Un essai de génotoxicité *in vivo*, généralement un test évaluant les dommages chromosomiques sur cellules hématopoïétiques de rongeur, par exemple le test des micronoyaux *in vivo* (ligne directrice OCDE n°474).

- Option 2 :

- Un test de mutation génique sur bactéries (ligne directrice OCDE n°471).

- Deux essais de génotoxicité *in vivo* évaluant deux tissus différents, généralement un test des micronoyaux sur cellules hématopoïétiques de rongeur (ligne directrice OCDE n°474) et un test de cassure de brin (test des comètes) sur le foie. Une ligne directrice de l'OCDE est en préparation pour le test des comètes *in vivo* (OCDE, 2013a).

2.4. Spécificités pour l'évaluation de la génotoxicité des médicaments sous forme nanoparticulaire

Actuellement, aucune ligne directrice spécifique à l'évaluation de la génotoxicité des médicaments sous forme nanoparticulaire n'est disponible. Toutefois c'est un sujet sur lequel travaillent les différentes instances réglementaires relatives aux médicaments, et l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps, désormais Agence nationale de sécurité du médicament, ANSM) a publié des recommandations pour l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire en 2009 puis 2011. L'importance de la caractérisation physico-chimique y est mise en évidence, notamment des informations relatives à la distribution de taille et à la formation d'agglomérats ou d'agrégats dans les différents milieux biologiques. La stratégie proposée pour l'évaluation de la génotoxicité consiste en une batterie de tests incluant au minimum un test des micronoyaux *in vitro*, préférentiellement sur des cellules d'origine humaine, un test des comètes *in vitro* et un test *in vivo* (Afssaps, 2011) :

- Si les tests des micronoyaux et des comètes *in vitro* sont négatifs, le test des micronoyaux *in vivo* sur l'organe le plus pertinent en termes d'exposition doit être réalisé, afin d'étudier d'éventuels effets génotoxiques liés à un mécanisme secondaire ne survenant qu'*in vivo*.
- Si le test des comètes *in vitro* est positif, un test des comètes *in vivo* sur l'organe cible et/ou l'organe le plus exposé doit être réalisé, sauf si l'on peut clairement démontrer qu'il s'agit d'effets primaires indirects qui ne surviennent pas *in vivo* dans les conditions thérapeutiques.
- Si le test des micronoyaux *in vitro* est positif ou si les deux tests *in vitro* sont positifs, un test des micronoyaux *in vivo* et un test des comètes *in vivo* doivent être réalisés.

Les grandes différences entre cette batterie de tests et celle la ligne directrice ICH S2(R1) concernent principalement le test d'Ames, qui n'apparaît logiquement pas dans les recommandations pour les nanomatériaux. En revanche, le test des comètes *in vitro*, utilisé dans de très nombreuses études de génotoxicité sur des nanomatériaux dans la littérature, fait partie des deux tests *in vitro* de la batterie de l'Afssaps pour les nanomatériaux, bien qu'il ne possède pas de ligne directrice OCDE.

2.5. Intérêt d'un témoin positif sous forme nanoparticulaire pour les essais de génotoxicité *in vitro*

La pertinence des tests de génotoxicité tels qu'ils sont utilisés pour l'évaluation des produits non-nanoparticulaires est souvent remise en question pour l'évaluation des nanomatériaux. Certains semblent non appropriés, alors que d'autres pourraient être utilisés, nécessitant toutefois parfois des adaptations de protocole. De nouveaux tests ou des tests n'appartenant pas à la batterie réglementaire pourraient également être utiles pour l'évaluation de la génotoxicité des nanomatériaux. Des nanomatériaux utilisables comme témoins positifs de référence dans les tests de génotoxicité seraient donc d'une grande utilité pour répondre à ces questions, valider les tests existants ou de nouveaux tests. Toutefois, bien que ce manque soit fréquemment mis en évidence, aucun témoin positif de référence génotoxique sous forme nanoparticulaire n'a encore été validé par la communauté scientifique (Gonzalez et al., 2008; Landsiedel et al., 2009; Warheit and Donner, 2010).

Quelques candidats ont tout de même été proposés comme témoins positifs en nanotoxicologie. Le plus décrit d'entre eux, le ZnO nanoparticulaire, a induit des réponses positives *in vitro* dans différentes lignées cellulaires, mais également des résultats équivoques ou négatifs. Ainsi, des nanoparticules de ZnO de 20 et 70 nm fonctionnalisées avec une charge négative ou positive n'ont pas induit de génotoxicité dans le test d'aberration chromosomique *in vitro* dans des cellules CHL (chinese hamster lung) ni dans le test des micronoyaux *in vivo* sur moelle osseuse et dans le test des comètes *in vivo* sur les cellules d'estomac et de foie de rat (Kwon et al., 2014). Une conclusion semblable a été tirée des résultats du programme européen Nanogenotox (Nanogenotox, 2013), dans lequel des nanoparticules de ZnO ont été évaluées en tant que témoin positif nanoparticulaire dans des essais de génotoxicité *in vitro*. Des résultats positifs ont été obtenus dans le test des micronoyaux *in vitro* dans la lignée Caco-2 dans tous les laboratoires participant au projet. En revanche, dans le test des micronoyaux *in vitro* dans la lignée BEAS 2B, ainsi que dans les tests des comètes *in vitro* sur ces deux lignées, les nanoparticules de ZnO ont induit des résultats positifs dans certains laboratoires et négatifs dans d'autres (Nanogenotox, 2013).

Fubini et al. (2010) proposent des témoins positifs différents en fonction du type de nanomatériaux. Ainsi, pour des nanomatériaux de type nanoparticulaire, ou sphérique, ils indiquent le nano-quartz comme candidat idéal, mais apportent un bémol lié à la difficulté de préparation de telles nanoparticules, résultant en des résultats contradictoires dans la littérature. Pour des nanomatériaux de type HARN (high aspect ratio nanostructures), ils proposent des nanofibres d'amiante. Toutefois, aucune donnée n'est disponible concernant la toxicité réelle des nanofibres d'amiante, puisque les

composés de cette classe les plus cancérigènes étaient des fibres de longueur importante, celles ayant une longueur inférieure à 5 µm n'étant pas considérées comme cancérigènes (Fubini et al., 2010). L'amiante est également citée comme candidat par Donaldson et al. (2010). Ces derniers proposent par ailleurs le noir de carbone ou des particules diesel comme possibles témoins positifs pour les particules carbonées.

Récemment, différents nanomatériaux constitués d'oxyde de cuivre (CuO) de différentes formes (sphériques, fusiformes ou en forme de baguettes), génotoxiques dans les tests des comètes et des micronoyaux dans la lignée cellulaire macrophagique murine RAW 264.7 et dans une moindre mesure dans des lymphocytes humains, ont été proposées comme témoin positif (Di Bucchianico et al., 2013). Dans une autre étude, des nanoparticules de CuO de 58 nm ont été utilisées comme témoin positif (Khatri et al., 2013). Elles ont induit une diminution de la viabilité dans la lignée cellulaire THP-1, dans des cellules épithéliales nasales et des cellules épithéliales bronchiques, ainsi qu'une libération de plusieurs cytokines, notamment IL-6, IL-8 et TNF-α dans ces trois types cellulaires, et ont entraîné de l'apoptose dans la lignée THP-1. Elles n'ont toutefois pas été utilisées comme témoin positif dans les tests de comètes réalisés dans les trois types cellulaires (Khatri et al., 2013).

Dans une étude portant sur l'étude de la génotoxicité de nanotubes de carbone, des microparticules de carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) ont été utilisées comme témoin positif dans le test des micronoyaux *in vitro* dans une lignée cellulaire épithéliale pulmonaire de rat (RLE) et *ex vivo* dans des pneumocytes de type II de rat (Muller et al., 2008). A partir de ces données, nous avons choisi d'étudier la possibilité d'utiliser des nanoparticules de WC-Co comme témoin positif génotoxique.

CHAPITRE 3. Le carbure de tungstène-cobalt (WC-Co)

3.1. Présentation

L'association du cobalt et du carbure de tungstène forme un cermet ou métal céramique, et fait partie des métaux durs. Dans cet alliage, produit par frittage, consistant en une agglomération des poudres sous pression suivie d'un chauffage à 1500°C, le cobalt en proportion de 6 à 10% est utilisé comme liant. Le carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) a été commercialisé en 1927 par une société allemande sous le nom de Widia (« wie Diamant », comme du diamant). Le WC-Co est principalement utilisé pour la fabrication d'outils de coupe et d'usinage, en raison de sa résistance à l'usure (dureté) et à la flexion (ténacité). Le WC-Co possède également une résistance élevée aux chocs thermiques (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2006; National Toxicology Program, 2011). Ces propriétés mécaniques du WC-Co dépendent de la proportion de cobalt, ainsi que de la taille des particules de WC. La forme nanoparticulaire du WC-Co a donc probablement un grand potentiel pour l'industrie des métaux durs, du fait de leur dureté supérieure à celle des microparticules (Richter and Ruthendorf, 1999).

3.2. Toxicité du WC-Co

3.2.1. Etudes épidémiologiques

L'exposition humaine au WC-Co a principalement lieu en milieu professionnel, lors de la manipulation des poudres ou suite à la production de poussières lors des activités de fabrication des métaux durs et d'affûtage des outils coupants. L'exposition a donc lieu principalement par voie respiratoire.

Des études épidémiologiques ont été réalisées parmi les ouvriers de plusieurs sites de production de WC-Co en France (Lasfargues, 1994; Moulin et al., 1998; Wild et al., 2000) évaluant la mortalité liée au cancer du poumon. Une augmentation de la mortalité par cancer du poumon a été observée dans les différentes études, qui a conduit à la classification du WC-Co comme probablement cancérigène pour l'homme (groupe 2A) par le Centre International de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer, IARC) (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2006).

Par ailleurs, un asthme bronchique, ainsi qu'une atteinte interstitielle, également connue sous le nom de « maladie des métaux durs », ont été rapportés chez des travailleurs exposés à des poussières de WC-Co (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2006). La présentation clinique de cette maladie des métaux durs peut varier d'une alvéolite subaiguë à une fibrose interstitielle chronique, et elle est caractérisée par la présence dans l'interstitium pulmonaire et la lumière alvéolaire de cellules géantes multinucléées, d'où l'appellation de pneumonie interstitielle à cellules géantes (Lison et al., 1996).

Les conclusions des études épidémiologiques sont corroborées par plusieurs études *in vitro* et *in vivo* sur les mécanismes de cancérogenèse du WC-Co. Les résultats de ces études ne permettent cependant pas d'élucider complètement les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse du WC-Co. Par ailleurs, la majorité de ces études concerne les microparticules de WC-Co, et non les nanoparticules.

3.2.2. Etudes de toxicité *in vitro* et *in vivo*

3.2.2.1. Génotoxicité

Le potentiel génotoxique du WC-Co a principalement été étudié *in vitro* pour des particules de taille micrométrique. Plusieurs études présentent des résultats de test des

micronoyaux avec inhibition de la cytokinèse sur lymphocytes humains isolés après 15 min de traitement avec des microparticules de WC-Co, suivi d'une période de recouvrement. Une augmentation de la fréquence des micronoyaux dans les cellules binucléées a été observée pour les particules de WC-Co (6% Co) (De Boeck et al., 2003a; Van Goethem et al., 1997). Il est intéressant de noter que les particules de cobalt étudiées en parallèle induisaient moins de micronoyaux. Dans une étude, la fréquence de micronoyaux a également été déterminée dans les cellules mononucléées, mais aucune augmentation n'a été observée (De Boeck et al., 2003a). Les particules de WC-Co de taille micrométrique induisent également une augmentation de la fréquence de cellules micronucléées dans d'autres types cellulaires *in vitro*, notamment les lignées RLE d'épithélium pulmonaire de rat et MCF-7 issue de cellules tumorales mammaires humaines (Muller et al., 2008).

Les résultats de tests des comètes sur leucocytes humains isolés exposés pendant 15 min avec des microparticules de WC-Co (6% Co) montrent une augmentation de la fragmentation de l'ADN, et dans une moindre mesure pour des particules de cobalt (Anard et al., 1997; Van Goethem et al., 1997). Ces résultats ont été reproduits par De Boeck et al., (1998, 2003a), qui ont également mis en évidence une hétérogénéité interdonneur et interexpérimentale.

Concernant la génotoxicité *in vivo* du WC-Co, seules des données sur la forme micrométrique sont disponibles dans la littérature. Après instillation intratrachéale unique de microparticules de WC-Co (6% Co, 16,6 mg/kg) chez le rat, une induction de micronoyaux a été observée *ex vivo* dans les pneumocytes de type 2 (De Boeck et al., 2003b; Muller et al., 2008).

3.2.2.2. Toxicité du mélange WC-Co

De manière générale, le WC-Co induit une génotoxicité plus importante que le cobalt ou le WC séparément (Anard et al., 1997; De Boeck et al., 2003a; Van Goethem et al., 1997). Une telle différence est également observée dans des études de cytotoxicité. Des nanoparticules de WC-Co (10% Co, 50-300 nm) ont induit une cytotoxicité *in vitro* plus importante que des nanoparticules de WC dans plusieurs lignées cellulaires, Caco-2, HaCaT et OLN-93 ainsi que dans des astrocytes de rat en culture primaire (Bastian et al., 2009). *In vivo*, des microparticules de WC-Co ont entraîné des lésions pulmonaires plus importantes que ses composés pris séparément (Lasfargues et al., 1995). La toxicité plus importante du WC-Co par rapport au cobalt ou au WC séparément pourrait s'expliquer par un mécanisme oxydant (Lison et al., 1995).

3.2.2.3. Mécanisme oxydant

Lison et al. (1995) ont en effet mis en évidence une production d'ERO lors de l'association de cobalt métallique et de particules de WC, qui n'était pas retrouvée avec les particules de WC seules ou le chlorure de cobalt, et dans une quantité moindre avec les particules de cobalt seules. Cette production d'ERO était associée à une solubilisation du cobalt. Les auteurs proposent un mécanisme pour la production d'ERO par l'association WC et Co, dans lequel les électrons provenant du cobalt sont transférés à la surface des particules de WC où ils peuvent réduire l'oxygène et générer des ERO, résultant également en une solubilisation du cobalt oxydé (Lison et al., 1995) (Figure 16).

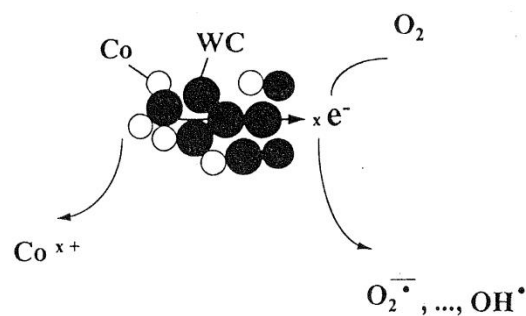


Figure 16 : Proposition de mécanisme de réduction de l'oxygène par le WC-Co (Lison et al., 1995).

Toutefois, aucune induction de lésions oxydatives de l'ADN n'a été observée dans un test des comètes avec l'enzyme de réparation de l'ADN FPG sur des leucocytes humains isolés exposés pendant 15 min avec des microparticules de WC-Co (De Boeck et al., 1998).

Ding et al. (2009) ont mis en évidence une production de radicaux hydroxyles ($^{\cdot}OH$) dans des cellules épidermiques JB6 P+ exposées à des nanoparticules de WC-Co plus importante que dans des cellules exposées à des microparticules de WC-Co. Ces résultats suggèrent une réactivité plus importante des nanoparticules de WC-Co par rapport à la forme micrométrique.

CHAPITRE 4. Les nanomédicaments

Les nanomédicaments résultent de l'application des nanotechnologies à la formulation des médicaments. Ils incluent diverses structures organiques ou inorganiques (Figure 17) de taille généralement inférieure à 300 nm (Etheridge et al., 2013) voire 500 nm (Couvreur, 2013). Certains sont utilisés en clinique parfois depuis de nombreuses années, pour des indications thérapeutiques ou diagnostiques, et de nombreuses autres formes sont en développement, à des stades plus ou moins avancés. Les nanomédicaments peuvent être divisés en plusieurs catégories : des nanovecteurs de principes actifs, des principes actifs nanonisés ou des nanomatériaux sans principe actif associé, utilisés principalement pour le diagnostic. Les deux candidats nanovecteurs de principes actifs étudiés dans la partie expérimentale de ce travail, les nanodiamants et les nanocapsules lipidiques, seront présentés de manière plus détaillée.

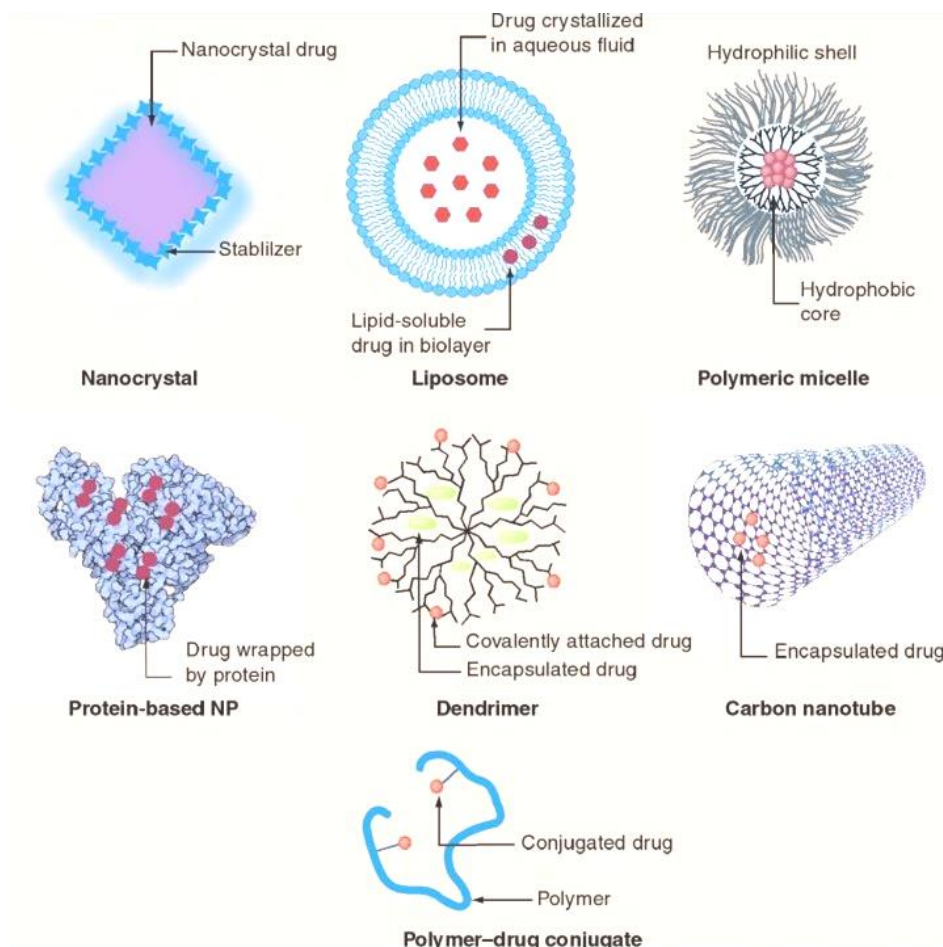


Figure 17 : Différentes structures de nanomédicaments sur le marché ou en développement (Bamrungrasap et al., 2012).

4.1. Intérêts des nanomédicaments

Les nanomédicaments sont formulés dans un but d'améliorer l'efficacité ou de diminuer la toxicité des principes actifs, ou pour des méthodes de diagnostic telles que l'imagerie médicale. Ainsi l'utilisation de médicaments sous forme nanoparticulaire peut permettre d'augmenter la solubilité de molécules très peu solubles dans l'eau, protéger la molécule de la dégradation, prolonger la libération ou améliorer la biodisponibilité des médicaments. Par ailleurs, certaines formes de nanomédicaments permettent une distribution ciblée du principe actif et ainsi de diminuer les effets indésirables (Parveen et al., 2012). Ces derniers points sont particulièrement recherchés dans le domaine de l'oncologie, avec l'objectif de cibler sélectivement la tumeur sans affecter les cellules saines. Ce ciblage peut être passif, notamment lorsqu'il vise un des organes du système réticulo-endothélial tels que le foie ou la rate, du fait de l'accumulation des nanomédicaments dans le système réticulo-endothélial suite au phénomène d'opsonisation lors d'une administration par voie intra-veineuse (Couvreur, 2013). Une seconde génération de nanomédicaments a été construite de façon à échapper à la reconnaissance par les macrophages du système réticulo-endothélial grâce à des modifications de leur surface, par l'application du concept de répulsion stérique, permettant d'éviter l'opsonisation. Cela peut être effectué par fixation de polyéthylène glycol (PEG), un polymère hydrophile et flexible, ou PEGylation (Couvreur, 2013). On parle de nanoparticules « furtives ». Ces nanomédicaments peuvent alors faire l'objet d'un ciblage passif, exploitant les différences anatomiques entre les tissus sains et tumoraux, grâce au phénomène de perméabilité et de rétention tissulaire (enhanced permeability and retention, EPR) correspondant à une augmentation de la perméabilité vasculaire associée à une diminution du drainage lymphatique dans les tumeurs (Parveen et al., 2012). L'effet EPR peut donc entraîner une accumulation des principes actifs plus importante dans la tumeur que dans les autres tissus. Plusieurs nanovecteurs ont été développés sur ce principe dans les années 1980-1990, par exemple le Caelyx[®] (ou Doxil[®]) un liposome PEGylé contenant de la doxorubicine, qui possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement du cancer ovarien avancé, du cancer du sein métastatique et du sarcome de Kaposi (Parveen et al., 2012). La vectorisation active nécessite la conjugaison sur le vecteur de ligands spécifiques pour un récepteur qui permettent de cibler spécifiquement un site donné. La vectorisation active peut s'effectuer par des interactions ligand-récepteur, antigène-anticorps ou des aptamères (fragments d'ADN ou d'ARN) (Parveen et al., 2012). Un seul nanomédicament à vectorisation active est disponible sur le marché, l'Ontak[®] (Etheridge et al., 2013), autorisé en 1999 par la Food and Drug Administration (FDA) et sur la liste des autorisations temporaires d'utilisation (ATU) nominatives en France depuis 2005. Il s'agit d'une cytotoxine recombinante composée de la fusion de l'interleukine 2 (IL-2) et de la

toxine diphtérique, indiquée dans les lymphomes cutanés à cellules T exprimant le récepteur de l'IL-2 (CD25)⁵.

4.2. Les nanomédicaments sur le marché

Certains nanomatériaux sont déjà sur le marché en tant que spécialités pharmaceutiques, parfois depuis de nombreuses années. Toutefois, la recherche de données concernant ces spécialités s'avère difficile, probablement à cause de l'absence de définition et de classification des nanomédicaments (Etheridge et al., 2013), mais l'identification des nanomédicaments est aussi compliquée par l'absence fréquente de la terminologie « nano » des documents disponibles (résumés des caractéristiques du produit, notice). Une liste (non exhaustive) de médicaments à visée thérapeutique sous forme nanoparticulaire ou sous forme probablement nanoparticulaire ayant obtenu une AMM ou une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) en France pour une indication thérapeutique est présentée dans le Tableau 2. Les formes commercialisées sont principalement des liposomes, des nanoparticules polymériques et des émulsions (Etheridge et al., 2013). Les indications sont diverses, principalement en oncologie et infectiologie. Le nombre de médicaments sous forme nanoparticulaire reste très limité au regard des 2800 substances actives (11000 présentations) présentes sur le marché français en 2012⁶.

Le Tableau 3 présente des nanomatériaux à usage diagnostique ayant obtenu une AMM en France. Il s'agit de nanoparticules d'oxyde de fer utilisées comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) et de nanocolloïdes.

⁵ Base de données Thériaque. http://www.theriaque.org/apps/recherche/rch_simple.php. Consulté le 9.04.2014.

⁶ Analyse des ventes de médicaments en France en 2012. ANSM. http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/796352eff0e9119cca0ea5bbd898353a.pdf. Consulté le 29.01.2014.

Tableau 2 : Médicaments sous forme nanoparticulaire à indication thérapeutique ayant obtenu une AMM en France. D'après Etheridge et al. (2013), Thériaque⁵ et Ansm⁷.

	Principe actif	Indication	Date d'AMM
Liposomes			
Abelcet [®]	Amphotéricine B	Infections fongiques	1997
Ambisome [®]	Amphotéricine B	Infections fongiques	1998
DaunoXome [®]	Daunorubicine	Sarcome de Kaposi	1996
Doxil [®] /Caelyx [®]	Doxorubicine	Cancer du sein, cancer ovarien, myélome multiple, sarcome de Kaposi	1996
DepoCyte [®]	Cytarabine	Méningite lymphomateuse	2001
Myocet [®]	Doxorubicine	Cancer du sein	2000
Mepact [®]	Mifamurtide	Ostéosarcome	2009
Visudyne [®]	Vertéporfine	DMLA	2000
Nano-émulsions			
Cleviprex [®]	Clevidipine butyrate	Hypertension	2012
Diprivan [®]	Propofol	Anesthésique	1989
Epaxal [®]	Adjuvant pour vaccin	Hépatite A	2003
Etomidate-Lipuro [®]	Etomidate	Anesthésique	1998
Focetria [®]	Adjuvant pour vaccin	Grippe	2007
Neoral [®]	Ciclosporine	Prévention du rejet de greffon	1995
Propofol-Lipuro [®]	Propofol	Anesthésique	2002
Nanoparticules polymériques			
Adagen [®]	Pegadémase bovine	Déficit immunitaire	2007 (ATU)
Copaxone [®]	Acétate de glatiramère	Sclérose en plaques	2002
Neulasta [®]	Pegfilgrastim	Neutropénie fébrile	2002
Oncaspar [®]	Pegaspargase	Leucémie aigue lymphoblastique	2004 (ATU)
Pegasys [®]	PEG-interféron alpha 2a	Hépatites B et C	2002
ViraferonPeg [®]	PEG-interféron alpha 2b	Hépatite C	2000
Renagel [®]	Chlorhydrate de sevelamer	Hyperphosphorémie	2000
Macugen [®]	Pegaptanib	DMLA	2006
Somavert [®]	Pegvisomant	Acromégalie	2002
Nanocristaux de principes actifs			
Emend [®]	Aprépitant	Antiémétique	2003
Lipanthyl [®]	Fénofibrate	Hypertriglycémie, Hyperlipidémie	2000
Rapamune [®]	Sirolimus	Immunosuppresseur	2002
Nanoparticules protéiques			
Abraxane [®]	Paclitaxel / albumine	Cancer du sein	2008
Ontak [®]	Dénileukin diftotox	Lymphome cutané à cellules T	2005 (ATU)

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation, DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge.

⁷ Répertoire des spécialités pharmaceutiques. Ansm. <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/index.php>. Consulté le 9.04.2014.

Tableau 3 : Médicaments sous forme nanoparticulaire à indication diagnostique ayant obtenu une AMM en France. D'après Etheridge et al. (2013), Thériaque⁵ et Ansm⁷.

	Principe actif	Indication	Date d'AMM
<i>Nanoparticules d'oxyde de fer pour Imagerie par résonance magnétique (IRM)</i>			
Cliavist®	Ferucarbotran / Nanoparticules d'oxyde de fer	Imagerie des tumeurs hépatiques	2003, abrogée en 2011
Endorem®	Nanoparticules d'oxyde de fer	Imagerie des tumeurs hépatiques	1994, abrogée en 2011
Lumirem®	Ferumoxsil / Nanoparticules d'oxyde de fer	Imagerie du tube digestif	1993
<i>Nanocolloïdes</i>			
Nanocoll®	Albumine humaine, technétium	Scintigraphies	1995
Nanocis®	Sulfure de rhénium, technétium	Lymphographies	1981

4.2.1. Les nano-vecteurs

4.2.1.1. Les liposomes

Les liposomes (Figure 17) font partie des premiers nano-vecteurs développés et sont utilisés en clinique depuis plusieurs années. Ce sont des vésicules artificielles, constituées d'une ou plusieurs double(s) couche(s) phospholipidiques. Ils permettent la vectorisation de diverses molécules, les molécules hydrophiles pouvant être encapsulées dans le compartiment interne aqueux (ou entre les doubles couches phospholipidiques) et les molécules lipophiles pouvant être incorporées à l'intérieur des doubles couches phospholipidiques.

4.2.1.2. Les nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques (Figure 17) font également partie des nano-vecteurs les plus utilisés en clinique et consistent en la conjugaison d'un principe actif avec un polymère, par exemple PEG, poly(acide lactique-coglycolique) (PLGA), poly(acide lactique) (PLA) (Cho et al., 2008). La plupart des nanoparticules polymériques sont biodégradables et biocompatibles. Selon leur formulation, il peut s'agir de nanoparticules, de nanosphères (des molécules peuvent être adsorbées à la surface ou incorporées à l'intérieur) ou de nanocapsules (constituées d'une couronne de polymères

autour d'une cavité intérieure, dans laquelle peut être incorporé un principe actif) (Parveen et al., 2012).

4.2.1.3. Les nanoparticules protéiques

Ces nano-vecteurs consistent en l'encapsulation d'un principe actif dans une nanoparticule protéique. Par exemple, l'Abraxane[®] est constitué de nanoparticules de paclitaxel et d'albumine humaine de 130 nm environ.

4.2.1.4. Les nano-émulsions

Les nano-émulsions constituent une classe particulière des émulsions et consistent en un mélange de deux liquides non-miscibles ou faiblement miscibles, dont l'un (la phase dispersée) est dispersé sous forme de gouttelettes dans l'autre (la phase continue). Des surfactants permettent de stabiliser l'interface entre les deux liquides. En fonction de la nature des phases dispersée et continue, deux types d'émulsion sont définis : les émulsions de type huile dans eau et les émulsions de type eau dans huile. Les nano-émulsions de type huile dans eau sont principalement utilisées, pour la vectorisation de principes actifs lipophiles (Hafner et al., 2014).

4.2.2. Les nanocristaux de principe actif

A la différence des médicaments nanovectorisés, les nanocristaux (Figure 17) sont constitués uniquement de principe actif, et de surfactants nécessaires à la stabilisation des suspensions de nanocristaux. Cette formulation est utilisée principalement dans le cas de principes actifs très peu solubles dans l'eau. En effet, la nanonisation induit une augmentation de la surface spécifique et donc une dissolution plus rapide améliorant la biodisponibilité du principe actif (Junghanns and Müller, 2008). Les nanocristaux constituent une option intéressante pour l'administration de principes actifs peu solubles notamment par voie orale mais aussi parentérale, oculaire ou pulmonaire (Shegokar and Müller, 2010).

4.2.3. Les agents de contraste

Des nanoparticules inorganiques d'oxyde de fer superparamagnétique (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION) sont utilisées en imagerie par résonance magnétique (IRM). Il s'agit de nanoparticules d'oxyde de fer de 4 à 8 nm environ, enrobées par des dextrans, leur conférant une taille totale de quelques dizaines à quelques centaines de nm.

4.3. Exemples de candidats nanomédicaments en développement

De nombreux autres nanomatériaux sont à l'étude pour des applications thérapeutiques ou diagnostiques, à des stades de développement plus ou moins avancés. Les nanomédicaments au stade d'essais cliniques sont principalement constitués de nanomatériaux déjà sur le marché, telles que des liposomes, des nanoémulsions ou des nanoparticules polymériques (Etheridge et al., 2013). On retrouve toutefois également d'autres nanomatériaux, tels que des nanoparticules d'or colloïdal recouvertes de TNF α en essai clinique de phase II pour des tumeurs solides (Etheridge et al., 2013).

Parmi les nombreux nanomatériaux à des stades beaucoup moins avancés, les nanotubes de carbone sont constitués d'un ou plusieurs feuillets de graphène (atomes de carbone organisés selon un réseau hexagonal) enroulés sur eux-mêmes. On distingue les nanotubes de carbone à simple paroi (SWCNT, single wall carbon nanotubes) et les nanotubes de carbone à parois multiples (MWCNT, multi wall carbon nanotubes). Les nanotubes de carbones pourraient être utilisés pour la vectorisation de principes actifs, qui pourraient être greffés à la surface ou dans la cavité des nanotubes.

Les dendrimères sont des polymères synthétiques de dimension nanométrique composés de plusieurs embranchements, pouvant être conjugués avec diverses molécules (Cho et al., 2008).

Des nanoparticules lipidiques sont également étudiées. Il s'agit principalement de nanoparticules lipidiques solides, constituées d'un cœur lipidique solide stabilisé par une couche de surfactants, ou de nanocapsules lipidiques, qui seront développées dans le paragraphe 4.5.

Comme développé dans le paragraphe suivant, des nanoparticules de diamant peuvent également être utilisés pour la vectorisation de principes actifs.

4.4. Les nanodiamants

4.4.1. Méthodes de production des nanodiamants

Le diamant est une forme métastable du carbone et sa formation nécessite des conditions de pression et de température très élevées, qui sont par exemple rassemblées dans les couches profondes du manteau terrestre ou dans les météorites. Mais le diamant peut aussi être synthétisé de manière artificielle, plus adaptée pour les applications industrielles car permettant une plus grande homogénéité et reproductibilité (Petit, 2013). Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour la production de nanodiamants. La détonation d'explosifs de carbone dans une cuve permet la formation de nanodiamants de détonation de 5 nm environ. Des films de nanodiamants de 3 à 100 nm peuvent être déposés sur une matrice par déposition de vapeurs de carbone. Une méthode à haute pression et haute température permet la formation de nanodiamants de taille généralement supérieure à 20 nm (Kaur and Badea, 2013).

4.4.2. Utilisations des nanodiamants en médecine

4.4.2.1. Vectorisation de molécules

La fonctionnalisation des nanodiamants est facilitée par la présence d'une grande variété de groupes carbonés à leur surface. Les nanodiamants ont ainsi été utilisés pour la vectorisation intracellulaire de plusieurs principes actifs, par exemple la doxorubicine (Xiao et al., 2013) ou la 10-hydroxycamptothécine (Li et al., 2010). La formulation de purvalanol A et de 4-hydroxytamoxifène avec des nanodiamants a permis d'augmenter la solubilité dans l'eau de ces molécules hydrophobes (Kaur and Badea, 2013). Des études montrent également la vectorisation par des nanodiamants de protéines telles que l'insuline (Shimkunas et al., 2009) ou d'oligonucléotides (Kaur and Badea, 2013). L'adsorption et le relargage se fait principalement par modulation des interactions électrostatiques entre les nanodiamants et les molécules ou par des changements de force ionique ou du pH dans le milieu (Petit, 2013).

4.4.2.2. Imagerie

Les nanodiamants formés par la méthode à haute pression et haute température présentent des impuretés, créés par la présence d'un atome d'azote proche d'une lacune

dans la maille du diamant, appelé centre N-V (Nitrogen-Vacancy). Ces centres N-V présentent des propriétés fluorescentes, émettant dans le rouge après excitation à la longueur d'onde du vert. Grâce à cette propriété, les nanodiamants pourraient également être utilisés en imagerie médicale (Kaur and Badea, 2013).

4.4.3. Toxicité des nanodiamants

Quelques études *in vitro* dans plusieurs types cellulaires (macrophages, cellules de neuroblastome) montrent que les nanodiamants sont peu cytotoxiques, et mieux tolérés par les cellules que d'autres nanomatériaux carbonés, comme les nanotubes de carbone ou le noir de carbone (Zhu et al., 2012). Aucune cytotoxicité n'a non plus été observée dans les lignées cellulaires humaines hépatiques (Hep3B et HepG2), rénales (Caki-1 et Hek-293), intestinale (HT29) et pulmonaire (A549) exposées à des nanodiamants (Paget et al., 2013). Une différence de cytotoxicité a toutefois été mise en évidence entre des nanodiamants préparés selon des méthodes différentes. Des nanodiamants formés par détonation induisaient une diminution de la viabilité cellulaire dans les cellules endothéliales humaines HUVEC-ST plus importante que des nanodiamants produits par déposition de vapeurs de carbone (Solarska et al., 2012). Cette cytotoxicité était associée à une production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Par ailleurs, une cytotoxicité a été observée par le test d'exclusion du bleu Trypan et par coloration à l'acridine orange et au bromure d'éthidium après exposition de lymphocytes humains pendant 72h à des nanodiamants de taille inférieure à 10 nm, à partir de la concentration de 50 µg/mL (Dworak et al., 2014).

Chez la souris, l'administration de nanodiamants par instillation intratrachéale unique (Zhang et al., 2010) a induit une rétention de nanodiamants dans les poumons, provoquant des lésions pulmonaires de type inflammatoire observées 3 jours après l'administration de nanodiamants aux doses de 4 et 20 mg/kg. Des nanodiamants ont également été détectés dans le foie, la rate, les os et le cœur des animaux traités.

Seul un nombre très limité d'études est disponible dans la littérature concernant la génotoxicité des nanoparticules de diamant. Dans l'une d'entre elles, l'exposition de lignées cellulaires humaines hépatiques (Hep3B et HepG2), rénales (Caki-1 et Hek-293), intestinale (HT29) et pulmonaire (A549) à des nanodiamants n'a pas induit de génotoxicité d'après le test de détection des foyers γ -H2AX (Paget et al., 2013). Au contraire, une augmentation de l'expression de protéines de réparation de l'ADN dans des cellules souches embryonnaires de souris a été observée après exposition à des nanodiamants, suggérant l'induction d'une génotoxicité (Xing et al., 2011). Par ailleurs, des nanodiamants de taille inférieure à 10 nm ont été étudiés dans les tests des

micronoyaux et des comètes *in vitro* sur lymphocytes humains (Dworak et al., 2014). Après 72h d'exposition, les nanodiamants ont induit des cassures de brin d'ADN à partir de la plus faible concentration étudiée de 1µg/mL, ainsi qu'une augmentation de la 8-oxo-Gua, suggérant des dommages oxydatifs à l'ADN. De plus, une augmentation du nombre de micronoyaux a été observée à la concentration de 10 µg/mL, et une activité aneugène était suggérée par la détection des centromères dans les micronoyaux par FISH.

4.5. Les nanocapsules lipidiques

4.5.1. Formulation des nanocapsules lipidiques

Des nanocapsules lipidiques (NCLs) ont été développées au sein de l'unité Inserm U646 (Pr Jean-Pierre Benoît, Angers). Elles sont constituées d'un cœur huileux liquide (triglycérides à chaînes moyennes) entouré d'une coque rigide de surfactants (lécithine de soja) et de chaînes de polyéthylène glycol, orientées vers l'extérieur aqueux (Heurtault et al., 2002) (Figure 18). Elles sont produites par une méthode d'inversion de phases consistant en plusieurs cycles de chauffage-refroidissement (Heurtault et al., 2002). Le diamètre des NCLs peut être facilement choisi en fonction des rapports entre les différents constituants (Heurtault et al., 2003).

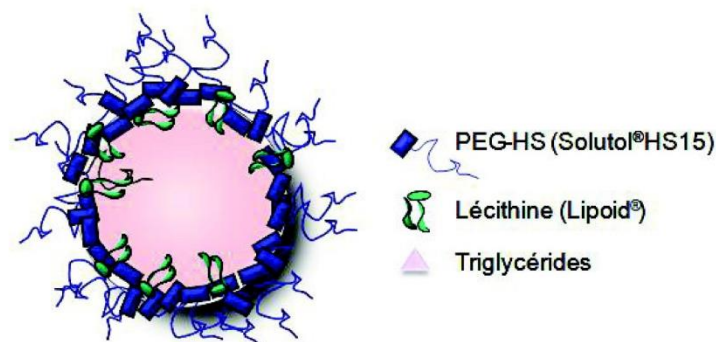


Figure 18 : Représentation schématique d'une nanocapsule lipidique (NCL) (Roger, 2009).

4.5.2. Utilisation de nanocapsules lipidiques pour la vectorisation de principes actifs

Divers principes actifs ont été encapsulés par dissolution dans le cœur lipidique des NCLs, par exemple le paclitaxel (Garcion et al., 2006; Groo et al., 2013), l'étoposide (Saliou et al., 2013) ou l'ibuprofène (Maupas et al., 2011). La surface des NCLs peut être modifiée par l'insertion de polysaccharides, modulant leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (Hirsjärvi et al., 2013a). Les NCLs peuvent également être fonctionnalisées avec des peptides, dans un but de vectorisation active permettant de cibler les cellules tumorales (Hirsjärvi et al., 2013b).

4.5.3. Toxicité des nanocapsules lipidiques

Très peu d'études évaluant la toxicité de NCLs sont disponibles dans la littérature. Une étude a notamment montré que la cytotoxicité des NCLs dans les cellules HaCaT dépendait de la nature du surfactant utilisé pour la formulation des nanocapsules, et une corrélation avec la toxicité du surfactant pur a été mise en évidence (Maupas et al., 2011).

Une activation modérée du complément a été observée pour des NCLs dans le test d'activation du complément *in vitro* (Hirsjärvi et al., 2013c). Par ailleurs, une comparaison entre des NCLs de trois tailles différentes (25, 50 et 100 nm) a montré que l'activation du complément augmentait avec la taille des NCLs. Une corrélation a également été mise en évidence par rapport à la longueur des chaînes de PEG à la surface des NCLs : la chaîne la plus courte induisait une plus faible activation du complément. Dans cette même étude, l'administration par voie intraveineuse des différentes NCLs chez des souris, après implantation préalable de tumeurs, a montré la présence de NCLs dans la circulation sanguine pendant 24h, une faible accumulation au niveau hépatique et une accumulation plus importante dans les ganglions lymphatiques. Une accumulation a également été observée au niveau des tumeurs. Aucune différence de distribution *in vivo* n'a été observée entre les différentes NCLs (Hirsjärvi et al., 2013c).

A notre connaissance, aucune donnée de génotoxicité n'est disponible dans la littérature pour les NCLs.

PARTIE 2. RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1. Utilisation du carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) comme témoin positif génotoxique nanoparticulaire et étude des mécanismes d'action

1.1. Utilisation du WC-Co comme témoin positif de référence sous forme nanoparticulaire dans les essais de génotoxicité *in vitro*

1.1.1. Présentation de l'article 1

L'exposition humaine aux nanoparticules est en augmentation constante, et l'évaluation de leur potentiel génotoxique revêt donc une importance certaine. Cependant, la pertinence des tests *in vitro* fréquemment utilisés pour les produits non-nanoparticulaire est souvent remise en cause. Un témoin positif de référence nanoparticulaire pour les essais de génotoxicité *in vitro* permettrait de vérifier si ces tests sont réellement pertinents, de les adapter et/ou d'en mettre au point de nouveaux. Aucune nanoparticule n'est à ce jour reconnue par la communauté scientifique comme témoin positif dans les essais de génotoxicité *in vitro*, ce qui constituerait une étape importante vers une meilleure évaluation des nanoparticules.

Dans cet article, nous avons étudié la possibilité d'utiliser des nanoparticules de WC-Co (WC-Co NP) comme témoin positif de référence dans des essais de génotoxicité *in vitro*. Cet alliage a été utilisé sous forme microparticulaire comme témoin positif dans des essais de micronoyaux *in vitro* et *ex vivo* (Muller et al., 2008). Nous avons donc évalué le potentiel génotoxique des WC-Co NP dans 3 tests standards de génotoxicité, évaluant différents niveaux d'évènements génétiques : dommages primaires à l'ADN, mutations géniques et dommages chromosomiques. Le test de mutations géniques *in vitro* sur cellules de mammifères (MLA-TK) ainsi que le test des micronoyaux sont des tests utilisés dans les études réglementaires et possèdent des lignes directrices de l'OCDE. Le test des comètes est quant à lui recommandé par l'Afssaps pour l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire. Deux types cellulaires ont été utilisés, la lignée de cellules de lymphome de souris L5178Y et des lymphocytes humains en culture primaire. Globalement, nos résultats sont en faveur de l'utilisation des WC-Co NP comme témoin positif de référence dans les tests de génotoxicité *in vitro*,

sous réserve de prendre en compte certains paramètres, tels que le type cellulaire et les durées de traitement. Les WC-Co NP n'ont pas induit de résultats clairement positifs dans les 3 essais réalisés dans les cellules de lymphome de souris L5178Y. Cependant, les lymphocytes humains se sont révélés plus sensibles aux effets génotoxiques induits par les WC-Co NP, en particulier après un traitement de 24 heures pour le test des micronoyaux *in vitro* et après un traitement de 4 heures pour le test des comètes *in vitro*. Dans de telles conditions, les WC-Co NP pourraient être utilisées comme témoin positif de référence dans les essais de génotoxicité *in vitro*.

1.1.2. Article 1

Tungsten carbide – cobalt (WC-Co) as a nanoparticulate reference positive control in *in vitro* genotoxicity assays.

Hélène Moche, Dany Chevalier, Nicolas Barois, Elisabeth Lorge, Nancy Claude, Fabrice Nesslany.

Toxicological Sciences 2014, Vol. 137(1), p.125–134.

Tungsten carbide – cobalt (WC-Co) as a nanoparticulate reference positive control in *in vitro* genotoxicity assays

Hélène Moche ^{*,†,‡}, Dany Chevalier [‡], Nicolas Barois [§], Elisabeth Lorge [†], Nancy Claude [†],
Fabrice Nessler ^{*,‡,1}

* Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France.

† Servier Group, 45520 Gidy, France.

‡ EA 4483, Université Lille 2, 59000 Lille, France.

§ Plateforme BICeL-IFR142, Institut de Biologie de Lille, 59021 Lille Cedex, France.

¹To whom correspondence should be addressed at Laboratoire de Toxicologie Génétique - Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France. E-mail: fabrice.nessler@pasteur-lille.fr.

ABSTRACT

With the increasing human exposure to nanoparticles (NP), the evaluation of their genotoxic potential is of significant importance. However, relevance for NP of the routinely used *in vitro* genotoxicity assays is often questioned, and a nanoparticulate reference positive control would therefore constitute an important step to a better testing of NP, ensuring that test systems are really appropriate. In the present study, we investigated the possibility of using WC-Co NP as reference positive control in *in vitro* genotoxicity assays, including two regulatory assays, the mouse lymphoma assay and the micronucleus assay, and in the comet assay, recommended for the toxicological evaluation of nanomedicines by the French Agency of Human Health Products (Afssaps). Through these assays, we were able to study different genetic endpoints, in two cell types commonly used in regulatory genotoxicity assays: the L5178Y mouse lymphoma cell line and primary cultures of human lymphocytes. Our results showed that the use of WC-Co NP as positive control in *in vitro* genotoxicity assays was conceivable, but that different parameters have to be considered, such as cell type and treatment schedule. L5178Y mouse lymphoma cells did not provide satisfactory results in the three performed tests. However, human lymphocytes were more sensitive to genotoxic effects induced by WC-Co NP, particularly after a 24-hour treatment in the *in vitro* micronucleus assay and after a 4-hour treatment in the *in vitro* comet assay. Under such conditions, WC-Co could be used as a nanoparticulate reference positive control in these assays.

Key Words: Nanoparticle, Comet assay, Micronucleus assay, Mouse lymphoma assay, Regulatory test

INTRODUCTION

Nanoparticles (NP) have interesting physico-chemical properties which explain their numerous applications. A NP is defined in the ISO/TS 27687 technical specification (ISO, 2008) as a material having its three dimensions in the nanoscale, *i.e.* between 1 and 100 nm. NP are used in many industries, and are nowadays present in many consumer goods, resulting in an increasing human exposure. The question of their toxicity, particularly their genotoxicity, is thus worth considering. Recent reviews indeed described different potential mechanisms for NP genotoxicity (Donaldson *et al.*, 2010; Magdolenova *et al.*, 2013). Genotoxicity may be mediated in the absence of inflammation by primary mechanisms, which can be classified as DNA-reactive and non-DNA-reactive. DNA-reactive mechanisms can be caused by NP themselves, as well as by reactive oxygen species (ROS) at the NP surface, which can induce oxidative DNA damage. Non-DNA-reactive mechanisms can be due to the interaction of NP with the cellular constituents involved in chromosome segregation during mitosis (e.g. mitotic spindle), leading to aneuploidy. Non-DNA-reactive mechanisms can also result from an increase in the ROS production by cellular constituents (e.g. mitochondria) induced by their interaction with NP and/or consecutively to the depletion in cellular antioxidants. Non-DNA-reactive mechanisms may also result from an inhibition of DNA repair. Finally, genotoxicity may also occur in the presence of inflammation through secondary mechanisms, because of the generation of ROS by inflammatory cells.

However, genotoxicity assays routinely used to test bulk materials may not be perfectly adapted to nanomaterials (Doak *et al.*, 2009; Landsiedel *et al.*, 2009; Magdolenova *et al.*, 2012). One example is the Ames test, a commonly used bacterial reversion mutation test, which is probably not relevant for the testing of NP. Indeed, endocytosis does not occur in bacteria and nanomaterials may not be able to diffuse through the bacterial wall, possibly leading to false-negative results (Singh *et al.*, 2009; Doak *et al.*, 2012). Some other tests require specific adjustments. For instance, cytochalasin B, used in the cytokinesis-block micronucleus assay, has been shown to inhibit the uptake of NP into the cells when added concomitantly with the NP (Doak *et al.*, 2009; Landsiedel *et al.*, 2009; Magdolenova *et al.*, 2012). Therefore, one of the recommended treatment schedules (OECD, 2010) for a long-term treatment, consisting of simultaneous exposure of cells with tested product and cytochalasin B, may not be relevant for NP. The surrogate option, consisting in the addition of cytochalasin B after the exposure to NP, may therefore be preferable.

Another weakness, frequently pointed out, is the absence of any adequate nano-scaled reference positive control (Gonzalez *et al.*, 2008; Landsiedel *et al.*, 2009; Warheit & Donner, 2010). The finding that tungsten carbide – cobalt (WC-Co) microparticles were

used as positive control in *in vitro* and *ex vivo* micronucleus assay in a rat lung epithelial (RLE) cell line and in rat type II pneumocytes (Muller *et al.*, 2008) lead us to study more specifically the nanoparticulate form of this alloy. WC-Co is used notably in the hard metal industry for the production of cutting tools and wear-resistant surfaces for its hardness. Occupational exposure to WC-Co has been associated with an increased risk of lung cancer (Moulin *et al.*, 1998; Wild *et al.*, 2000), and WC-Co was classified as probably carcinogenic to humans (group 2A) by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2006).

Most genotoxicity studies on WC-Co were conducted on micro-sized particles. *In vivo*, WC-Co microparticles induced positive responses in the comet and the micronucleus assays in rat type II pneumocytes (De Boeck *et al.*, 2003a). *In vitro*, they were found positive in the comet assay and the micronucleus test in human lymphocytes (Anard *et al.*, 1997; Van Goethem *et al.*, 1997; De Boeck *et al.*, 1998). More recently, WC-Co NP were studied in *in vitro* cytotoxicity assay in CaCo-2, HaCaT, A549 and OLN-93 cell lines and in primary rat brain cells (Bastian *et al.*, 2009), and in a micronucleus assay in HepG2 cell line (Kühnel *et al.*, 2012). Moreover, a comparison between WC-Co microparticles (average size 4µm) and NP (average size 80 nm) showed that NP were more reactive, inducing a greater oxidative stress (Ding *et al.*, 2009).

The aim of this study was to investigate the possibility of using WC-Co NP as reference positive control in *in vitro* genotoxicity assays. To accomplish this, the effects of WC-Co NP were studied in two regulatory tests, the mouse lymphoma assay (MLA-TK) and the micronucleus assay, and in the comet assay, recommended for the toxicological evaluation of nanomedicines by the French Agency of Human Health Products (Afssaps, 2011). Different endpoints were covered by these tests: mutagenic effects with the mouse lymphoma assay, chromosomal damage with the micronucleus assay and primary DNA damage with the comet assay.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

RPMI 1640, horse serum, foetal calf serum (FCS), non-essential amino acids and phosphate buffered saline (PBS) were purchased from GIBCO Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Giemsa reagent, penicillin, streptomycin, amphotericin B, mitomycin C (MMC, CAS No. 50-07-7), methyl methanesulfonate (MMS, CAS No. 66-27-3), Triton X-100, EDTA, trizma base, propidium iodide, KCl, NaCl, sodium bicarbonate, sodium pyruvate, trifluorothymidine (TFT), pluronic F68 solution, cytochalasin B and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Normal melting point agarose (NMPA) and low melting point agarose (LMPA) were purchased from Biorad (Marnes-la-Coquette, France), acetic acid from VWR (Fontenay-sous-bois, France), DMSO from Acros Organics (Noisy le Grand, France), NaOH, L-glutamine and absolute ethanol from Merck (Darmstadt, Germany), heparin from Choay (France), phytohaemagglutinin A (PHA) from Remel via Oxoid (Dardilly, France), and sterile water from Fresenius Kabi (Sevres, France).

Characteristics of WC-Co NP

WC-Co NP (8% w/w Co) were purchased from Nanostructured and Amorphous Materials, Inc. (Houston, Texas, USA). Certificate of analysis indicated 8.26% w/w Co with 0.73% w/w additive Cr and 0.48% w/w additive V. Purity was 99.5%, with major impurities being O (0.2% w/w) and Fe (0.056% w/w). Average particle size given by the supplier was 60 to 250 nm; specific surface area was 1.5 m²/g. Christallographic systems were hexagonal for WC and cubic for Co.

Preparation of WC-Co NP suspensions

Initial suspensions were prepared following a protocol described by Jensen *et al.* (Jensen *et al.*, 2011). A pre-wetting step was performed with 0.5% v/v ethanol and the appropriate volume of a solution of BSA, hereafter mentioned as BSA-water, was added. BSA-water was prepared by dissolving 0.05% w/v BSA in distilled water and sterile-filtered. Dispersion was obtained by probe-sonication for 16 min at 400W and 10% amplitude using a 400 Watt Branson Sonifier S-450D (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA). NP suspensions were cooled on ice to minimize heat-development during sonication.

Different concentrations of initial suspensions were prepared by diluting the dispersed suspension in BSA-water. These initial suspensions were then diluted 1:9 v/v in

cell culture medium at the time of cell treatment to obtain final suspensions. Because of the low stability of WC-Co NP suspensions, initial and final suspensions were carefully vortexed before each pipetting.

Characterization of WC-Co NP suspensions

Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed to measure the hydro-dynamic diameter of WC-Co NP and agglomerates/aggregates using a Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments, Orsay, France). The polydispersity index, reflecting the range of NP and agglomerates/aggregates size was also measured, with a value >0.2 indicating a polydispersed size distribution. Measurements were carried out on WC-Co NP suspensions in BSA-water and in the two culture media used in this study, containing 10 and 20% v/v serum. Before measurements, suspensions were diluted in ultrapure water.

Zeta potential measurements were also performed using the Zetasizer Nano-ZS instrument on WC-Co NP suspensions in BSA-water and in culture media. pH was approximately 8 in all analyzed suspensions.

A transmission electron microscopy (TEM) analysis was performed on WC-Co NP suspensions in BSA-water and in culture media. One drop of NP suspension was deposited on a formvar-coated copper grid and dried. Observations were carried out at 10000x and 40000x magnifications using a Hitachi H7500 transmission electron microscope equipped with a 1 Mpixels digital camera from AMT (Elexience, France). Analysis of size distribution of isolated NP was performed from TEM images of WC-Co NP suspension in complete RPMI medium using ImageJ software (Supplementary Fig. 1).

Cell culture

L5178Y cells. L5178Y tk^{+/-} mouse lymphoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Cells were thawed and seeded at a concentration of 1.33×10^5 cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 10% v/v heat-inactivated horse serum, 2 mg/mL sodium bicarbonate, 10 mL/L non-essential amino acids, 200 UI/mL penicillin, 5 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin B, 0.02% w/v L-glutamine, 0.02 mg/mL sodium pyruvate, 0.05% v/v pluronic F68 solution (hereafter referred to as RPMI 10) and incubated in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂. RPMI 20 corresponds to RPMI 10 but with 20% v/v heat-inactivated horse serum.

Human lymphocytes. Whole blood was obtained by venipuncture from non-smoking male and female healthy donors under 45, not recently exposed to any known mutagen or radiation, into lithium heparin Vacutainer tubes. For each condition, 0.5 mL whole blood was diluted 1:9 with complete RPMI medium, composed of RPMI 1640 medium supplemented with 20% v/v heat-inactivated FCS, 80 UI/mL heparin, 0.024% w/v L-glutamine, 400 UI/mL penicillin, 0.2 mg/mL streptomycin and phytohaemagglutinin A (PHA, 2%) for 44 hours in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂.

Cell treatment

L5178Y cells. Duplicate cultures of L5178Y cells were treated for 4 or 24 hours in RPMI 10 with different concentrations of WC-Co NP. For all treatments except for the 4-hour treatment in the MLA-TK, 1 mL of treatment suspension was added to 9 mL of cell suspension in RPMI 10 medium (cell concentrations of 1.25×10^5 cells/mL for the 24-hour MLA-TK, 2×10^5 cells/mL for the 4-hour comet and micronucleus assays and 5×10^4 cells/mL for the 24-hour comet and micronucleus assays). For the 4-hour treatment in the MLA-TK, 1 mL of treatment suspension was added to 8.5 mL of cell suspension in RPMI 10 medium (cell concentration of 5×10^5 cells/mL) and 0.5 mL of KCl 150 mM. Positive control for the MLA-TK and the comet assay was MMS at a final concentration of respectively 10 µg/mL and 2 µg/mL for the 4-hour and the 24-hour treatments in the MLA-TK and 15 µg/mL and 4 µg/mL for the 4-hour and the 24-hour treatments in the comet assay. Positive control for the micronucleus assay was MMC at a final concentration of 0.2 µg/mL or 0.025 µg/mL for the 4-hour and 24-hour treatments. Treatments were conducted in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂ and under agitation on a rotor to allow interaction between NP and cells.

Human lymphocytes. At the end of the preculture, PHA-stimulated human lymphocytes (whole blood) were incubated during 4 or 24 hours with different concentrations of WC-Co NP. Treatment suspensions were diluted 1:9 in complete RPMI medium containing blood. Positive control for the comet assay was MMS at a final concentration of 10 µg/mL for both treatment times. Positive control for the micronucleus assay was MMC at a final concentration of respectively 0.15 µg/mL or 0.075 µg/mL for the 4-hour and 24-hour treatments. Treatments were conducted in a shaking water bath at 37°C.

L5178Y tk^{+/-} mouse lymphoma assay (MLA-TK)

MLA-TK (microwell method) was performed in compliance with the OECD Test Guideline 476 (OECD, 1997) but only without metabolic activation. At the end of the treatment period, cells were washed with RPMI 10, counted using a hemocytometer, replated in RPMI 20 medium (mean of 1.6 cells per well, 2 microtiter plates per concentration) and placed in an incubator at 37°C and 5% CO₂.

The remaining cells were incubated at a density of 2×10^5 cells/mL in RPMI 10 medium for a 48-hour expression time. Cell counts were performed 24 and 48 hours after incubation in order to maintain exponential growth during all the expression time. Then the cells were plated, firstly in RPMI 20 medium at 1.6 cells per well (2 plates per concentration) to determine both the relative total growth and the plating efficiency at day 2, and secondly in selective medium containing 3 µg/mL TFT at 2×10^3 cells per well (4 plates per dose) to determine mutation frequency (MF). After an incubation time of 10-14 days at 37°C and 5% CO₂, plates containing cells in non-selective medium were scored for negative wells for assessment of survival rate and relative total growth (RTG), while plates containing TFT-selective medium were scored independently for "large" and "small" TFT resistant colonies. The criteria for acceptance were the ones recommended (Moore *et al.*, 2006): positive responses were defined as those where the induced MF in treated cultures exceeded the global evaluation factor of +126 mutants per 10^6 cells, associated with a dose-related increase in MF.

Alkaline comet assay

The comet assay was performed under alkaline conditions (pH>13) in compliance with a previously described protocol (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000).

At the end of the treatment period, L5178Y cells were washed and resuspended in RPMI 10. Viable cells were counted using Trypan blue exclusion. For the comet assay, 4×10^4 viable cells were mixed with 0.5% w/v LMPA kept at 37°C, while the remaining cell suspension was incubated in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂ for a 20-hour recovery period before harvest for the micronucleus test and the cytotoxicity assessment (see hereafter Micronucleus assay in L5178Y cells section).

At the end of the treatment period, human lymphocytes were washed, centrifuged, supernatant was discarded and 30 µL of the cell pellet was mixed with 0.5% w/v LMPA kept at 37°C for the comet assay, while the remaining cells were resuspended in complete RPMI and incubated in presence of 6 µg/mL cytochalasin B in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂ for a 20-hour recovery period before harvest for the

cytokinesis-block micronucleus assay and the cytotoxicity assessment (see hereafter Cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes section).

Cells embedded in LMPA were spread onto regular precoated microscopic slides (1.5% and 0.8% w/v NMPA). For each concentration and culture, 2 duplicate slides were prepared. All the following steps were sheltered from daylight to prevent the occurrence of additional DNA damage. Slides were immersed for at least 1 hour at 4°C in a cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma Base, pH 10, supplemented with 1% v/v Triton X-100 and 10% v/v DMSO), and washed in distilled water. The slides were then placed in a horizontal tank filled with fresh electrophoresis solution (1 mM EDTA and 300 mM NaOH, pH>13) for 20 min to allow DNA unwinding and expression of single-strand breaks and alkali-labile sites. Next, electrophoresis was performed for 20 min using an electric current of 0.7 V/cm. Slides were then placed for 10 min in a neutralization solution (0.4 M Trizma base, pH 7.5) and gels were dehydrated by immersion in absolute ethanol for 5 min. Finally, slides were air-dried and stored at room temperature.

Slides were independently coded and analyzed blind after addition of propidium iodide (20 µg/ml in distilled water) and a coverslip on each slide. Slides were then examined at 250x magnification using a fluorescence microscope (Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Heerbrugg, Switzerland) equipped with an excitation filter of 515-560 nm and a 590 nm barrier filter, connected through a gated CCD camera to Comet Image Analysis System software, version 4.0 (Perceptive Instruments Ltd., Haverhill, United Kingdom). Four hundred randomly selected cells per test condition (100 cells from each of the two replicate slides in the two cultures) were scored. Tail intensity, defined as the percentage of DNA that had migrated from the head of the comet into the tail, was used as the measure of damage. Ghost cells, corresponding to either genotoxic or cytotoxic damage, were enumerated for the 100 cells per slide. Results were expressed as the percentage of ghost cells amongst total cells.

Micronucleus test

Micronucleus test was performed in compliance with the OECD Test Guideline 487, but only without metabolic activation, in the presence of cytochalasin B in human lymphocytes and in the absence of cytochalasin B in L5178Y mouse lymphoma cells.

Micronucleus test in L5178Y cells. At the end of the 20-hour recovery period, cells were counted using a hemocytometer and the relative population doubling (RPD) was calculated to assess cytotoxicity. After centrifugation at 1000 rpm for 6 min, supernatant was discarded and cells were treated for 4 min with a hypotonic solution (RPMI 1640

medium diluted 1:1 in distilled water). After the hypotonic shock, a pre-fixation step was performed by adding cold Carnoy's fixative (absolute ethanol/glacial acetic acid, 3:1 v:v). Cells were then centrifuged and suspended in Carnoy's fixative for 24 hours at 4°C. After another centrifugation, cells were resuspended in 0.5 mL of cold Carnoy's fixative and spread on duplicate glass slides. Slides were air-dried at least over-night and stained for 10 min with 4% v/v Giemsa in water.

Slides were independently coded. Micronuclei, identified according to recommended criteria (Fenech *et al.*, 2003), were scored at 500x magnification in 1000 intact mononucleated cells per slide. For each concentration, micronuclei were scored in 2000 cells per duplicate culture.

Cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. At the end of the 20-hour recovery period, cells were washed and centrifuged at 1000 rpm for 6 min. Cells were then treated for 10 min with a hypotonic solution (RPMI 1640 diluted 1:4 in distilled water supplemented with FCS 2% v/v). At the end of the hypotonic shock, a pre-fixation step was performed by adding cold Carnoy's fixative (absolute ethanol/glacial acetic acid, 3:1 v:v). Cells were then centrifuged and fixed with cold Carnoy's fixative for at least 10 min at room temperature. After another centrifugation, cells were spread on duplicate glass slides. Slides were air-dried at least over-night and stained for 10 min with 5% v/v Giemsa in water.

As a measure for cell cycle delay and/or cytotoxicity, the replication index (RI) was calculated. Slides were finally independently coded. Micronuclei, identified according to recommended criteria (Fenech *et al.*, 2003), were scored at 500x magnification in 500 intact binucleated cells and 500 intact mononucleated cells per slide. For each concentration, the frequency of micronuclei was obtained from 1000 binucleated cells and 1000 mononucleated cells per duplicate culture.

Statistical analysis

In MLA-TK, each treatment was compared with the control using the one-sided Dunnett's test for multiple comparisons with the same control. For the comet assays, the non-parametric Mann-Whitney U-test was used to evaluate the statistical difference in tail intensity between each dose and the negative control. Statistical analyses were performed with StatView[®] Software (version 5.0, SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina 27513, USA). Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant. Percentage of ghost cells in treated groups was compared to control with the Chi²-test. Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant. For the micronucleus assays, the statistical significance of difference between groups was

determined using the Chi²-test. Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Characterization of WC-Co NP suspensions

Initial WC-Co NP suspension in BSA-water and final suspensions in RPMI 10 medium and complete RPMI medium were characterized in terms of size and zeta potential (Table I). In each analyzed suspension, size measurements by DLS were not relevant, because of the broad-ranged size distribution, indicated by a high polydispersity index. This was particularly noticeable in initial suspension, and confirmed by the TEM analysis, showing both isolated NP and agglomerates or aggregates of different sizes, up to a few micrometers (Figure 1A). In return, in final suspensions in both culture media, size distribution seemed to be narrower, with the presence of isolated NP and agglomerates or aggregates of limited size, according to the slightly lower polydispersity indexes and the TEM analysis (Figures 1B and C). These final suspensions were characterized by a higher protein content than initial suspension. A similar observation was made on WC and WC-Co NP, which agglomerated in medium without FCS, but not in presence of 5 or 10% v/v FCS (Bastian *et al.*, 2009; Kühnel *et al.*, 2009; Kühnel *et al.*, 2012). Size distribution of isolated NP measured from TEM images of WC-Co NP suspension in complete RPMI medium ranged from 20 to 160 nm, with 67.8% NP between 50 and 90 nm (Supplementary Fig. 1). Zeta potential was negative for all suspensions, and absolute value decreased between initial and final suspensions.

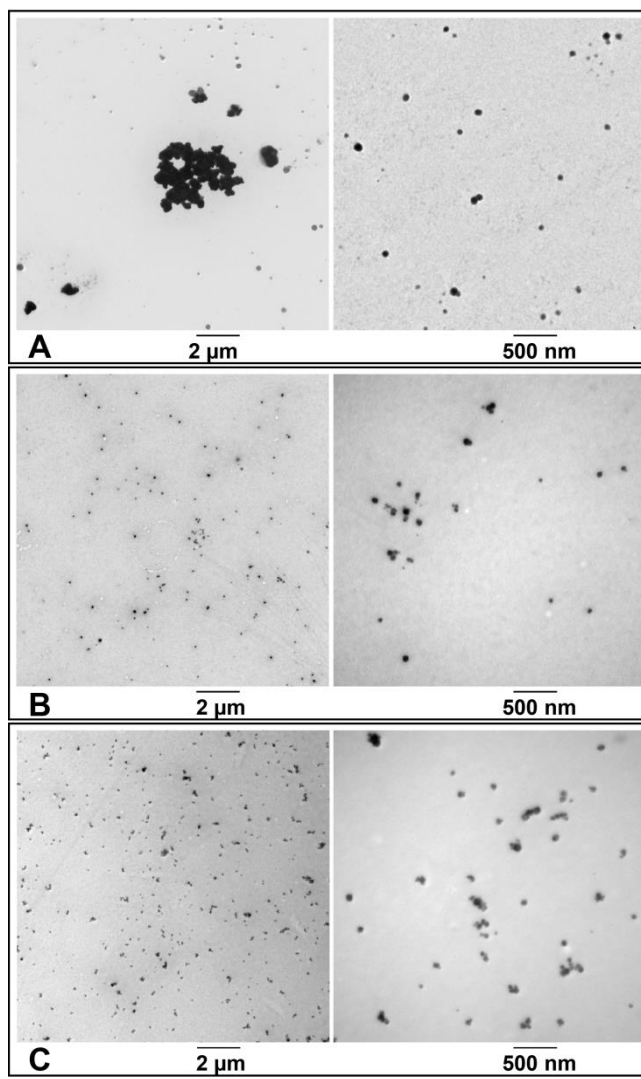


FIG. 1. TEM images of tungsten carbide-cobalt initial (A) and final suspensions obtained from 1:9 dilution of initial suspensions in RPMI 10 medium (10 % vol/vol horse serum) (B) or complete RPMI medium (20 % vol/vol foetal calf serum) (C).

MLA-TK

MLA-TK was performed in L5178Y cells after 4 and 24 hours of treatment. WC-Co NP concentrations were chosen following preliminary cytotoxicity studies (data not shown), with the highest analyzed concentration resulting in a RTG approximately between 10 and 20%, as requested in the OECD Test Guideline 476 (OECD, 1997). The RTG was 22.9% at the highest concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the 4-hour assay, and 11.2% at the highest concentration of 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the 24-hour assay. According to the acceptance criteria for negative and positive controls (Moore *et al.*, 2006), the suspension growth value of the negative control (mean of the 2 cultures) ranged from 8 to 32 in the 4-hour assay (suspension growth of 16), and above 32 in the 24-hour assay

(suspension growth of 61). The cloning efficiency of the negative control (mean of the 2 cultures) ranged from 65 to 120% (94% for the 4-hour assay and 108% for the 24-hour assay) at the time of mutant selection. The MF of the negative control ranged from 50 to 170×10^{-6} mutants (126×10^{-6} for the 4-hour assay and 94×10^{-6} for the 24-hour assay). MMS, used as positive control, yielded a small colony IMF of 577×10^{-6} for the 4-hour treatment and 182×10^{-6} for the 24-hour treatment, i.e. higher than 150×10^{-6} .

After the 4-hour treatment, WC-Co NP induced a concentration-related increase in MF, statistically and biologically significant, i.e. with an IMF greater than the global evaluation factor of 126×10^{-6} , at the highest analyzed concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2A). After 24 hours of treatment, WC-Co NP also induced a biologically significant increase in the mutation frequency of total mutants at the highest concentration of 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2B).

Interestingly, small colony MF was particularly increased, with a statistically significant increase at the highest concentration in both treatment schedules.

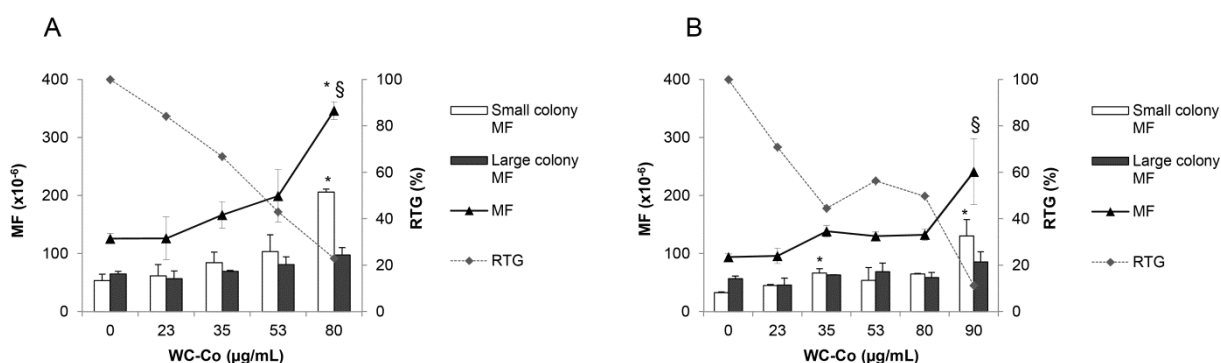


FIG. 2. MF ($\times 10^{-6}$), small colony MF ($\times 10^{-6}$) and large colony MF ($\times 10^{-6}$) induced by WC-Co NP in L5178Y cells after a 4-hour (A) or 24-hour (B) treatment. Cytotoxicity was assessed by the RTG (% of negative control). Mean \pm SD data for 2 duplicate cultures. The IMF for methyl methanesulfonate, used as positive control, was 880×10^{-6} in the 4-hour treatment (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 258×10^{-6} in the 24-hour treatment (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $p < 0.05$ (Dunnett's test). § Biologically significant ($>$ global evaluation factor, +126). Abbreviations: IMF, induced mutation frequency; MF, mutation frequency; RTG, relative total growth.

Micronucleus assay in L5178Y cells

Micronuclei formation was assessed in L5178Y cells, after 4 or 24 hours of treatment with WC-Co NP, followed by a 20-hour recovery period. Studied concentrations were chosen after preliminary cytotoxicity assays (data not shown), and induced a RPD greater than $45 \pm 5\%$, as recommended by the OECD Test Guideline 487

(OECD, 2010). The RPD was 43.2% for the highest analyzed concentration after the short-term treatment and 51.7% after the long-term treatment. The population doubling value of the negative control was 1.7 in the short-term treatment and 3.5 in the long-term treatment.

WC-Co NP induced a statistically significant increase in the number of micronucleated cells (MN cells) at the concentrations of 80 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the 4-hour treatment (Figure 3A), and at the concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the 24-hour treatment (Figure 3B). These increases, associated with decreased RPD, were relatively weak, with only twice the number of micronuclei of the negative control.

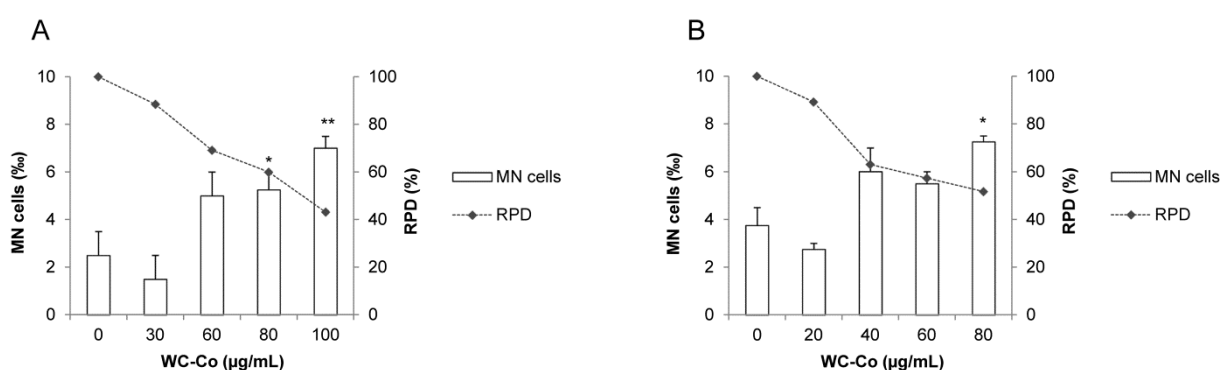


FIG. 3. Frequency of MN cells (%) in L5178Y cells after a 4-hour (A) or 24-hour (B) treatment with WC-Co NP followed by a 20-hour recovery period. Cytotoxicity was assessed by the RPD (% of negative control). Micronuclei were scored in 1000 intact cells per duplicate slide per culture. Mean \pm SD data for 2 duplicate cultures. Mitomycin C was used as positive control and induced 82% and 85.5% MN cells in the short-term and long-term treatment (0.2 and 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Chi² test). Abbreviations: MN, micronucleated; RPD, relative population doubling.

Cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes

Micronuclei formation was also assessed in human lymphocytes from 2 different donors, after 4 or 24 hours of treatment with WC-Co NP, followed by a 20-hour recovery period with cytochalasin B. Studied concentrations were chosen after preliminary cytotoxicity assays, and induced a RI greater than 45 \pm 5%, as recommended by the OECD Test Guideline 487 (OECD, 2010). The RI was 54.4% for the highest analyzed concentration after the short-term treatment and 59.8% after the long-term treatment. The cytokinesis-block proliferation index (CBPI) value of the negative control was 1.89 in the short-term assay and 1.75 in the long-term assay. Binucleated and mononucleated

MN cells were scored, as aneugenic compounds may induce an increase in the number of mononucleated MN cells (Elhajouji *et al.*, 1998).

WC-Co NP induced a statistically significant increase in the number of binucleated MN cells at the intermediate concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after the 4-hour treatment (Figure 4A), and at each analyzed concentration after the 24-hour treatment (Figure 4B). This was associated with a decrease in RI. After the long-term treatment, the increase in the number of binucleated MN cells was thus more important, and a statistically significant increase in the number of mononucleated MN cells was also observed.

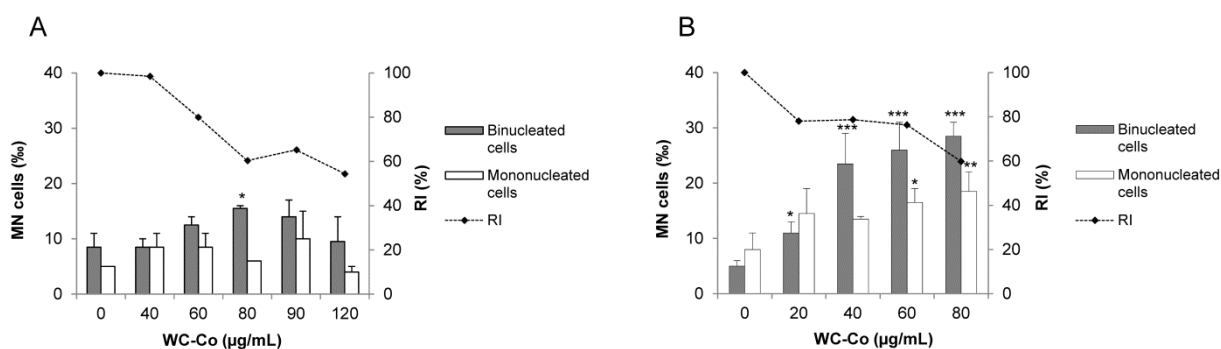


FIG. 4. Frequency of MN cells (%) in human lymphocytes after a 4-hour (A) or 24-hour (B) treatment with WC-Co NP followed by a 20-hour recovery period in presence of cytochalasin B. Cytotoxicity was assessed by the RI (% of negative control). Micronuclei are scored in 500 binucleated and 500 mononucleated cells per duplicate slide per donor. Mean \pm SD data for two donors. MMC, used as positive control, induced 77% and 9% binucleated and mononucleated MN cells in the short-term treatment (0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and 184% and 68% binucleated and mononucleated MN cells in the long-term treatment (0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Chi² test). Abbreviations: MN, micronucleated; RI, replication index.

Comet assay in human lymphocytes and in L5178Y cells

Primary DNA damage was assessed using the comet assay. Cytotoxicity was measured with the same methods as those used for the micronucleus assays, i.e. after the 1.5 to 2 cell cycle recovery periods following treatments, ensuring evaluation of viable cells at the selected concentrations. For technical convenience, comet assays may have been performed separately or concurrently to micronucleus assays. In the case of separate assays, analyzed concentrations in the comet assay and in the micronucleus assay might be different, due to a slight variability of cytotoxicity between the two assays. However, this had no impact on the interpretation. In human lymphocytes, the RI was 46.2% for the highest concentration of 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the short-term assay and 52.5% for the highest concentration of 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the long-term assay. In L5178Y cells, the

RPD was 43.2% for the highest concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the short-term assay and 55.1% for the highest concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the long-term assay.

In human lymphocytes, a concentration-dependent increase in DNA migration was observed after 4 hours of treatment. The response was statistically significant at the concentrations of 60, 80 and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 5A). The percentage of ghost cells increased alongside DNA migration, showing the same dose-response relationship. Based on the simultaneous increase in DNA fragmentation and cytotoxicity data in the associated micronucleus assay (Figure 4A), ghost cells could represent both genotoxic and cytotoxic damage.

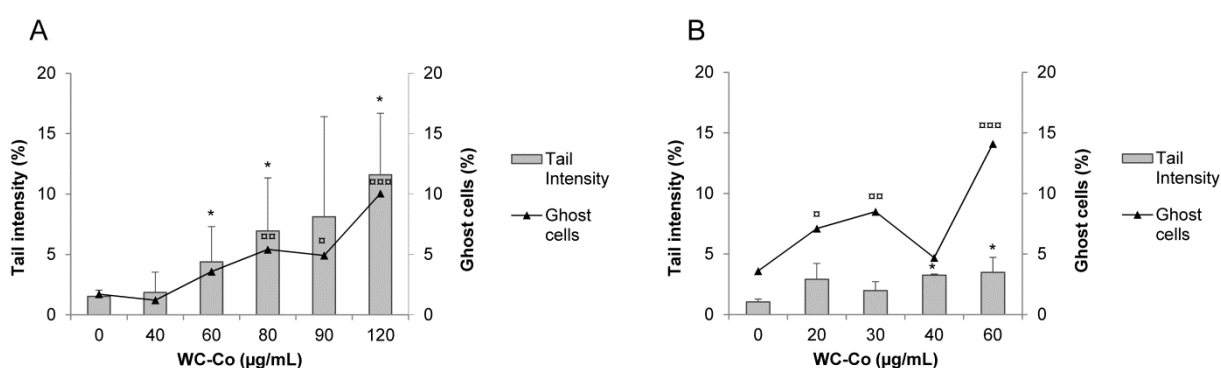


FIG. 5. DNA migration (tail intensity, %) and frequency of ghost cells (%) in human lymphocytes after a 4-hour (A) or 24-hour (B) treatment with WC-Co NP. A total of hundred cells were scored per duplicate slide per donor. Mean \pm SD data for 2 donors. MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control and induced 20.5% DNA migration and 34.1% ghost cells after the 4-hour treatment and 8.9% DNA migration and 20.7% ghost cells after the 24-hour treatment. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test), ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (Chi² test).

Interestingly, an important variability of response was observed between the two donors. To confirm this observation, a second assay was performed using the same donors, and similar results were obtained. Figure 6 represents DNA migration induced by WC-Co NP for each donor and experiment. DNA migration was greater for donor A than for donor B in both experiments, and an inter-experiment heterogeneity was also noticed. However, when combining results of the two experiments for each donor, a statistically significant increase was still observed for both donors at the WC-Co NP concentrations of 60, 80 and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, compared to the negative control values.

After 24 hours of treatment, a statistically significant increase in DNA migration, yet weaker than after the 4-hour treatment, was observed at the highest concentrations

of 40 and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 5B). The number of ghost cells was increased in a statistically significant manner at the concentrations of 20, 30 and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

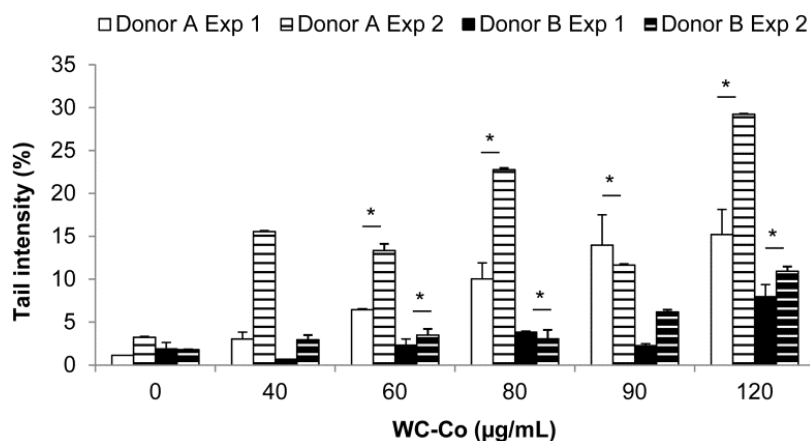


FIG. 6. DNA migration (tail intensity, %) in human lymphocytes after a 4-hour treatment with WC-Co NP, determined in two experiments with the same two donors. A total of hundred cells were scored per slide. Mean \pm SD data for 2 duplicate slides. * Statistically significant difference ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) between treated cells and negative control for the combined results of the two experiments for each donor.

In L5178Y cells, no increase in DNA migration was observed after treatment for either 4 or 24 hours (Figure 7A-B), but the number of ghost cells slightly increased in a statistically non-significant manner at the highest concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the short-term treatment and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the long-term treatment.

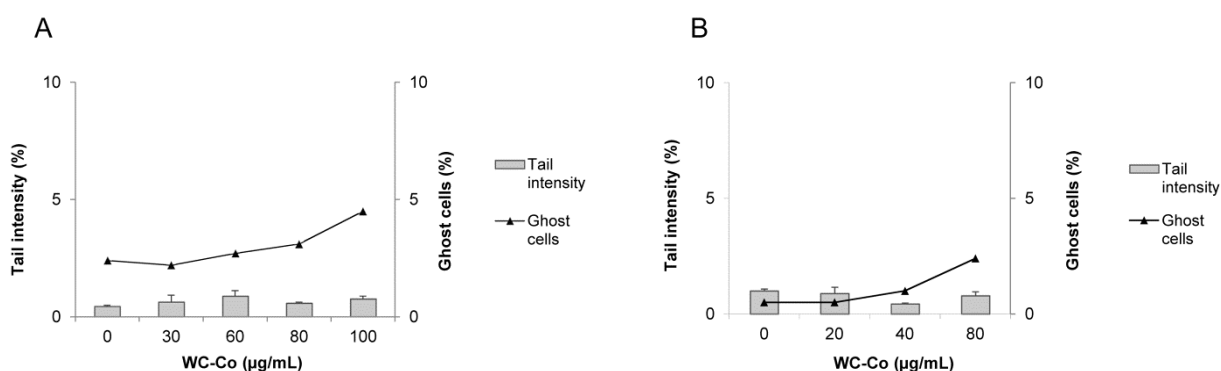


FIG. 7. DNA migration (tail intensity, %) and frequency of ghost cells (%) in L5178Y cells after a 4-hour (A) or 24-hour (B) treatment with WC-Co NP. A total of hundred cells were scored per duplicate slide per culture. Mean \pm SD data for 2 cultures. MMS was used as positive control and induced 17.6% DNA migration and 52% ghost cells after the 4-hour treatment and 4.1% DNA migration and 0.2% ghost cells after the 24-hour treatment. No statistically significant differences with negative controls were observed.

DISCUSSION

A nanoparticulate reference positive control for *in vitro* genotoxicity assays would constitute an important step to a better testing of nanomaterials, ensuring that test systems are actually appropriate to such test items. Some NP have been proposed as positive control for nanotoxicology. The most used of them, ZnO NP, induced positive but also equivocal responses in several cell lines (Di Bucchianico *et al.*, 2013). A recent study proposed differently shaped CuO NP (spheres, spindles and rods), inducing positive responses in the micronucleus assay and the comet assay in the RAW 264.7 murine macrophage cell line and, with a lower amplitude, in human lymphocytes (Di Bucchianico *et al.*, 2013). The heterogeneity of nanomaterials should also be taken into account for the choice of positive control. Indeed, every nano-objects, with one, two or three external dimensions in the nanoscale (NP, nanofiber and nanoplate) and nanostructured materials, with internal or surface nanostructure (ISO, 2008), may not interact with test systems exactly in the same way.

The aim of the present study was to evaluate WC-Co NP as a candidate reference positive control. For this purpose, different endpoints were analyzed using three *in vitro* genotoxicity assays, amongst them two regulatory assays: OECD Test Guideline 476 (OECD, 1997) for the MLA-TK and OECD Test Guideline 487 (OECD, 2010) for the micronucleus assay.

To assess the mutagenic activity, we chose to use the MLA-TK, performed in mammalian cells. Our results showed that WC-Co NP have a weak mutagenic potential *in vitro*. For each treatment time, significant increases in MF were observed at the highest concentrations of 80 µg/mL in the 4-hour treatment and 90 µg/mL in the 24-hour treatment, associated with a high level of cytotoxicity (RTG between approximately 10 and 20%). Small colony MF was particularly increased, which suggested a clastogenic activity. No other results were available in literature concerning the *in vitro* mutagenic effects induced by WC-Co, even for its microparticulate form. Due to the weak response and the narrow range of concentrations leading to a biologically significant effect due to a steep curve, the routine use of WC-Co NP as positive reference control in the MLA-TK seems to be difficult.

A micronucleus assay using the mouse lymphoma L5178Y cell line, used in MLA-TK, was performed. We also carried out the cytokinesis-block micronucleus assay using primary cultures of human peripheral blood lymphocytes, where cytochalasin B was added at the end of the treatment periods in order to avoid any potential interaction with NP uptake by cells (Doak *et al.*, 2009). The use of both cell types was validated in international studies for regulatory micronucleus assay (Clare *et al.*, 2006; Oliver *et al.*, 2006). In L5178Y cells, WC-Co NP induced a statistically significant increase in the

number of MN cells after both short- and long-term treatments. In human lymphocytes, a weak response was observed in the short-term treatment (4 hours followed by a 20-hour recovery period). The maximum and statistically significant response was observed at the intermediary concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. However, after a long-term treatment (24 hours followed by a 20-hour recovery period), this assay was clearly positive, with a dose-response relationship and a statistical significance for each WC-Co NP concentration, from 20 to 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, in binucleated cells and for the two highest concentrations of 60 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in mononucleated cells. One explanation for this treatment schedule-dependent difference in response could be that the long-term treatment allows exposing cells all along the cell cycle, and the NP access to DNA may be facilitated when the nuclear membrane disassembles during mitosis (Doak *et al.*, 2012). Cellular uptake of similar WC-Co NP was previously studied (Bastian *et al.*, 2009), who demonstrated the presence of NP or agglomerates inside the cytoplasm of HaCaT, A549 and OLN-93 cells incubated with WC-Co NP for 2 days, but did not detect any NP inside the nucleus.

Our positive results in the micronucleus assay are in accordance with published data on WC-Co microparticles, in isolated human leukocytes (Van Goethem *et al.*, 1997) and RLE cells (Muller *et al.*, 2008). However, WC-Co NP did not induce micronuclei in HepG2 cells (Kühnel *et al.*, 2012). One explanation could be that they chose a 3-hour treatment with low concentrations inducing only weak cytotoxicity, while our positive results were associated with a significant decrease in cell viability and were maximized in human lymphocytes after the 24-hour treatment. Moreover, the cell type was different.

After the long-term treatment in human lymphocytes, WC-Co NP unexpectedly induced an increase in the number of micronuclei both binucleated and mononucleated cells. This was not observed in another study (De Boeck *et al.*, 2003b), where only binucleated MN cells were increased after treatment of human lymphocytes with WC-Co microparticles. Besides the particle size, the short 15-minute duration of treatment duration of treatment could explain the difference in results, as we observed a statistically significant increase in the number of mononucleated MN cells in the long-term treatment.

Based on the present study, the use of WC-Co NP as a positive control in the micronucleus assay is applicable only for the long-term treatment of human lymphocytes. Indeed, even if a statistically significant effect was observed in L5178Y cells and after the short-term treatment in human lymphocytes, the response amplitude was rather low. The use of WC-Co NP as positive reference control in the micronucleus assay is thus conceivable, depending on the cell type and the treatment schedule.

However, WC-Co NP does not constitute a perfect positive control for the *in vitro* comet assay. Although WC-Co NP induced a dose-dependent increase in DNA migration in human lymphocytes after the 4-hour treatment, the response amplitude was lower after the long-term treatment. Concurrently, no DNA damage was detected in L5178Y cells after neither treatment schedules, meaning that the response depends on the origin of the cell type.

An oxidative mechanism of action was proposed for WC-Co microparticles (Lison *et al.*, 1995): electrons released by cobalt oxidation could be transferred to the surface of WC where they could reduce oxygen and generate ROS. Therefore, the difference of response observed between the two cell types in the comet assay could be due to a variability in antioxidant capacities, leading to an over-fragmentation of DNA in L5178Y cells, while in human lymphocytes WC-Co NP induced detectable damage. This hypothesis is supported by the significant heterogeneity observed for the highest WC-Co NP concentrations between the two donors in the comet assay on human lymphocytes. This was also observed for WC-Co microparticles in a comet assay on isolated human lymphocytes (De Boeck *et al.*, 1998), and could be partly due to interindividual differences in antioxidant status. In our study, this may be the particular case as we used whole blood, with erythrocytes that contain antioxidants. Such interindividual variability was not observed in the micronucleus assay, which could be related to the nature of the cells scored in each assay, i.e. PHA-stimulated T lymphocytes in the micronucleus assay, and peripheral blood mononuclear cells in the comet assay (De Boeck *et al.*, 2003b).

In general, our results show an apparent lack of sensitivity of L5178Y mouse lymphoma cells compared to human lymphocytes to detect the effects of WC-Co NP. Besides the hypothesis of different antioxidant capacities, this could be explained by the different origins of these cells, i.e. human or murine, or by their p53 status, human lymphocytes being p53-proficient and L5178Y cells p53-deficient. The importance of the choice of cell type was highlighted by a study showing different sensitivity of 10 cell lines toward cytotoxicity induced by 23 nanomaterials (Kroll *et al.*, 2011). This is however a concern even for studies on soluble chemicals, and a recommendation was made for *in vitro* genotoxicity tests to use human p53-competent cells (Pfuhrer *et al.*, 2011).

CONCLUSIONS

We showed in this study that several experimental parameters directly influence the nature of the response to WC-Co NP. First, cell type has to be chosen carefully, as WC-Co NP induced different results in human lymphocytes and in L5178Y cells, particularly in the *in vitro* comet assay. Moreover, when using human lymphocytes, the recommendation is to use several blood cultures from multiple donors, because of the interindividual variability. The choice of treatment schedule is also important: in human lymphocytes, the maximal response was observed after the short-term treatment in the comet assay, whereas a long-term treatment was required for the micronucleus assay. Furthermore, attention should be paid to the range of concentrations used, as statistically and biologically significant genotoxic effects were sometimes observed only at subtoxic concentrations. The use of several different concentrations may therefore be relevant to ensure a positive response associated with an acceptable cytotoxicity. Under the conditions of our study, the optimal WC-Co NP concentration for its use as a positive control in the *in vitro* micronucleus assay was 80 µg/mL after a long-term treatment in human lymphocytes. For the *in vitro* comet assay, the maximal response was obtained with a concentration of 120 µg/mL after the 4-hour treatment in human lymphocytes. In the case of L5178Y mouse lymphoma cells, neither the comet assay nor the micronucleus assay were clearly positive. In the MLA-TK, WC-Co NP induced only a weak positive response, making their use as positive reference control difficult in this assay. This corroborates the Afssaps report on nanomedicines (Afssaps, 2011), which advises the use of human rather than murine cells. Taking into account these technical issues, WC-Co NP could be used as positive reference NP in *in vitro* standard genotoxicity assays.

FUNDING

French National Association for Research and Technology (ANRT) Grant no. 265/2011. Servier Group.

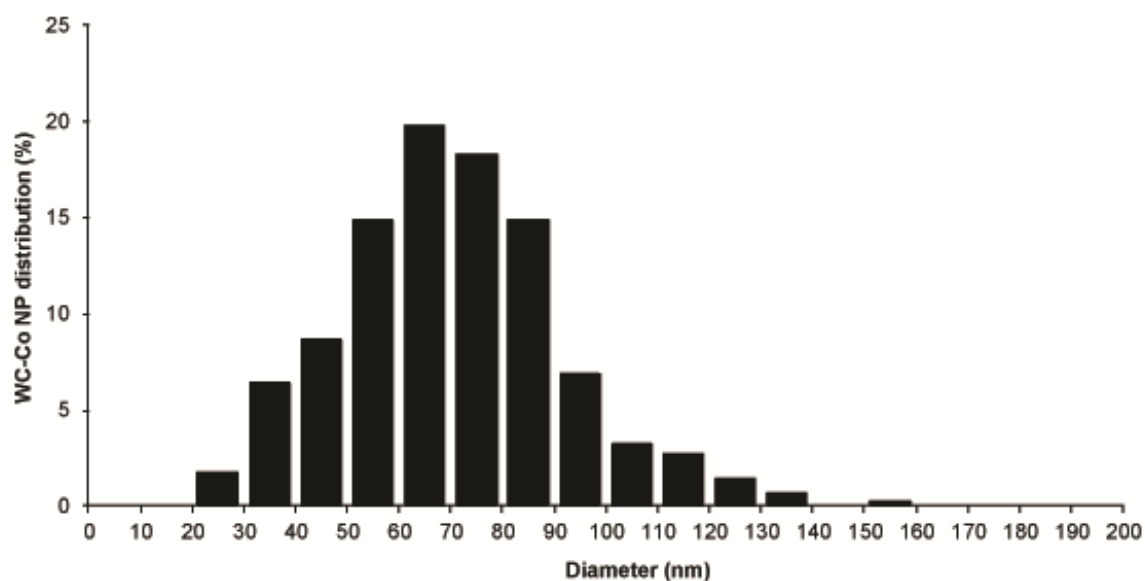
REFERENCES

- Afssaps. (2011). Recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire. Available at http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/7042aee471537987a082180039a5bded.pdf. Accessed on December 5, 2011.
- Anard, D., Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Belpaeme, K. & Lison, D. (1997). In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays. *Carcinogenesis* **18**, 177–184.
- Bastian, S., Busch, W., Kühnel, D., Springer, A., Meissner, T., Holke, R., Scholz, S., Iwe, M., Pompe, W., Gelinsky, M., Potthoff, A., Richter, V., Ikonomidou, C. & Schirmer, K. (2009). Toxicity of tungsten carbide and cobalt-doped tungsten carbide nanoparticles in mammalian cells in vitro. *Environ. Health Perspect.* **117**, 530–536.
- De Boeck, M., Hoet, P., Lombaert, N., Nemery, B., Kirsch-Volders, M. & Lison, D. (2003a). In vivo genotoxicity of hard metal dust: induction of micronuclei in rat type II epithelial lung cells. *Carcinogenesis* **24**, 1793–1800.
- De Boeck, M., Lison, D. & Kirsch-Volders, M. (1998). Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis* **19**, 2021–2029.
- De Boeck, M., Lombaert, N., De Backer, S., Finsy, R., Lison, D. & Kirsch-Volders, M. (2003b). In vitro genotoxic effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. *Mutagenesis* **18**, 177–186.
- Clare, M.G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. & Lorge, E. (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II. Using human lymphocytes. *Mutat. Res.* **607**, 37–60.
- Di Bucchianico, S., Fabbri, M.R., Misra, S.K., Valsami-Jones, E., Berhanu, D., Reip, P., Bergamaschi, E. & Migliore, L. (2013). Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. *Mutagenesis* **28**, 287–299.
- Ding, M., Kisin, E.R., Zhao, J., Bowman, L., Lu, Y., Jiang, B., Leonard, S., Vallyathan, V., Castranova, V., Murray, A.R., Fadeel, B. & Shvedova, A.A. (2009). Size-dependent effects of tungsten carbide-cobalt particles on oxygen radical production and activation of cell signaling pathways in murine epidermal cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **241**, 260–268.
- Doak, S.H., Griffiths, S.M., Manshian, B., Singh, N., Williams, P.M., Brown, A.P. & Jenkins, G.J.S. (2009). Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* **24**, 285–293.
- Doak, S.H., Manshian, B., Jenkins, G.J.S. & Singh, N. (2012). In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat. Res.* **745**, 104–111.
- Donaldson, K., Poland, C.A. & Schins, R.P.F. (2010). Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology* **4**, 414–420.

- Elhajouji, A., Cunha, M. & Kirsch-Volders, M. (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* **13**, 193–198.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **534**, 65–75.
- Van Goethem, F., Lison, D. & Kirsch-Volders, M. (1997). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat. Res.* **392**, 31–43.
- Gonzalez, L., Lison, D. & Kirsch-Volders, M. (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology* **2**, 252–273.
- IARC. (2006). Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Humans World Heal. Organ. Int. Agency Res. Cancer* **86**, 1–294.
- ISO. (2008). ISO/TS 27687:2008 - Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate.
- Jensen, K.A., Kembouche, Y., Christiansen, E., Jacobsen, N.R., Wallin, H. & Guiot, C. (2011). Final Protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media. Available at <http://www.nanogenotox.eu/files/PDF/web%20nanogenotox%20dispersion%20protocol.pdf>. Accessed on November 30, 2011.
- Kühnel, D., Busch, W., Meissner, T., Springer, A., Potthoff, A., Richter, V., Gelinsky, M., Scholz, S. & Schirmer, K. (2009). Agglomeration of tungsten carbide nanoparticles in exposure medium does not prevent uptake and toxicity toward a rainbow trout gill cell line. *Aquat. Toxicol.* **93**, 91–99.
- Kühnel, D., Scheffler, K., Wellner, P., Meißner, T., Potthoff, A., Busch, W., Springer, A. & Schirmer, K. (2012). Comparative evaluation of particle properties, formation of reactive oxygen species and genotoxic potential of tungsten carbide based nanoparticles in vitro. *J. Hazard. Mater.* **227-228**, 418–426.
- Kroll, A., Dierker, C., Rommel, C., Hahn, D., Wohlleben, W., Schulze-Isfort, C., Göbbert, C., Voetz, M., Hardinghaus, F., Schnekenburger, J. (2011). Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part. Fibre Toxicol.* **8**:9.
- Landsiedel, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K. & Oesch, F. (2009). Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers. *Mutat. Res.* **681**, 241–258.
- Lison, D., Carbonnelle, P., Mollo, L., Lauwerys, R. & Fubini, B. (1995). Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 600–606.
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V. & Dusinska, M. (2013). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* Advance Access published March 20, 2013. doi:10.3109/17435390.2013.773464.

- Magdolenova, Z., Lorenzo, Y., Collins, A. & Dusinska, M. (2012). Can standard genotoxicity tests be applied to nanoparticles? *J. Toxicol. Environ. Health* **75**, 800–806.
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F., Jr, Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. & Yoshimura, I. (2006). Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing--Aberdeen, Scotland, 2003--Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. *Environ. Mol. Mutagen.* **47**, 1–5.
- Moulin, J.J., Wild, P., Romazini, S., Lasfargues, G., Peltier, A., Bozec, C., Deguerry, P., Pellet, F. & Perdrix, A. (1998). Lung cancer risk in hard-metal workers. *Am. J. Epidemiol.* **148**, 241–248.
- Muller, J., Decordier, I., Hoet, P.H., Lombaert, N., Thomassen, L., Huaux, F., Lison, D. & Kirsch-Volders, M. (2008). Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* **29**, 427–433.
- OECD. (1997). OECD guideline for the testing of chemicals 476 - In vitro mammalian cell gene mutation test.
- OECD. (2010). OECD guideline for the testing of chemicals 487 - In vitro mammalian cell micronucleus test.
- Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldeldhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. & Lorge, E. (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test V. Using L5178Y cells. *Mutat. Res.* **607**, 125–152.
- Pfuhler, S., Fellows, M., van Benthem, J., Corvi, R., Curren, R., Dearfield, K., Fowler, P., Frötschl, R., Elhajouji, A., Le Hégarat, L., Kasamatsu, T., Kojima, H., Ouédraogo, G., Scott, A., Speit, G. (2011). In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: summary of an IWGT workshop. *Mutat. Res.* **723**, 101–107.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J. & Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* **30**, 3891–3914.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184–191.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. & Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206–221.
- Warheit, D.B. & Donner, E.M. (2010). Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines. *Nanotoxicology* **4**, 409–413.
- Wild, P., Perdrix, A., Romazini, S., Moulin, J.J. & Pellet, F. (2000). Lung cancer mortality in a site producing hard metals. *Occup. Environ. Med.* **57**, 568–573.

SUPPLEMENTARY DATA



SUPPLEMENTARY FIG. 1. Analysis of size distribution of isolated NP was performed using ImageJ software. TEM images of WC-Co NP suspension in complete RPMI medium were chosen for analysis, as the most important number of isolated NP was observed in media with serum. Analysis was performed on 404 isolated NP. Measured size distribution ranged from 20 to 160 nm, with 67.8% NP between 50 and 90 nm.

1.2. Mécanismes d'action génotoxique des WC-Co NP

1.2.1. Présentation de l'article 2

Dans l'article précédent, les résultats des WC-Co NP dans les différents tests de génotoxicité réalisés indiquaient la présence probable de différents mécanismes d'action génotoxique. Dans ce deuxième article, nous avons étudié les mécanismes d'action impliqués dans la génotoxicité *in vitro* des WC-Co NP dans la lignée de cellules de lymphome de souris L5178Y et dans des lymphocytes humains en culture primaire.

Dans un premier temps, nous avons exploré l'induction de dommages chromosomiques à l'aide du test d'aberrations chromosomiques sur lymphocytes humains bloqués en métaphase et du test des micronoyaux associé à un marquage des centromères par la technique de FISH dans les cellules L5178Y et dans des lymphocytes humains. Les résultats ont indiqué la présence d'évènements clastogènes et aneugènes.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux lésions oxydatives à l'ADN, qui représentent le mécanisme d'action génotoxique le plus décrit pour les nanoparticules. Nous avons donc mis en œuvre le test des comètes modifié avec l'enzyme formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) afin d'étudier les dommages oxydatifs à l'ADN dans les cellules L5178Y et les lymphocytes humains. Nous avons alors observé une légère induction de sites sensibles à la FPG par les WC-Co NP, mais uniquement dans les cellules de lymphome de souris L5178Y. Ces résultats pourraient donc indiquer la présence de dommages oxydatifs à l'ADN mais pas uniquement, la FPG détectant des bases oxydées telles que la 8-oxoGua, la FapyAde ou la FapyGua, mais également des sites d'alkylation.

Grâce à la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE), nous avons pu étudier la formation d'ERO dans des suspensions de nanoparticules de WC-Co en absence de cellules, et en présence de lymphocytes humains et de cellules L5178Y. La RPE est une technique de choix pour la détection des espèces radicalaires. Il s'agit d'une technique spectroscopique basée sur la mesure et l'interprétation de phénomènes de transitions de niveaux énergétiques des électrons soumis à un champ magnétique. Les espèces radicalaires sont en effet caractérisées par un électron libre qui, en tournant sur lui-même, définit un moment angulaire intrinsèque dénommé spin. Si un radical est placé dans un champ magnétique correspondant à la fréquence de précession du spin, il en résultera une transition d'état caractérisée par une absorption d'énergie visualisée sous la forme d'un spectre, spécifique d'une espèce radicalaire particulière. Toutefois, la plupart des espèces radicalaires ont une demi-vie trop courte pour pouvoir être détectées directement et nécessitent une stabilisation préalable à leur étude en RPE.

Cette stabilisation peut être effectuée à l'aide d'un piègeur moléculaire, appelé *spin trap*. Le *spin trap* utilisé dans cet article est le DMPO (5,5-diméthyl-pyrroline N-oxide). La réaction de piégeage produit un composé plus stable et d'une durée de vie considérablement augmentée, résultant de la stabilisation du radical sur le *spin trap*. Ce composé, lui aussi radicalaire, est appelé adduit, et est détectable en RPE.

Le spectre caractéristique de l'adduit DMPO-OH, signalant la présence de radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) a été observé dans toutes les suspensions de WC-Co NP, avec une production prolongée en présence de cellules. Cependant, une hétérogénéité importante a été observée entre les résultats des suspensions de WC-Co NP en présence de lymphocytes humains provenant de 2 donneurs différents. En ajoutant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à la suspension de WC-Co NP sans cellules, nous avons obtenu un profil semblable à celui observé pour les suspensions en présence de cellules L5178Y et de lymphocytes humains provenant d'un des 2 donneurs, c'est-à-dire prolongée durant la totalité de la période de mesure. Les WC-Co NP seraient donc capables de participer à des réactions de type Fenton, et ce mécanisme pourrait donc être responsable de la production prolongée de radicaux $\cdot\text{OH}$ en présence de cellules. Les WC-Co NP pourraient donc générer des radicaux $\cdot\text{OH}$ de manière intrinsèque lorsqu'elles sont mises en suspension dans un milieu aqueux, et par l'intermédiaire d'une réaction de type Fenton lorsqu'elles sont en présence de H_2O_2 , produit notamment au niveau cellulaire.

1.2.2. Article 2

Mechanisms of Action Involved in the *In Vitro* Genotoxicity of Tungsten Carbide-Cobalt (WC-Co) Nanoparticles.

Hélène Moche, Dany Chevalier, Hervé Vezin, Nancy Claude, Elisabeth Lorge, Fabrice Nesslany.

Soumis dans Mutation Research le 26 juin 2014.

Mechanisms of action involved in the *in vitro* genotoxicity of tungsten carbide – cobalt (WC-Co) nanoparticles

Hélène Moche ^{a,b,c}, Dany Chevalier ^c, Hervé Vezin ^d, Nancy Claude ^b, Elisabeth Lorge ^b,
Fabrice Nessler ^{a,c,1}

^a Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France.

^b Servier Group, 45520 Gidy, France.

^c EA 4483, Université Lille 2, 59000 Lille, France.

^d LASIR, Université Lille 1, France.

¹ To whom correspondence should be addressed. Laboratoire de Toxicologie Génétique - Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

Fax: +33 3 20 87 73 10. E-mail: fabrice.nessler@pasteur-lille.fr

Keywords: oxidative DNA damage, reactive oxygen species, clastogenic effect, aneugenic effect, nanomaterials.

ABSTRACT

Previously, we showed that tungsten carbide – cobalt (WC-Co) nanoparticles (NP) could be used as nanoparticulate positive reference control in some *in vitro* genotoxicity assays. In the current study, we investigated the mechanisms of action involved in WC-Co NP *in vitro* genotoxicity in L5178Y mouse lymphoma cell line and primary human lymphocytes. We studied chromosomal damage through the micronucleus test associated with centromere staining and the chromosome aberration assay, and showed the involvement of both clastogenic and aneugenic events. In another hand, the use of the formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG)-modified comet assay allowed displaying a slight increase in FPG-sensitive sites but only in L5178Y mouse lymphoma cells, suggesting that WC-Co NP could induce oxidative DNA damage, among other damage detected by FPG. Reactive oxygen species were measured in WC-Co NP suspensions with the electron paramagnetic resonance technique. The results showed the presence of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) in WC-Co NP suspensions with or without cells, but with a time-extended production in the presence of cells. However, a significant heterogeneity in $\cdot\text{OH}$ production was observed between the WC-Co NP suspensions in the presence of human lymphocytes from 2 different donors. Using H_2O_2 , we showed that WC-Co NP were able to participate in Fenton-like reactions, and suggested that $\cdot\text{OH}$ could be produced either by an intrinsic generation by WC-Co NP, or through a Fenton-like reaction in the presence of cells.

1. Introduction

Tungsten carbide – cobalt (WC-Co) is used notably in the hard metal industry for the production of cutting tools and wear-resistant surfaces for its hardness. Occupational exposure to WC-Co has been associated with an increased risk of lung cancer [1,2] and WC-Co was classified as probably carcinogenic to humans (group 2A) by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [3]. In a previous study, we showed that WC-Co nanoparticles (NP) could be considered as nanoparticulate positive reference control in some *in vitro* genotoxicity assays [4].

From our previous results in L5178Y mouse lymphoma cells and human lymphocytes, several mechanisms of action seemed to be involved in the genotoxicity of WC-Co NP. The induction of micronuclei in binucleated human lymphocytes in the cytokinesis-block micronucleus test and the marked increase in the number of small colonies in the mouse lymphoma assay [4] suggested a clastogenic activity [5]. On the other hand, the increase in the number of micronucleated mononucleated human lymphocytes in the cytokinesis-block micronucleus test [4] indicated an aneugenic activity [6]. In addition, WC-Co microparticles induced centromere-positive micronuclei in MCF-7 cells [7]. It is indeed generally considered that some NP are able to mechanically or chemically interact with the mitotic spindle or its components, such as centrosomes or microtubules, or with the chromosome segregation during the mitosis, potentially resulting in an aneugenic effect [8–10].

However, the most frequently described mechanism of genotoxic action for NP involves oxidative damage, due to reactive oxygen species (ROS) at the particle surface or produced in response to the interaction between the NP and the cell by cellular components such as mitochondria, or through a depletion of cellular antioxidants [8–10]. ROS, and more particularly the highly reactive hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), are able to attack proteins, lipids and DNA in the cell. In this latter case, ROS can induce sugar or pyrimidine and purine base damage [11,12].

An oxidative mechanism was proposed for WC-Co microparticles: electrons released by cobalt oxidation could be transferred to the surface of WC where they could reduce oxygen and generate ROS [13]. However, De Boeck et al [14] did not highlight any oxidative DNA damage after a 15-min treatment with WC-Co microparticles in isolated human lymphocytes in the modified comet assay using the enzyme formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG). Nevertheless, NP could produce more ROS than microparticles, due to their higher surface reactivity [9]. WC-Co NP indeed generated more free radicals than WC-Co microparticles in JB6 mouse epidermal cell line [15,16].

In this study, we investigated the mechanisms underlying WC-Co NP genotoxicity *in vitro* in two cell types, L5178Y mouse lymphoma cell line and primary cultures of human lymphocytes. We studied chromosomal damage using a chromosome aberration test, and more particularly the clastogenic or aneugenic activities through micronucleus assays in combination with centromere staining by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The FPG-modified comet assay was used to investigate FPG-sensitive sites including oxidative DNA damage and we performed ROS detection with electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) by spin trapping experiments using 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

RPMI 1640, horse serum, foetal calf serum (FCS), non-essential amino acids and phosphate buffered saline (PBS) were purchased from GIBCO Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Giemsa reagent, penicillin, streptomycin, amphotericin B, glucose oxidase, paclitaxel, triton X-100, EDTA, trizma base, hepes, RNase, propidium iodide, KCl, NaCl, sodium bicarbonate, sodium pyruvate, pluronic F68 solution, cytochalasin B, 20x saline sodium citrate (SSC) buffer, formamide, bovine serum albumin (BSA) and DMPO were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Normal melting point agarose (NMPA) and low melting point agarose (LMPA) from Biorad (Marnes la Coquette, France), acetic acid from VWR (Fontenay-sous-bois, France), DMSO from Acros Organics (Noisy le Grand, France), NaOH, Na₂HPO₄, L-glutamine and absolute ethanol from Merck (Darmstadt, Germany), heparin from Choay (France), phytohaemagglutinin A (PHA) from Remel via Oxoid (Dardilly, France), and sterile water from Fresenius Kabi (Sevres, France). FPG was obtained from New England Biolabs (Evry, France). Pan-centromeric probes were purchased from Adgenix (Voisins le Bretonneux, France), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and the antifade solution from Cambio (Cambridge, UK).

2.2. Preparation of WC-Co NP suspensions

WC-Co NP (8% w/w Co) were purchased from Nanostructured and Amorphous Materials, Inc. (Houston, Texas, USA). Certificate of analysis indicated 8.26% w/w Co with 0.73% w/w additive Cr and 0.48% w/w additive V. Purity was 99.5%, with major impurities being O (0.2% w/w) and Fe (0.056% w/w). Average particle size given by the supplier was 60 to 250 nm; specific surface area was 1.5 m²/g. Christallographic systems were hexagonal for WC and cubic for Co.

Initial suspensions were prepared as previously detailed [4], following a protocol described by Jensen *et al.* [17]. Briefly, after a pre-wetting step with 0.5% v/v ethanol, the appropriate volume of a solution of BSA, hereafter mentioned as BSA-water, was added. BSA-water was prepared by dissolving 0.05% w/v BSA in distilled water and sterile-filtered. Dispersion was obtained by probe-sonication for 16 min at 400W and 10% amplitude using a 400 Watt Branson Sonifier S-450D (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA). NP suspensions were cooled on ice to minimize heat-development during sonication. Initial suspensions were then diluted 1:9 v/v in cell culture medium at the time of cell treatment to obtain final suspensions. Because of the low stability of WC-Co NP suspensions, initial and final suspensions were carefully vortexed before each pipetting.

These initial and final suspensions were previously characterized in terms of WC-Co NP size and surface charge, using dynamic light scattering, transmission electron microscopy and measure of zeta potential [4]. Briefly, both isolated NP and agglomerates/aggregates were observed in each suspension and zeta potential values were -8.96 mV and -8.81 mV in RPMI 10 and complete RPMI media respectively (see paragraph 2.3. hereafter for media composition). Size distribution of isolated NP ranged from 20 to 160 nm, with 67.8% NP between 50 and 90 nm [4].

2.3. Cell culture

2.3.1. L5178Y cells. L5178Y tk^{+/−} mouse lymphoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were thawed and seeded at a concentration of 1.33×10^5 cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated horse serum, 2 mg/mL sodium bicarbonate, 10 mL/L non-essential aminoacids, 200 UI/mL penicillin, 5 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin B, 0.02% L-glutamine, 0.02 mg/mL sodium pyruvate, 0.05% pluronic F68 solution (hereafter referred to as RPMI 10) and incubated in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂.

2.3.2. Human lymphocytes. Whole blood was obtained by venipuncture from non-smoking healthy donors, not recently exposed to any known mutagen or radiation, into lithium heparin Vacutainer tubes. For each condition, 0.5 mL whole blood was diluted 1:9 with complete RPMI medium, composed of RPMI 1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 80 UI/mL heparin, 0.024% L-glutamine, 400 UI/mL penicillin, 0.2 mg/mL streptomycin and phytohaemagglutinin A (PHA, 2%) for 44h in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂.

2.4. Cell treatment

Duplicate cultures of human lymphocytes and L5178Y cells were treated for 4 or 24h with different concentrations of WC-Co NP. For all treatments, treatment suspension was diluted 1:9 (v:v) in the appropriate culture medium containing cells (L5178Y cell concentrations of 2×10^5 cells/mL for the 4-h treatment and 5×10^4 cells/mL for the 24-h treatment). Positive control for the chromosome aberration assay in human lymphocytes was mitomycin C at a final concentration of 0.25 $\mu\text{g/mL}$. Paclitaxel (0.1 $\mu\text{g/mL}$) was used as aneugenic positive control for the micronucleus test after a 4-h treatment followed by a 20-h recovery period. Positive control for the FPG-modified comet assay was a 30-min treatment with glucose oxidase at a final concentration of 7.5×10^{-3} U/mL in culture medium with only 2% serum for L5178Y cells and 1 U/mL in culture medium without serum for human lymphocytes, because of the inhibition of the enzyme in presence of serum [18]. Treatments were conducted under agitation to improve the interaction between NP and cells, on a rotor in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂ for L5178Y mouse lymphoma cells, and in a shaking water bath at 37°C for human lymphocytes.

2.5. Chromosome aberration assay

The chromosome aberration assay was performed according to the OECD guideline TG 473 [19], but only without metabolic activation. At the end of the 24-h treatment, human lymphocytes (whole blood) were centrifuged, washed and incubated for a 20-h recovery period. Colcemid (0.1 $\mu\text{g/mL}$) was added 2h before the end of the recovery period. After hypotonic treatment with 0.075 M KCl for 10 min, lymphocytes were fixed in methanol/acetic acid (3:1) and dropped onto glass slides. The slides were air-dried and stained in 4% Giemsa. Slides were coded and 50 well spread metaphases were analyzed per duplicate coded slides per culture (200 metaphases per concentration) for structural chromosome aberrations. Moreover, polyploid cells were scored among 1000 metaphases per culture (2000 metaphases per concentration). As a measure for cell cycle delay and/or cytotoxicity, the mitotic index was calculated as the number of mitotic cells among 1000 cells.

2.6. Micronucleus assay in combination with fluorescence in situ hybridization (FISH)

2.6.1. Slide preparation. At the end of the treatment period, cells were washed twice, resuspended in culture medium and incubated for a 20-h recovery period. Human lymphocytes were incubated in presence of cytochalasin B (6 $\mu\text{g/mL}$), which was thus

added at the end of the treatment periods in order to avoid any potential interaction with NP uptake by cells [20]. At the end of the recovery period, L5178Y cells were counted using a haemocytometer and the relative population doubling (RPD) was calculated to assess cytotoxicity according to the OECD guideline 487 [21] on *in vitro* micronucleus test. After centrifugation at 1000 rpm for 6 min, supernatant was discarded and cells were treated with a hypotonic solution: 4 min with RPMI 1640 medium diluted 1:1 in distilled water for L5178Y cells and 10 min with RPMI 1640 diluted 1:4 in distilled water supplemented with FCS 2% for human lymphocytes. After the hypotonic shock, a pre-fixation step was performed by adding cold Carnoy's fixative (absolute ethanol/glacial acetic acid, 3:1 v:v). Cells were then centrifuged and fixed in Carnoy's fixative then spread on duplicate glass slides (triplicate for human lymphocytes). Slides were air-dried at least over-night and kept at -20°C until hybridization. For human lymphocytes, one replicate slide was stained for 10 min with 5% v/v Giemsa in water and was used for the assessment of the replication index (RI) as a measure for cell cycle delay and/or cytotoxicity.

2.6.2. FISH. FISH was performed using cyanine 3-labelled human or mouse pan-centromeric DNA probes. The first step consisted in a dehydration of the slides using 70%, 85% and 100% ethanol baths. Chromosomes were denaturated with formamide 70% at 70°C for 1 min 30 sec. Slides were dehydrated again using 70%, 85% and 100% ethanol baths. The probes were denaturated at 85°C for 10 min and hybridization was performed overnight at 37°C. Slides were washed with 2x SSC buffer then two times with formamide 50% at 37°C and finally 2 times with 2x SSC buffer. Slides were dried and counterstained with DAPI in an antifade solution. They were analysed using an Olympus BXS1 fluorescence microscope equipped with an X-Cite 120Q lamp. DAPI is detected using a 340-380 nm excitation filter and a 430 nm barrier filter, and cyanine 3 is detected using a 530-560 nm excitation filter and a 580 nm barrier filter. Micronuclei were scored for the presence of one or more spots and were classified as centromere positive (C+) or centromere negative (C-). C+ and C- MN were scored in 1000 mononucleated cells per duplicate culture for L5178Y cells and in 500 mononucleated and 500 binucleated cells per duplicate culture for human lymphocytes. Moreover, a percentage of C+ MN among total MN was calculated, on a basis of at least 10 MN per concentration.

2.7. Alkaline comet assay and FPG-modified comet assay

The comet assay was performed under alkaline conditions (pH>13) in compliance with a previously described protocol [22,23] and the FPG-modified comet assay was performed to detect additional damage, including oxidative DNA damage.

At the end of the treatment period, L5178Y cells were washed and resuspended in RPMI 10. Viable cells were counted using Trypan blue exclusion. For the comet assay, 4×10^4 viable cells were mixed with 0.5% w/v LMPA kept at 37°C, while the remaining cell suspension was incubated in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂ for a 20-h recovery period before harvest for the micronucleus test and/or the cytotoxicity assessment (see hereafter Micronucleus assay in L5178Y cells section).

At the end of the treatment period, human lymphocytes were washed, centrifuged, supernatant was discarded and 30 µL of the cell pellet was mixed with 0.5% w/v LMPA kept at 37°C for the comet assay, while the remaining cells were resuspended in complete RPMI and incubated in presence of 6 µg/mL cytochalasin B in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂ for a 20-h recovery period before harvest for the cytokinesis-block micronucleus assay and the cytotoxicity assessment (see hereafter Micronucleus assay in human lymphocytes section).

Cells embedded in LMPA were spread onto regular precoated microscopic slides (1.5% and 0.8% w/v NMPA). For each concentration and culture, 4 duplicate slides were prepared: 2 slides to be treated with FPG and 2 slides without FPG. All the following steps were sheltered from daylight to prevent the occurrence of additional DNA damage. Slides were immersed for at least 1h at 4°C in a cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma Base, pH 10, supplemented with 1% v/v Triton X-100 and 10% v/v DMSO). After lysis, 2 slides were washed in distilled water while the other 2 slides were washed for 2 x 5 min in enzyme buffer (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA; pH 8) and incubated with 75 µl of FPG solution (0.2 U/slide) and coverslips at 37°C for 35 min. At the end of this enzymatic step, slides were quickly rinsed with cold PBS. All the slides were then placed in a horizontal tank filled with fresh electrophoresis solution (1 mM EDTA and 300 mM NaOH, pH>13) for 20 min to allow DNA unwinding and expression of single-strand breaks and alkali-labile sites. Next, electrophoresis was performed for 20 min using an electric current of 0.7 V/cm. Slides were then placed for 10 min in a neutralization solution (0.4 M Trizma base, pH 7.5) and gels were dehydrated by immersion in absolute ethanol for 5 min. Finally, slides were air-dried and stored at room temperature.

Slides were coded and analyzed after addition of propidium iodide (20 µg/ml in distilled water) and a coverslip on each slide. Slides were then examined at 250x magnification using a fluorescence microscope (Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Heerbrugg, Switzerland) equipped with an excitation filter of 515-560 nm and a 590 nm barrier filter, connected through a gated CCD camera to Comet Image Analysis System software, version 4.0 (Perceptive Instruments Ltd., Haverhill, United Kingdom). One hundred randomly selected cells were scored on each slide,

corresponding to 200 cells without FPG and 200 cells with FPG per duplicate cultures per assay (one assay for human lymphocytes and 2 assays for L5178Y cells). Median per culture of tail intensities, defined as the percentage of DNA that had migrated from the head of the comet into the tail, was used as the measure of damage. Net FPG-sensitive sites were obtained by subtracting the median tail intensity determined without FPG from the median tail intensity determined with FPG.

2.8. Electron paramagnetic resonance (EPR) measurements

EPR was used to measure ROS production in WC-Co NP suspensions in cell culture medium and in the presence of L5178Y mouse lymphoma cells or human lymphocytes (whole blood from two different donors). Initial WC-Co NP suspensions (1 mg/mL) were prepared in BSA-water and sonicated in an ultra-sound bath during 10 min for technical convenience. Freshly distilled DMPO spin trapping agent (1 mM) was used for radical detection. EPR measurements were performed using a Brüker ELEXYS E500 spectrometer operating at 9 GHz. Modulation amplitude of 1G and microwave power of 10 mW were used. Quantification of radical amount was performed using TEMPO nitroxide radical as reference. Measurements were performed in DMPO-containing media with or without cells 5 min after dilution (1:9, v:v) of WC-Co NP initial suspensions (final concentration 100 µg/mL), then every 10 min up to 45 min.

2.9. Statistical analysis

For the comet assays, the non-parametric Mann-Whitney U-test was used to evaluate the statistical difference in tail intensity between each dose and the negative control. Statistical analyses were performed with StatView[®] Software (version 5.0, SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina 27513, USA). Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant.

For the chromosome aberration assay, the statistical significance of difference between each concentration and the negative control was determined using the Chi²-test. Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant.

For the micronucleus assay in combination with FISH, the statistical significance of difference in the number of C- or C+ MN between each concentration and the negative control was determined using the Chi²-test. Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Chromosome aberration assay

Numerical and structural chromosome aberrations were studied in human lymphocytes after a 24-h treatment with WC-Co NP followed by a 20-h recovery period (Table I). The highest concentration resulted in a relative mitotic index greater close to 50%: 52.8% for the concentration of 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A statistically significant increase in the number of chromosome and chromatid breaks was induced by WC-Co NP from the lowest analyzed concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with up to 26 acentric chromosomes and 34 chromatid breaks for 200 cells in metaphase at the highest concentration of 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. 0 and 7 in the negative control, respectively, with a moderate cytotoxicity at the lowest positive concentration (relative mitotic index of 73.8%). WC-Co NP induced an increase also in the number of polyploid cells at the two highest concentrations with a maximum at the intermediate concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with 66 polyploid cells per 2000 cells in metaphase, vs. 8 in the negative control.

Table I. Chromosomal aberrations in human lymphocytes incubated with WC-Co NP for 24h followed by a 20-h recovery period.

WC-Co NP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Relative mitotic index (%)	Numerical aberrations		Structural aberrations			
		Polyploid cells (a)	Chromosome-type		Chromatid-type		
			Acentrics (b)	Gaps (b)	Breaks (b)	Gaps (b)	
0	100	8	0	0	7	3	
30	73.8	16	9 **	0	17 *	4	
40	65	66 ***	11 **	0	16 *	10	
60	52.8	55 ***	26 ***	1	34 **	6	

(a) for 2000 metaphases. (b) for 200 metaphases. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ as compared to negative control values (Chi² test).

3.2. Assessment of clastogenic and aneugenic events

MN assay in combination with FISH using a pancentromeric probe allowed the distinction between centromere-positive (C+) and centromere-negative (C-) MN in L5178Y mouse lymphoma cells and in human lymphocytes, after 4 or 24h of treatment, followed by a 20-h recovery period.

Table II. Number of centromere-positive (C+) and centromere-negative (C-) micronuclei (MN) in L5178Y cells incubated with WC-Co NP for 4 or 24h followed by a 20-h recovery period, as evaluated by the micronucleus assay in combination with the FISH technique using a pancentromeric probe.

WC-Co NP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RPD (%)	MNC (a)	C+ MN (b)	C- MN (b)	C+ MN (%) (c)
4-h treatment + 20-h recovery period					
0	100.0	12	7	5	58.3
80	65.5	12	6	6	50.0
100	52.5	29 **	14	17 *	45.2
120	55.7	28 *	14	15 *	48.3
24-h treatment + 20-h recovery period					
0	100.0	8	3	5	37.5
40	89.2	19 *	10	9	50.0
60	57.3	26 **	14 *	13	51.9
80	51.7	38 ***	18 **	22 **	45.0

(a) Number of micronucleated cells per 2000 cells. (b) Number of C+ and C- MN per 2000 cells. (c) Percentage of C+ MN among total MN. At least 20 MN were scored for each concentration. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to negative control values (Chi² test). Paclitaxel (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4-h treatment + 20-h recovery period) was used as aneugenic positive control and induced 32 micronucleated cells per 2000 cells, with 25 C+ MN and 10 C- MN and 71.4% C+ MN.

Table II indicates for both treatment schedules in L5178Y cells the number of micronucleated cells per 2000 cells, the number of C+ and C- MN per 2000 cells and the percentage of C+ MN among total MN. After the 4-hour treatment, RPD was decreased to values close to 50% at the two highest analyzed concentrations: RPD was 52.4% and 55.7% at 100 and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These concentrations of WC-Co NP induced a statistically significant increase in the total number of micronucleated cells, at the highest concentrations of 100 and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Only the increase in C- MN was statistically significant at the concentrations of 100 and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with up to 17 C- MN per 2000

cells at 100 µg/mL vs. 5 in the negative control. After the 24-h treatment, WC-Co NP induced a statistically significant increase in the total number of micronucleated cells at each analysed concentration where the RPD was decreased in a concentration dependant manner (RPD of 89.2% to 51.7% from 40 µg/mL to 80 µg/mL). The increase in C- MN was statistically significant at the concentration of 80 µg/mL with 22 C- MN per 2000 cells vs. 5 in the negative control, and the increase in C+ MN frequency was statistically significant at the concentrations of 60 and 80 µg/mL with up to 18 C+ MN per 2000 cells at 80 µg/mL vs. 3 in the negative control. Globally, the proportion of C+ and C- MN was similar in each condition.

Table III. Number of centromere-positive (C+) and centromere-negative (C-) micronuclei (MN) in human lymphocytes incubated with WC-Co NP for 4 or 24h followed by a 20-h recovery period in the presence of cytochalasin B, as evaluated by the micronucleus assay in combination with the FISH technique using a pancentromeric probe.

WC-Co NP (µg/mL)	RI (%)	Binucleated cells				Mononucleated cells			
		MNBC (a)	C+ MN (c)	C- MN (c)	C+ MN (%) (d)	MNMC (b)	C+ MN (c)	C- MN (c)	C+ MN (%) (d)
4-h treatment + 20-h recovery period									
0	100.0	4	2	2	50.0	3	2	1	66.7
60	82.5	16 *	12 *	6	66.7	12 *	9	5	64.3
80	62.3	13	5	8	38.5	7	8	1	88.9
90	67.4	13	5	8	38.5	6	4	2	66.7
24-h treatment + 20-h recovery period									
0	100.0	9	3	7	31.8	5	3	3	53.8
20	78.0	17	7	10	41.2	20 **	13 *	8	61.9
60	76.3	27 **	13 *	15	46.4	21 **	14 *	11	56.0
80	59.8	36 ***	17 **	23 **	42.5	22 ***	17 **	5	77.3

(a) MNBC: Micronucleated binucleated cells per 1000 binucleated cells. (b) MNMC: Micronucleated mononucleated cells per 1000 mononucleated cells. (c) Number of C+ and C- MN per 1000 cells. (d) Percentage of MN with a centromeric signal among total MN. At least 10 MN were scored in binucleated and in mononucleated cells for each concentration. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 as compared to negative control values (Chi² test). Paclitaxel (0.1µg/mL, 4-h treatment + 20-h recovery period) was used as aneugenic positive control and induced 63 micronucleated cells per 1000 binucleated cells, with 65 C+ MN and 8 C- MN and 89% C+ MN; paclitaxel induced 45 micronucleated cells per 1000 mononucleated cells, with 54 C+ MN and 8 C- MN and 87.1% C+ MN.

Table III indicates for both treatment schedules the number of micronucleated cells per 1000 cells, the number of C+ and C- MN per 1000 cells and the percentage of C+

MN among total MN in binucleated and mononucleated human lymphocytes. RI was 67.4% for the highest concentration of 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the 4-h treatment, and 59.8% for the highest concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the 24-h treatment. After the 4-h treatment, WC-Co NP induced a statistically significant increase in the number of micronucleated binucleated and mononucleated cells only at the lowest concentration of 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After the 24-h treatment, WC-Co NP induced a statistically significant increase in the number of micronucleated cells at the highest concentrations of 60 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in binucleated cells and on the whole range of concentrations in mononucleated cells. In both cases, the lowest genotoxic concentration was moderately cytotoxic. WC-Co NP induced an increase in C+ MN, with a statistical significance at the concentrations of 60 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in binucleated cells, with up to 17 C+ MN per 1000 cells at 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. 3 in the negative control, and at each analyzed concentration in mononucleated cells, with up to 17 C+ MN at 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. 3 in the negative control. C- MN frequency also increased, but it was statistically significant only in binucleated cells at the highest concentration, with 23 C- MN per 1000 cells vs. 7 in the negative control. In binucleated cells, the percentages of C+ MN were slightly lower than the ones of C- MN, whereas they were higher in mononucleated cells for both treatment schedules.

3.3. Induction of FPG-sensitive sites

To study additional damage including oxidative DNA damage, FPG-modified comet assays were carried out in L5178Y mouse lymphoma cells and in human lymphocytes after 4h of treatment with WC-Co NP. Cytotoxicity was measured with the same methods as those used for the micronucleus assays, i.e. after the 1.5 to 2-cell cycle recovery periods following treatments, ensuring the analysis of viable cells at the selected concentrations. The highest analysed concentrations were therefore associated with less than 45 +/- 5% cytotoxicity.

As previously published [4], WC-Co NP induced a statistically significant increase in DNA migration in human lymphocytes in the standard comet assay, with an important variability of the response between the two donors, whereas no increase was observed in L5178Y mouse lymphoma cells. Results of the FPG-modified comet assay in human lymphocytes showed no increase in net FPG-sensitive sites induced by WC-Co NP in comparison to the negative control (Figure 1A). On the contrary, in L5178Y mouse lymphoma cells, a slight increase in FPG-sensitive sites was induced at the highest concentrations of 80 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 1B), with 10% tail intensity vs. 5.1% tail intensity in the negative control. However, this effect was not statistically significant.

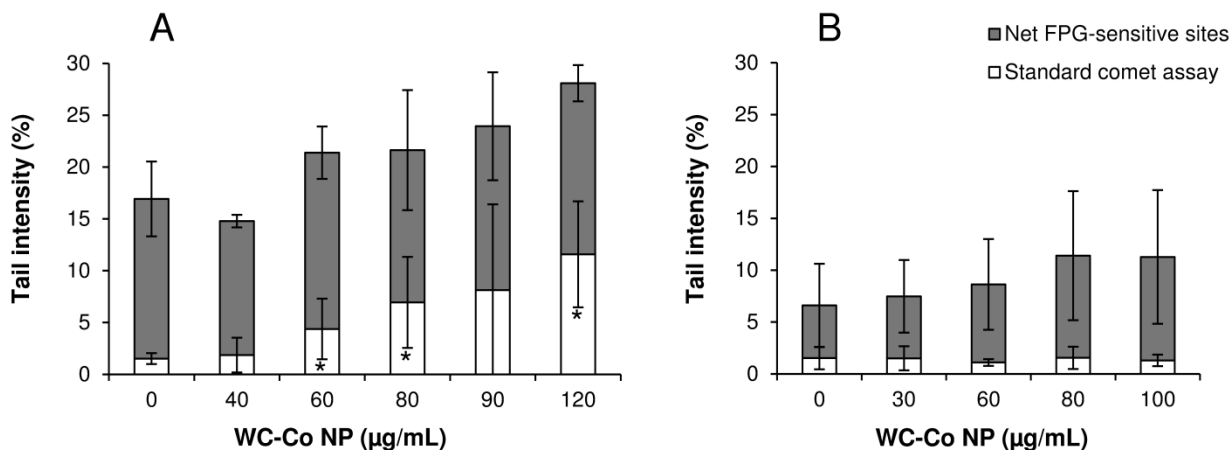


Fig. 1. DNA migration (tail intensity) in the comet assay after a 4-h treatment with WC-Co NP, with or without further incubation with FPG. **A:** In human lymphocytes, 100 cells were scored per duplicate slide per donor. Mean \pm SD for 2 donors. Glucose oxidase (1 u/mL, 30-min treatment) was used as oxidative positive control and induced 2.8% tail intensity in the standard comet assay and 37.6% FPG-sensitive sites. **B:** In L5178Y mouse lymphoma cells, 100 cells were scored per duplicate slide per culture. Mean \pm SD for 4 cultures. Glucose oxidase (7.5×10^{-3} u/mL, 30-min treatment) was used as oxidative positive control and induced 7.6% tail intensity in the standard comet assay and 29.9% FPG-sensitive sites. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

3.4. ROS measurements in acellular and cellular WC-Co NP suspensions

ROS were measured using the EPR spin trapping technique. The spectrum displayed in Figure 2A shows the typical signal of 4 lines in the ratio 1:2:2:1 with $a_H = a_N = 14.5$ G characteristic of the spin adduct DMPO-OH signalling the formation of hydroxyl (\cdot OH) radicals, observed for WC-Co NP suspensions. Without WC-Co NP, no DMPO-OH was detected. Figure 2B shows the quantification of DMPO-OH in WC-Co NP suspensions in cell culture medium with or without L5178Y mouse lymphoma cells or human lymphocytes. Without cells, the amount of DMPO-OH adduct increased during the first 15 to 25 min after the addition of WC-Co NP before reaching a plateau. For WC-Co NP suspensions in the presence of L5178Y mouse lymphoma cells, the amount of DMPO-OH adduct increased linearly during the whole 45-min studied period. For the WC-Co NP suspensions in the presence of human lymphocytes, only the first 25 min could be analyzed as the spin adduct DMPO-OH was reduced after a longer time. Interestingly, a significant variability of response was observed between the two donors. For one of them, the evaluation of the amount of DMPO-OH followed a pattern similar to L5178Y cells, whereas for the other one it was more similar to the acellular WC-Co NP suspension in culture medium.

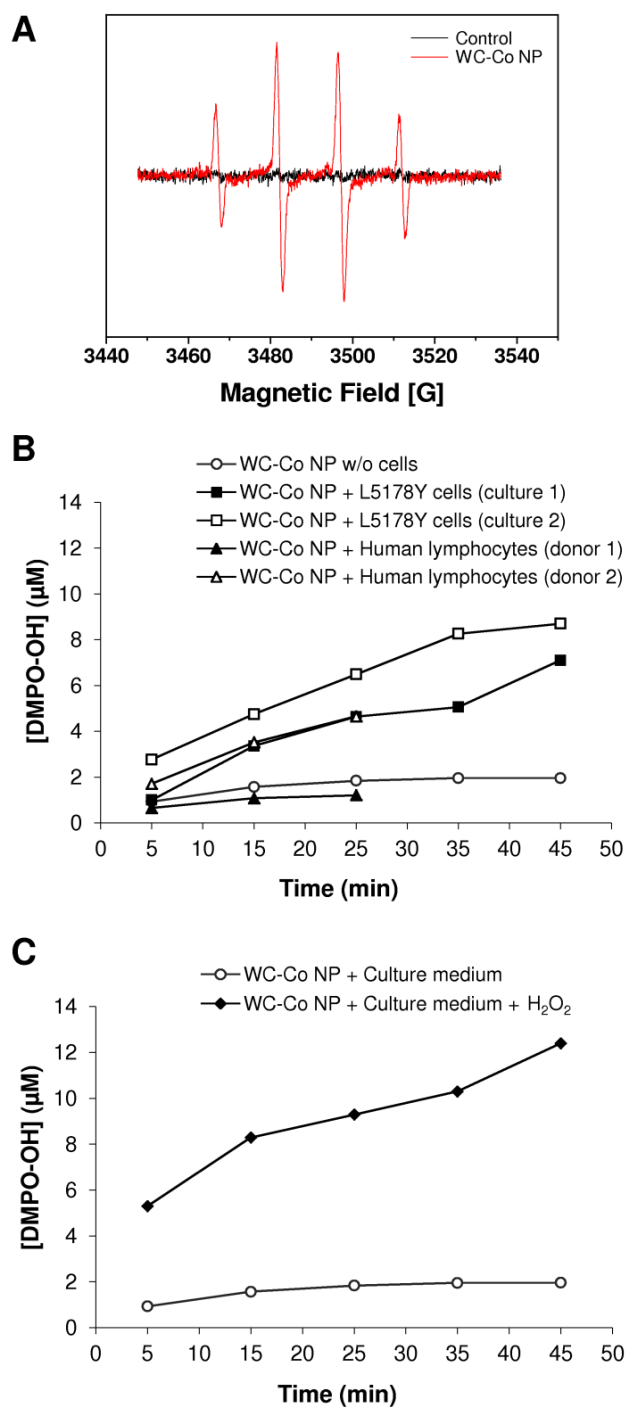


Fig. 2. Electron paramagnetic resonance (EPR) measurement of ROS in different media in the presence of DMPO (1 mM). **A:** Spectrum observed without WC-Co NP (control) and spectrum characteristic of DMPO-OH adduct signalling the presence of hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) radical, observed for WC-Co NP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) suspensions. **B:** Concentration of DMPO-OH adduct over time in WC-Co NP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) suspensions in cell culture medium without cells, or in the presence of mouse lymphoma L5178Y cells (2 cultures) or human lymphocytes (whole blood from 2 donors). For the WC-Co NP suspensions in the presence of human lymphocytes, only the first 25 min could be analysed as the spin adduct DMPO-OH was reduced after a longer time. **C:** Concentration of DMPO-OH adduct over time in WC-Co NP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) suspensions in cell culture medium (RPMI + 10% horse serum) with and without H₂O₂ (10^{-4} M).

To investigate a possible Fenton-like mechanism for WC-Co NP, which could explain the extended production of DMPO-OH in the presence of cells, an experiment consisting of adding H₂O₂ (10⁻⁴ M) to WC-Co NP suspension in acellular culture medium was performed (Figure 2C). A stronger production of DMPO-OH in the presence of H₂O₂ was evidenced, and this production was extended during the whole analyzed period of 45 min.

4. Discussion

In this study, we investigated two mechanisms of genotoxic action often described for NP, i.e. chromosomal damage due to interference with the mitotic spindle and oxidative DNA damage, in human lymphocytes and in L5178Y mouse lymphoma cells exposed to WC-Co NP.

Chromosomal damage can be observed either in interphase cells as MN or in metaphase cells as chromosome aberrations. We already reported an increase in the number of micronucleated cells induced by WC-Co NP in L5178Y mouse lymphoma cells and in both binucleated and mononucleated cells in human lymphocytes [4]. These results were confirmed in this study in MN assays in combination with centromeric staining by FISH, and completed with additional information about clastogenic or aneugenic activities. Most MN induced in mononucleated human lymphocytes were C+ MN, containing whole chromosome(s), which was expected because aneugens may induce an increase in MN in mononucleated cells [6]. However, WC-Co NP globally induced an increase in both MN containing whole chromosomes and acentric fragments, suggesting both aneugenic and clastogenic mechanisms of action. The same hypothesis can be made from the results of the chromosome aberration assay. Indeed, WC-Co NP induced numerical aberrations (polyploidy) as well as structural aberrations (chromosome and chromatid breaks). Aneuploid cells can arise directly from diploid cells and also from the division of an intermediate tetraploid cells in the case of multipolar spindle formation inducing chromosome missegregation [24]. Elhajouji et al. [6] also showed that aneugens are able to induce polyploidy by mitotic slippage. Tetraploid cells may arise through several mechanisms, including mitotic slippage, cytokinesis failure, and viral-induced cell fusion [25]. Mitotic spindle disturbances may be induced by uncouplers of oxidative phosphorylation which can interfere with mitotic spindle through inhibition of mitochondrial ATP production and efflux of Ca²⁺ from mitochondria [26].

Among the assays we performed, several results may therefore indicate an aneugenic activity. WC-Co NP increased the number of micronucleated mononucleated

cells in human lymphocytes, which was shown for aneugens [6]. Moreover, the number of C+ MN, containing whole chromosome(s), was also increased. WC-Co NP induced an increase in the number of polyploid cells in the chromosome aberrations assay. Besides, an aneugenic effect was also suspected for WC-Co microparticles, which induced C+ MN in MCF-7 cells [7]. On another hand, the increase in both C- MN and chromosomal and chromatid breaks indicated a clastogenic activity, which was also suggested by the increase in the number of small colonies in the mouse lymphoma assay [4]. From all these results, it appears that one of the WC-Co NP mechanisms of genotoxic action is aneuploidy, but it is not exclusive.

To study the induction of oxidative DNA damage, a modified comet assay using FPG was performed in human lymphocytes and L5178Y mouse lymphoma cells. In human lymphocytes, no FPG specific damage was observed. On the opposite, a slight increase in net FPG-sensitive sites was observed in L5178Y cells. This could suggest the implication of oxidative mechanisms among others, as FPG detects oxidised bases such as 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) and formamidopyrimidines derived from adenine and guanine (FapyAde and FapyGua) but also alkylation damage, such as N7-alkylguanines [27,28]. Otherwise, the use of the FPG-modified comet assay increased the sensitivity of the detection of WC-Co NP-induced DNA damage. Indeed, in L5178Y cells, no DNA fragmentation was evidenced in the standard comet assay, whereas the incubation with FPG allowed the detection of a slight increase in DNA fragmentation. This increased sensitivity of the FPG-modified comet assay was described in another study for several chemicals [29].

Differences in antioxidant capabilities could explain the discrepancy between the results obtained in the two cell types for the FPG-modified comet assay, and human lymphocytes may also be protected against oxidative stress by the presence of erythrocytes [30]. This hypothesis is supported by the concentration of glucose oxidase inducing detectable FPG-sensitive DNA damage, much higher in human lymphocytes than in L5178Y cells. However, no substantial increase in FPG-sensitive sites was either reported after a 15-min incubation of isolated human peripheral blood mononucleated cells with WC-Co microparticles [14], but WC-Co microparticles also induced lower levels of ROS [15,16]. This latter study using EPR showed that WC-Co NP induced ROS generation in JB6 cells after a 5-min incubation and decreased reduced glutathione (GSH) level after 24h [15]. However, no generation of ROS was reported in HaCaT cells exposed to a maximal concentration of 33 µg/mL for 15 to 150 min using the DCFH-DA method [31]. In our study, we observed a production of $\cdot\text{OH}$ radical after incubation of WC-Co NP in culture media with and without L5178Y cells or human lymphocytes. Without cells the generation of $\cdot\text{OH}$ was observed only at the beginning of the studied period following the addition of WC-Co NP. On the opposite, in WC-Co NP suspensions in the presence of

L5178Y cells, the production of $\cdot\text{OH}$ occurred during the entire studied period, as attested by the increasing concentration of DMPO-OH. For WC-Co NP suspensions in the presence of human lymphocytes, the results differed between the two donors. For one of them, the production of $\cdot\text{OH}$ was weak and limited to the first minutes following the addition of WC-Co NP, similar to what was observed for WC-Co NP suspension without cells, whereas for the other donor the production of $\cdot\text{OH}$ followed a pattern similar to the one observed for WC-Co NP suspension with L5178Y cells, with an extended production of $\cdot\text{OH}$. A similar heterogeneity between donors was previously observed in the standard comet assay on human lymphocytes incubated with WC-Co microparticles [14] or NP [4], and the proposed hypothesis involving a variability in antioxidant capacities is thus supported by these new results.

Generation of ROS by WC-Co NP was associated with the dissolution of cobalt [13], which, as a transition metal, can participate in Fenton-like reactions [32]. We therefore hypothesized that the extended production of $\cdot\text{OH}$ by WC-Co NP in the presence of L5178Y cells and human lymphocytes from the second donor could be induced by a Fenton-like reaction. This was demonstrated by the stronger and extended production of $\cdot\text{OH}$ by the addition of H_2O_2 to acellular WC-Co NP suspension. Ding et al [15] also showed that the production of $\cdot\text{OH}$ radical in JB6 cells incubated with WC-Co NP was increased with H_2O_2 and decreased in the presence of catalase. These elements suggest that the production of $\cdot\text{OH}$ by WC-Co NP in the presence of cells may be due to an intrinsic ROS generation by these NP, and by a Fenton-like reaction probably involving cobalt.

5. Conclusions

In this study, we highlighted several mechanisms involved in WC-Co NP genotoxicity. Chromosomal damage seem to be mediated by both aneugenic and clastogenic activities, and ROS generated from WC-Co NP, directly or through a Fenton-like reaction, may induce oxidative DNA damage, at least in cell types with low level of antioxidant defences. These various mechanisms may be an advantage for the use of WC-Co NP as positive control in *in vitro* genotoxicity assays, particularly if specific mechanisms of genotoxic action are investigated.

Acknowledgements

The authors would like to thank Smail Talahari, Sandrine De Bernouis and Jacques Dumont, and Gwendoline Dewaele and Doris Lagache for their excellent technical help for the comet assay, the FISH technique and the chromosome aberration assay respectively.

Funding

This work was supported by the French National Association for Research and Technology (ANRT) [Grant number 265/2011] and the Servier Group.

References

- [1] J.J. Moulin, P. Wild, S. Romazini, G. Lasfargues, A. Peltier, C. Bozec, et al., Lung cancer risk in hard-metal workers, *Am. J. Epidemiol.* 148 (1998) 241–248.
- [2] P. Wild, A. Perdrix, S. Romazini, J.J. Moulin, F. Pellet, Lung cancer mortality in a site producing hard metals, *Occup. Environ. Med.* 57 (2000) 568–573.
- [3] IARC, Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. World Health Organ. Int. Agency Res. Cancer.* 86 (2006) 1–294.
- [4] H. Moche, D. Chevalier, N. Barois, E. Lorge, N. Claude, F. Nessler, Tungsten carbide-cobalt as a nanoparticulate reference positive control in in vitro genotoxicity assays, *Toxicol Sci.* 137 (2014) 125–134.
- [5] M.M. Moore, D. Clive, J.C. Hozier, B.E. Howard, A.G. Batson, N.T. Turner, et al., Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTr) mutants of L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.* 151 (1985) 161–174.
- [6] A. Elhajouji, M. Cunha, M. Kirsch-Volders, Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, *Mutagenesis.* 13 (1998) 193–198.
- [7] J. Muller, I. Decordier, P.H. Hoet, N. Lombaert, L. Thomassen, F. Huaux, et al., Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells, *Carcinogenesis.* 29 (2008) 427–433.
- [8] K. Donaldson, C.A. Poland, R.P.F. Schins, Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies, *Nanotoxicology.* 4 (2010) 414–420.

- [9] L. Gonzalez, D. Lison, M. Kirsch-Volders, Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review, *Nanotoxicology*. 2 (2008) 252–273.
- [10] Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone, M. Dusinska, Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles, *Nanotoxicology*. 8 (2014) 233–278.
- [11] M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease., *FASEB J.* 17 (2003) 1195–1214.
- [12] M.D. Evans, M. Dizdaroglu, M.S. Cooke, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance, *Mutat. Res.* 567 (2004) 1–61.
- [13] D. Lison, P. Carbonnelle, L. Mollo, R. Lauwerys, B. Fubini, Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species, *Chem. Res. Toxicol.* 8 (1995) 600–606.
- [14] M. De Boeck, D. Lison, M. Kirsch-Volders, Evaluation of the *in vitro* direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability, *Carcinogenesis*. 19 (1998) 2021–2029.
- [15] M. Ding, E.R. Kisin, J. Zhao, L. Bowman, Y. Lu, B. Jiang, et al., Size-dependent effects of tungsten carbide-cobalt particles on oxygen radical production and activation of cell signaling pathways in murine epidermal cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241 (2009) 260–268.
- [16] J. Zhao, L. Bowman, R. Magaye, S. Leonard, V. Castranova, M. Ding, Apoptosis induced by tungsten carbide-cobalt nanoparticles in JB6 cells involves ROS generation through both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways, *Int J Oncol.* 42 (2013) 1349–1359.
- [17] K.A. Jensen, Y. Kembouche, E. Christiansen, N.R. Jacobsen, H. Wallin, C. Guiot, Final Protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media, (2011).
- [18] A. Platel, F. Nessler, V. Gervais, N. Claude, D. Marzin, Study of oxidative DNA damage in TK6 human lymphoblastoid cells by use of the thymidine kinase gene-mutation assay and the *in vitro* modified comet assay: determination of No-Observed-Genotoxic-Effect-Levels, *Mutat. Res.* 726 (2011) 151–159.
- [19] OECD, OECD guideline for the testing of chemicals 473 - *In vitro* mammalian chromosome aberration test, (1997).
- [20] S.H. Doak, S.M. Griffiths, B. Manshian, N. Singh, P.M. Williams, A.P. Brown, et al., Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology, *Mutagenesis*. 24 (2009) 285–293.
- [21] OECD, OECD guideline for the testing of chemicals 487 - *In vitro* mammalian cell micronucleus test, (2010).
- [22] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.

- [23] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, et al., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [24] R. King, When 2+2=5: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells, *Biochim Biophys Acta.* 1786 (2008) 4–14.
- [25] N.J. Ganem, Z. Storchova, D. Pellman, Tetraploidy, aneuploidy and cancer, *Curr Opin Genet Dev.* 17 (2007) 157–162.
- [26] A. Önfelt, Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and abnormal chromosome numbers, *Mutat Res.* 168 (1986) 249–300.
- [27] A. Collins, Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay, *Mutat Res.* 681 (2009) 24–32.
- [28] G. Speit, P. Schütz, I. Bonzheim, K. Trenz, H. Hoffmann, Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay, *Toxicol Lett.* 146 (2004) 151–158.
- [29] A. Azqueta, L. Arbillaga, A. López de Cerain, A. Collins, Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG, *Mutagenesis.* 28 (2013) 271–277.
- [30] B. Porto, L. Chiecchio, J. Gaspar, A. Faber, L. Pinho, J. Rueff, et al., Role of haemoglobin in the protection of cultured lymphocytes against diepoxybutane (DEB), assessed by in vitro induced chromosome breakage, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 536 (2003) 61–67.
- [31] D. Kühnel, K. Scheffler, P. Wellner, T. Meißner, A. Potthoff, W. Busch, et al., Comparative evaluation of particle properties, formation of reactive oxygen species and genotoxic potential of tungsten carbide based nanoparticles in vitro, *J. Hazard. Mater.* 227-228 (2012) 418–426.
- [32] S. Leonard, P. M. Gannett, Y. Rojanasakul, D. Schwegler-Berry, V. Castranova, V. Vallyathan, et al., Cobalt-mediated generation of reactive oxygen species and its possible mechanism, *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998) 239–244.

1.3. La cytotoxicité et la génotoxicité des nanoparticules de WC-Co dépendent du type cellulaire : le rôle clé de la production d'ERO

1.3.1. Présentation de l'article 3

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (CEA Fontenay-aux-Roses, Dr Sylvie Chevillard et Dr Vincent Paget), et consiste en l'étude de la cytotoxicité et la génotoxicité des nanoparticules de WC-Co dans trois lignées cellulaires humaines représentatives de potentiels organes cibles : la lignée pulmonaire A549, la lignée hépatique Hep3B et la lignée rénale Caki-1.

En premier lieu, la cytotoxicité des nanoparticules de WC-Co dans ces trois lignées cellulaires a été déterminée pendant 72h suivant le début du traitement avec les nanoparticules de WC-Co par des mesures d'impédance cellulaire, à l'aide du système xCELLigence®. L'impédance cellulaire correspond à l'opposition exercée par un tapis cellulaire au passage d'un courant alternatif sinusoïdal. Elle est mesurée grâce à des plaques spécifiques caractérisées par des puits dont le fond est recouvert avec des microélectrodes en or. La présence de cellules dans le fond des puits affecte l'environnement électrique des électrodes et conduit à une augmentation de l'impédance au niveau des électrodes. Ainsi, plus le nombre de cellules est élevé, plus les valeurs d'impédance sont importantes. L'impédance varie également en fonction de la morphologie cellulaire, de la qualité des interactions cellulaires et des interactions entre les cellules et le support (Figure 19).

L'impédance, représentée par une valeur d'index cellulaire, permet donc de suivre le comportement de cellules adhérentes, notamment leur adhésion, prolifération, viabilité et morphologie, en temps-réel et en continu sur plusieurs jours. Les mesures d'impédance peuvent être réalisées fréquemment, permettant de caractériser avec une grande précision les événements précoces et tardifs de la réponse cellulaire.

La cytotoxicité des nanoparticules de WC-Co a également été étudiée par cytométrie en flux en évaluant l'intégrité membranaire des cellules avec le marqueur fluorescent de l'ADN To-Pro3. Ces expérimentations de cytométrie en flux ont également permis d'étudier les interactions entre les cellules et les nanoparticules de WC-Co, détectées par une déviation du SSC (side scatter), reflétant une modification de la granulométrie des cellules, d'après la méthode décrite par Zucker et al. (2010) pour des nanoparticules de TiO₂. Une distinction entre les cellules vivantes avec des nanoparticules de WC-Co internalisées, les cellules vivantes sans nanoparticules de WC-Co internalisées et les cellules mortes a pu être effectuée. Afin de confirmer que les nanoparticules étaient bien internalisées dans les cellules, et qu'elles n'interagissaient

pas seulement avec la membrane cellulaire, des essais de microscopie confocale avec une reconstruction 3D ont été réalisés pour la lignée cellulaire présentant la plus faible déviation de SSC, les cellules A549. Une étude du cycle cellulaire a également été réalisée pour les trois lignées cellulaires grâce à un marquage de la quantité d'ADN contenue dans les cellules par l'iodure de propidium et analyse par cytométrie en flux.

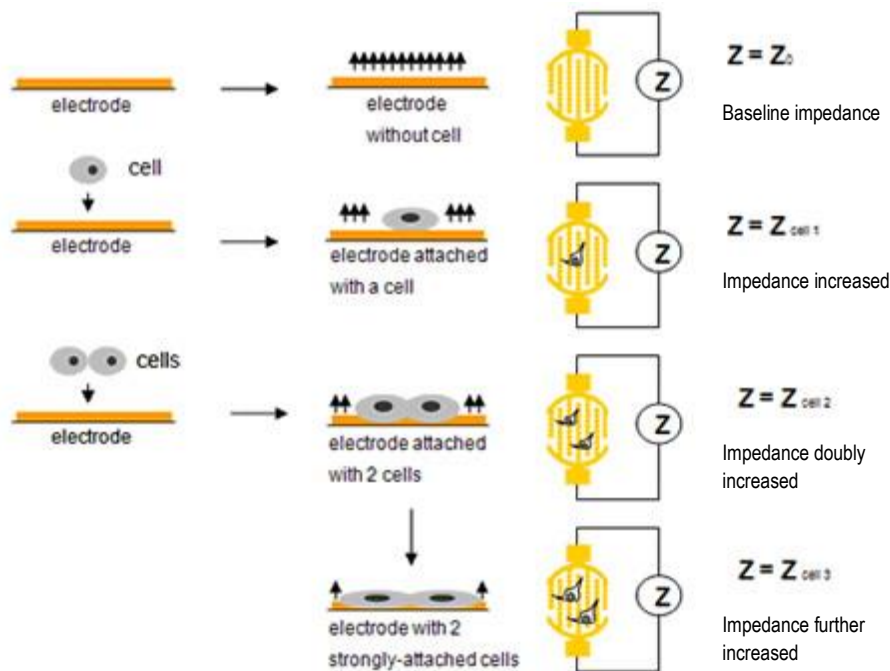


Figure 19 : Principe de la mesure d'impédance⁸.

Les résultats de ces premiers essais ont mis en évidence une différence de réponse cellulaire aux nanoparticules de WC-Co entre les différentes lignées cellulaires. Ainsi, une cytotoxicité et une perturbation du cycle cellulaire ont été observées pour les lignées Hep3B et Caki-1, mais pas pour la lignée A549. Les nanoparticules étaient pourtant bien internalisées dans les trois lignées cellulaires.

La production d'ERO en réponse aux nanoparticules de WC-Co a été mesurée dans les trois types cellulaires par cytométrie en flux grâce au dérivé chlorométhyle de la sonde H₂DCFDA (CM-H₂DCFDA), avec un protocole spécifiquement adapté consistant en

⁸ Acea Biosciences. <http://www.aceabio.com/theory.aspx>. Consulté le 12.05.2014.

une co-exposition des cellules avec la sonde et les nanoparticules. En effet, les protocoles standards, incluant une durée non négligeable de manipulations entre le traitement des cellules et l'analyse au cytomètre, n'ont pas permis de mettre en évidence une production d'ERO dans les cellules incubées avec les nanoparticules. Les résultats obtenus avec le protocole modifié étaient tout à fait corrélés avec les résultats des essais précédents : une production importante d'ERO a été mesurée pour les lignées Hep3B et Caki-1 après exposition aux nanoparticules de WC-Co, en revanche seule une très faible génération d'ERO a été observée pour la lignée A549.

La comparaison entre les déviations de SSC en cytométrie en flux après un traitement continu et après un traitement suivi par une incubation des cellules avec du milieu sans nanoparticules nous a permis d'étudier un éventuel relargage des nanoparticules de WC-Co internalisées par les différentes lignées cellulaires. Là encore, une différence a été observée entre la lignée A549 et les lignées Hep3B et Caki-1, puisque seules les cellules A549 semblaient capables de relarguer les nanoparticules de WC-Co.

Par ailleurs, la génotoxicité induite par les nanoparticules de WC-Co dans les lignées cellulaires Caki-1 et Hep3B a été déterminée par l'étude de l'induction de cassures double-brin de l'ADN grâce à la détection des foyers γ -H2AX.

1.3.2. Article 3

Human cell lines dependent WC-Co nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity: a key role of ROS production

V. Paget, H. Moche, T. Kortulewski, R. Grall, L. Irbah, F. Nessler, S. Chevillard

Soumis dans Toxicological Sciences le 16 juin 2014.

Human cell lines dependent WC-Co nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity: a key role of ROS production

V. Paget^{1,*}, H. Moche^{2,3,4,*}, T. Kortulewski⁵, R. Grall¹, Lamyra Irbah⁵, F. Nessler^{2,4,**,§}, S. Chevillard^{1,5,**}

¹CEA, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Laboratory of Experimental Cancerology, CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

²Institut Pasteur de Lille, F-59019 Lille, France

³Servier Group, F-45520 Gidy, France

⁴EA 4483, University of Lille 2, F-59000 Lille, France

⁵CEA, DSV, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Photonic microscopy platform, 18 route du Panorama, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

⁶Nano Safety Platform, CEA, F-38054 Grenoble, France

* Authors have equally contributed to this work

** Authors have equally supervised this work

§ Corresponding authors

Correspondence: Fabrice Nessler
Institut Pasteur de Lille– Laboratory of Genetic Toxicology
1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex
Phone: +33(0)3 20 87 72 72
Fax: +33(0)3 20 87 73 10
E-mail: fabrice.nessler@pasteur-lille.fr

E-mail addresses:

VP: vincent.paget@cea.fr

LI: lamyra.irbah@cea.fr

HM: helene.moche@pasteur-lille.fr

FN: fabrice.nessler@pasteur-lille.fr

TK: thierry.kortulewski@cea.fr

SC: sylvie.chevillard@cea.fr

RG: romain.grall@cea.fr

ABSTRACT

Although tungsten carbide cobalt (WC-Co) nanoparticles (NPs) have been widely used because of their robustness, their risk to human health remains poorly studied even though they were classified as "probably carcinogenic" for humans (Group 2A) by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in 2006. Our current study aimed at defining the cytotoxicity and genotoxicity of one set of commercial WC-Co NPs of a 60 nm diameter on three human cell lines representative of potential target organs: A549 (lung), Hep3B (liver) and Caki-1 (kidney). The cytotoxicity of WC-Co NPs was determined by evaluating cell impedance (xCELLigence® system), cell survival/death and cell cycle checkpoints by flow cytometry. Furthermore, reactive oxygen species (ROS) generation was also estimated by flow cytometry (CM-H₂DCFDA probe), and genotoxicity was evaluated by γ -H2Ax foci detection (confocal microscopy), which is considered to be the most sensitive technique for studying DNA double-strand breaks. Finally, the cellular incorporation of WC-Co NPs was studied by flow cytometry (side scatter (SSC)) and confirmed by confocal microscopy (light reflection), to ensure that the nanoparticles had entered the cells. Overall, we show from our current findings that WC-Co NPs induce cell mortality, DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human renal (Caki-1) and liver (Hep3B) cell lines but no significant cytotoxic effects in A549 lung cells. Interestingly, although WC-Co NPs effectively entered the cells in all three lines tested, ROS were detected in Caki-1 and Hep3B cells not in A549 cells. This may explain the great differences in the cytotoxic and genotoxic effects we observed between these lines.

KEYWORDS

WC-Co nanoparticles, cytotoxicity, genotoxicity, impedance (xCELLigence®), ROS

INTRODUCTION

Tungsten carbide-cobalt (WC-Co) is an alloy used in cutting tools and wear-resistant surfaces due to its hardness. Occupational exposure to WC-Co has been associated with an increased risk of lung cancer (Moulin et al., 1998), and the International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified this alloy as a group 2A substance i.e. that is probably carcinogenic to humans (IARC, 2006). However, the mechanisms involved in WC-Co toxicity are not fully elucidated, and only a limited number of studies have investigated this issue specifically with WC-Co nanoparticles (NPs). WC-Co NPs have great potential in the hard metal industry, because of their increased hardness compared to microparticles (Richter and Ruthendorf, 1999).

Bastian and colleagues (Bastian et al., 2009) have studied the cytotoxicity of WC-Co NPs against several cell types and showed cell type differences. Moreover, in that study, WC-Co NPs induced a higher level of cytotoxicity than WC NPs with added Co^{2+} ions. One possible explanation for this was that the association of WC and Co produces a specific toxic entity that generates larger amounts of reactive oxygen species (ROS) (Bastian et al., 2009). This mechanism was previously described by Lison and colleagues (Lison et al., 1995) for WC-Co microparticles, involving a transfer of electrons from Co to the surface of WC, where they can more easily reduce dissolved oxygen, resulting in ROS production. Indeed, WC-Co NPs have been shown previously to induce hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) production in suspensions with and without cells (Moche et al, in preparation), and at a higher level in JB6 mouse epidermal cells than WC-Co microparticles (Ding et al., 2009). This ROS generation was associated with apoptosis (Zhao et al., 2013) and is also probably involved in WC-Co NP genotoxicity. Indeed, WC-Co NPs were found previously to be genotoxic in human lymphocytes *in vitro* and in the L5178Y mouse lymphoma cell line (Moche et al., 2014).

In our current study, we investigated the effects of commercially available WC-Co NPs (60-nm average diameter) on three human cell lines that were representative of probable *in vivo* target organs i.e. the A549 lung cell line, Caki-1 kidney cell line and Hep3B liver cell line. The proliferation of cells exposed to WC-Co NPs was studied using a method based on the measurement of impedance (xCELLigence[®]), which was used previously to study SiO_2 NPs (Sergent et al., 2012) and nanodiamonds (Paget et al., 2013). It was shown in this regard that NPs do not interact with the measurement of impedance (Sergent et al., 2012). This method allows real-time monitoring of cell proliferation but also an evaluation of cell morphology, adhesion and membrane potential (Paget et al., 2013). We also assessed cytotoxicity and its correlation with WC-Co NP/cell interactions using flow cytometry. A measure of the side scatter (SSC) deviation was used to study WC-Co NP/cell interactions, according to the method described by Zucker and Daniel

(2010), and cellular internalisation was confirmed by confocal microscopy associated with 3D reconstruction.

Supplementary information was obtained by flow cytometry analysis of the cell cycle and by cellular ROS measurements using an adapted protocol for the CM-H₂DCFDA probe. Moreover, to assess the genotoxicity induced by WC-Co NPs, we measured DNA double-strand breaks using nuclear γ -H2Ax foci counts and confocal microscopy. All of these assays enabled us to study the involvement of ROS in WC-Co NP toxicity and thereby provide an explanation for the variability of the responses observed between different cell types.

MATERIALS AND METHODS

Nanoparticle characterization and preparation

WC-Co NPs (8% wt/wt Co) were purchased from Nanostructured and Amorphous Materials, Inc (Houston, TX). The WC-Co NPs used in this study have been well described in our previous study (Moche et al., 2014). The hydrodynamic diameters and zeta potentials of the WC-Co NPs were measured at 37°C by DLS (Dynamic Light Scattering) using a Malvern Nano ZSP (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) with a 173° backscatter angle. The DLS measurements were made at 37°C in order to match the cell exposure conditions and using the manufacturer's calibration procedures. All samples were stabilized for 10 minutes at 37°C before recordings were taken of suspensions at 1 mg/mL.

Cell lines and cell culture

Human A549 cells (ATCC number: CCL-185™) and Caki-1 cells (ATCC number: HTB-46™) were routinely grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) glutamax supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum and 1 mM antibiotic-antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA). This medium is considered to be complete DMEM. Human Hep3B cells (ATCC number: HB-8064™) were also grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, but using modified Eagle medium (MEM) supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum, 5 mL of 200 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 1% (v/v) 100 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) 1 M HEPES (Sigma-Aldrich) and 1 mM antibiotic-antimycotic (Invitrogen). This medium is considered to be complete MEM.

Measurement of WC-Co NP-cell interactions, cell death, and NP release by flow cytometry

Following 15 min, and 24, 48 or 72 h treatments of the tested cell lines with WC-Co NPs, supernatants were collected and the cells were trypsinized for 5 min. Trypsin was inactivated by the addition of complete medium, collected, and added to the corresponding supernatant. The tubes were then centrifuged for 5 min at 300xg and the pellet was resuspended in 500 μ L of PBS (+MgCl₂ +CaCl₂) containing 5% FBS and then transferred to flow cytometry-compatible tubes (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ). Multi-parametric analyses were performed on a BD FacsCalibur using FlowJo 7.5.5 software (Ashland, OR). An initial analysis was done on size/granulometry parameters to collect living and dead cells and to remove fragmented cells. This first step allowed us to determine the gate where at least 2×10^4 events per replica were recorded. Upon these gated events, the To-Pro3 (Molecular Probes[®], Invitrogen; Carlsbad, CA) signal was subsequently collected on FL4 (λ_{em} : 661/16 nm) after He-Ne laser excitation at 635 nm and was used for the analysis of cell viability since this dye is compatible with the equipment and with nanoparticle detection. The results were reported as the mean distribution of the cells combining SSC and To-Pro3 measurements as described in our previous study (Paget et al., 2013). For NP release measurements (25 and 50 μ g/mL) at 24, 48 and 72 h, analysis was performed on size/granulometry parameters. A continuous exposure of up to 72 h was done and SSC variations were compared to those obtained following a 24 h exposure and the subsequent removal of NPs to be replaced by fresh cell culture medium up to 72 h.

WC-Co NPs internalization using confocal microscopy

For each experiment, 2.5×10^4 A549, Caki-1 or Hep3B cells were plated on 14 mm uncoated glass bottom dishes (Ref P12G-1.5-14-F, MatTek) for at least 24 h prior to the experiment. The cells were then treated for 15 min and 24 h with WC-Co NPs at the concentration of 150 μ g/mL. Hoechst 33342 was added (1 μ g/mL final) to the NP suspension at 15 min prior to the end of treatment. The cells were then washed twice with 1 mL of fresh medium prior to the addition of 1 μ L of CellMask™ Deep Red plasma membrane Stain (Ref C10046, Molecular Probes; 5 μ g/mL final concentration). Each well was then rinsed twice with 1 mL of fresh medium before imaging. Fluorescent images were captured through a Plan Fluor 63X objective (NA: 1.4) on a Leica SP8 confocal laser scanning microscope system attached to an inverted DMI6000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Images were acquired in a 1200 X 1200 pixel format with a resolution of 60 nm/pixel in the x,y dimensions and 0.3 μ m/pixel in the z dimension. Details concerning these acquisition settings are provided in Supplementary 6.

xCELLigence® (real-time follow-up)

Impedance measurements principle has been well described in our previous study (Paget et al., 2013). The background of the E-plates (specific 96 wells microplates covered with electrodes; ACEA Biosciences, San Diego, CA) was determined in 50 μL of medium to which 150 μL of each cell suspension was subsequently added (5×10^3 cells/well for both cell lines). Cells were incubated for 30 min at 37°C and E-plates were placed in a Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (ACEA Biosciences, San Diego, CA). Cells were grown for at least 24 h, with impedance measured every 5 min for 6 h (adhesion phase), and then every 10 min (proliferation phase). After at least 24 h, cells were exposed to WC-Co NPs at concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and were monitored every 5 min for 6 h (early effects), and then every 10 min for 66 h (late effects). Triton at 0.005% (for Caki-1 and Hep3B cells) and at 0.01% (for A549 cells) was used as positive control during the whole experiment.

Measurement of ROS levels by flow cytometry

As conventional protocols failed to detect ROS (Figure 3a and b), we employed a 15 min co-exposure of the cells to WC-Co NPs and the CM-H₂DCFDA probe. A549, Caki-1 and Hep3B cells were coexposed to 5, 25, 75, 150 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of WC-Co NPs and CM-H₂DCFDA probe (6.67 μM final). H₂O₂ was used as positive control for all three cell lines, based on a 15 min exposure to a mix of PBS (+MgCl₂ +CaCl₂) containing 5% FBS and 3 μM (final) CM-H₂DCFDA probe. A negative control experiment was also performed to confirm that the WC-Co NPs did not interfere with the probe. This was found to be the case at the highest dose (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) using solvent (DMSO) instead of the CM-H₂DCFDA probe. After 15 min of exposure, all wells were trypsinized for 5 min. Trypsin was inactivated by adding complete medium and the cells were centrifuged for 5 min at 300xg and then resuspended in 500 μL of PBS 1X (+MgCl₂ +CaCl₂) containing 5% of FBS. All samples were placed upon ice in the dark until acquisition. Acquisitions were performed on a BD FacsCalibur using CellQuest Pro software and then mono-parametric analyses were performed using FlowJo 7.5.5 software. During the acquisitions, the initial analysis was done using size/granulometry parameters. This first step allowed us to determine the gate where at least 2×10^4 events per replica were recorded. Then upon these gated events, the CM-H₂DCFDA (Molecular Probes®, Invitrogen; Carlsbad, CA) signal was collected using the FL1 channel (λ_{em} : 525/50 nm) after an air-cooled Argon Ion laser excitation at 488 nm (15 mW).

Cell cycle analysis by flow cytometry

After 24, 48 or 72 h treatments with WC-Co NPs, cells were washed and trypsinized for 5 min. Trypsin was inactivated by adding complete medium and the cells were then centrifuged for 5 min at 300xg and resuspended in 1 mL of PBS (+MgCl₂ +CaCl₂) containing 5% FBS. The resuspended cells were then fixed via the dropwise addition of 3 mL of 70% ethanol and the tubes were placed at -20°C overnight. The fixed cells were then centrifuged for 5 min at 300 x g and resuspended at 300 µL/tube of a mix containing [PBS (+MgCl₂ +CaCl₂) + 5% of FBS + PI (at 25 µg/mL final) + RNase A (50 µg/mL final)]. Finally, the tubes were placed at 4°C overnight to adequately stain the DNA. Mono-parametric analyses were performed the next day on a BD FacsCalibur using FlowJo 7.5.5 software. The first analysis was done using size/granulometry parameters. This first step allowed us to determine the gate where at least 2×10^4 events per replica were recorded. Upon these gated events, the PI (Molecular Probes[®], Invitrogen Carlsbad, CA) signal was collected on the FL2 channel (λ_{em} : 585/42 nm) after air-cooled argon ion laser excitation at 488 nm (15 mW). The FL2 signal was plotted as FL2-W versus FL2-A in a dot plot graph which allowed to discriminate doublets (e.g. a G₁ doublet from a G₂/M single) or cellular aggregates (Nunez, 2001) The results were reported as the mean distribution of Caki-1 and A549 cells and as one representative experiment among three independent experiments for Hep3B cells.

Assessment of genotoxicity through the measurement of γ -H2Ax-foci

We seeded 13×10^4 Caki-1 or Hep3B cells onto an 8 well Lab-Tek™ II Chamber Slide™ (Nunc) at least 24 h before exposure. As a positive control, Caki-1 cells were γ -irradiated at 1, 2 and 5 Gy using a ¹³⁷Cs irradiation unit at a dose rate of ~ 2 Gy/min, and then immediately fixed and stained. For WC-Co NP exposure, cells were treated for 24 h with nanoparticles at doses of 5, 25 and 75 µg/mL. After treatment we applied the protocol described in detail in our previous study (Paget et al., 2013).

We used confocal microscopy to count γ -H2Ax foci as described in our previous study (Paget et al., 2013).

Statistical analysis

To compare the number of γ -H2Ax foci, we employed a Wilcoxon rank test based on at least 200 observations for each condition.

RESULTS

Characterization of nanoparticles

Characteristics of the WC-Co NPs used in our current study have been described in our previous report (Moche et al., 2014). Nevertheless, complementary measurements of WC-Co NP polydispersity indexes and zeta potential were performed on the complete cell culture media used in our present study (Table 1). The zeta potential was negative for all suspensions (Table 1) and the high polydispersity index we measured (>0.5) indicated that the WC-Co NPs were either isolated or had formed aggregates (Table 1).

Table 1. Polydispersity Indexes and Zeta Potential of WC-Co NP suspensions in different media.

Suspension medium	Polydispersity Index (PDI)	Zeta Potential (mV)	
		Value	SD
BSA-water ^a	0.566	-33.70	±0.10
Complete DMEM ^b	0.545	-10.57	±0.32
Complete MEM ^c	0.501	-10.15	±0.28

^a 0.05% wt/vol BSA in water.

^b DMEM medium with 10% vol/vol FBS.

^c MEM medium with 10% vol/vol FBS.

Flow cytometric analysis of WC-Co NP/cell interactions

Flow cytometry was used to estimate cell viability and cell death, and simultaneously determine if the nanoparticles interacted with the cell membrane or entered the cells. Flow cytometry was performed at 15 min, and at 24, 48 and 72 h for each cell line treated with 5, 25, 50 (A549 cells only), 75 and 150 µg/mL of WC-Co NPs. WC-Co NP/cell interactions (within and/or around the cells) were estimated from a modification of the SSC (side scatter) that reflects changes in cell granulometry (Supplementary 1). WC-Co NPs entered the cells regardless of cell type or period following exposure, (Supplementary 2). After 15 min of exposure, A549 cells showed a significant SCC increase at the highest WC-Co NPs concentration (150 µg/mL) whilst under the same conditions, the SCC was significantly increased at 25 µg/mL and higher levels of WC-Co NPs for both the Caki-1 and Hep3B cell lines (Supplementary 2a). The SCC deviation observed in A549 cells reached a maximum and then decreased as a function of time, except for the WC-Co NP concentration of 150 µg/mL, suggesting that

A549 cells are able to expel NPs (Supplementary 2b). On the other hand, the SSC deviation increased as a function of the WC-Co NP exposure time for Caki-1 and Hep3B cells (Supplementary 2c and 2d, respectively).

Confocal microscopy and 3D reconstruction

Confocal microscopy and 3D reconstruction were performed to support the flow cytometric analysis of intracellular WC-Co NPs as the detection of these particles is possible by reflection at 565 nm. A 3D reconstruction of A549 cells exposed for 15 min and 24 hours with 150 µg/mL of WC-Co NPs is presented as an example of this approach in Supplementary 3. Even after 15 min of exposure, a small amount of WC-Co NPs could be detected within A549 cells (Supplementary 3b), with more of these NPs detectable within the cells after 24 hours of exposure (Supplementary 3d).

xCELLigence® screening and flow cytometric analysis of cytotoxicity

WC-Co NP cytotoxicity was first measured by analyzing variations in cell impedance after NP exposure (xCELLigence®). Each cell line was exposed to 1, 5, 25, 50, 75, 100 and 150 µg/mL concentrations of WC-Co NPs or to Triton as positive cytotoxic control (0.005% for Caki-1 and Hep3B cells and 0.01% for A549 cells for which the 0.005% concentration did not induce massive cell death; Figure 1).

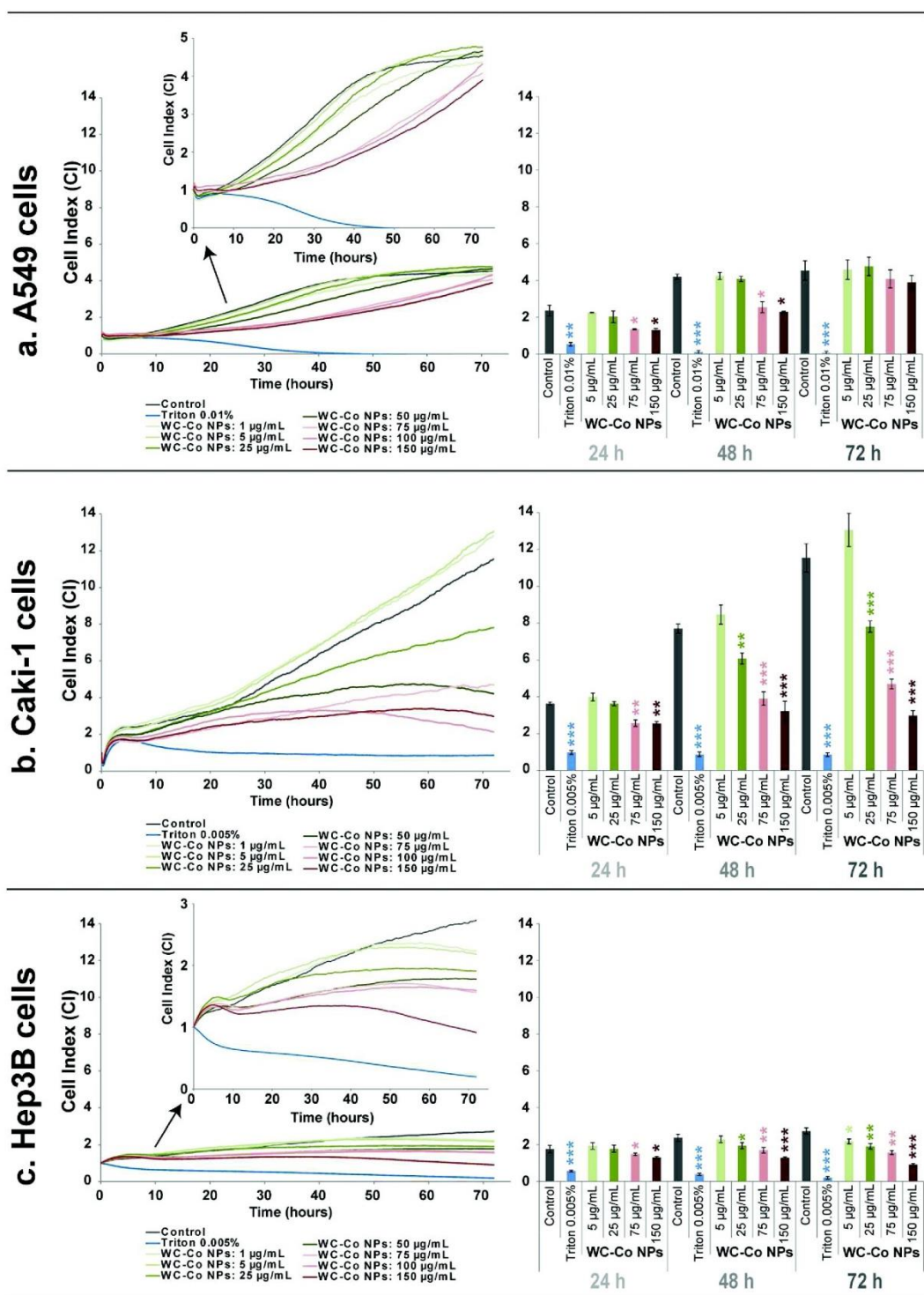


Figure 1. Cell index real-time monitoring and viability of cells exposed to WC-Co NPs. Cell index real-time monitoring and viability of A549 (a), Caki-1 (b) and Hep3B cells exposed to WC-Co NPs. Impedance measurements (one representative experiment among three independent experiments) were carried out for 72 h and cell indices were normalized at time 0 to ensure there was no inter-well variability prior to the addition of nanoparticles. Control cells were not exposed to WC-Co NPs. Positive control cells were exposed 72 h to triton 0.005% for Caki-1 and Hep3B cell lines and to triton at 0.01% for A549 cells. The histograms correspond to CI values at three end-points (24, 48 and 72 h) for control cells, positive control (triton) and for cells exposed to 1, 5, 25, 50, 75, 100 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of WC-Co NPs. Statistical analysis was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student's t-test, * corresponding to $p < 0.01$).

Interestingly, WC-Co NP treatment of A549 cells from 1 to 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ did not have any significant growth rate effects compared with the control, although a short delay was noted in the early stages after exposures with concentrations $> 75 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 1a). In contrast, as compared to the controls, significant variations in the cell index (CI) values were observed for Caki-1 and Hep3B cell lines exposed to WC-Co NPs. Hep3B cells were slightly more sensitive than Caki-1 cells, as indicated by the CI decreases at the lowest WC-Co NP dose of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for Hep3B (Figure 1c) but only for doses $\geq 25 \mu\text{g}/\text{mL}$ for Caki-1 cells (Figure 1b). The CI profile of Hep3B exposed to 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of WC-Co NPs indicated a massive cell death response (Figure 1c, deep red curve).

Cell death was assessed by flow cytometric analysis via To-Pro-3 labeling (FL4). An example of our biparametric analysis of the WC-Co NP/cell interactions and mortality (SSC/FL4) for Hep3B cells is shown in Supplementary 4. The cut-offs for WC-Co NPs positive cells and for dead cells were defined and set up as compared to control condition (Supplementary 4a and 4b). As a positive control, cell mortality was measured after exposure to 0.005% Triton for both cell lines (a higher concentration of Triton at 0.01% was used for A549 cells in order to achieve 100% of mortality after 72 hours; Figure 2a). For the three cell lines, significant mortality was detected at 24, 48 and 72 hours after Triton exposure verifying the high sensitivity of the technique. Regarding WC-Co NP cytotoxicity, no significant mortality was observed for A549 cells, even at the highest WC-Co NP concentration (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at which almost 60% of the cells were positive for these NPs (Figure 2a). In contrast, a significant increase in cell mortality was detected for both Caki-1 cells and Hep3B cells exposed to WC-Co NPs (Figures 2b and c). Hep3B cells were found to be more sensitive since 50% and 85% of these cells died after 48 and 72 hours of WC-Co NP exposure, respectively, compared to only 30% of Caki-1 cells at 72 hours (Figure 1c).

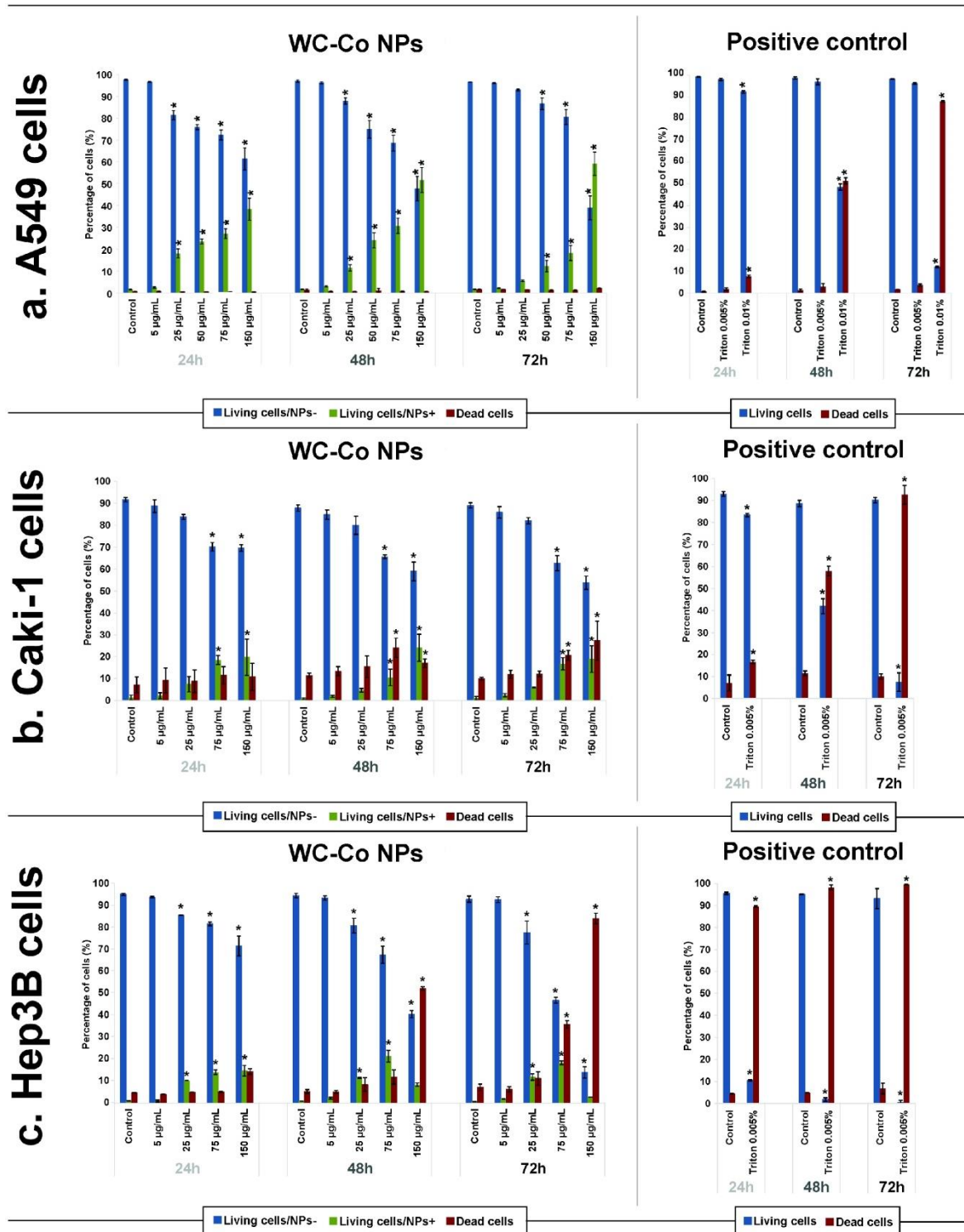


Figure 2. WC-Co NPs/cells interactions measured by flow cytometry. WC-Co NPs/cells interactions were measured by flow cytometry for A549 (a), Caki-1 (b) and Hep3B (c) cells exposed for 24, 48 and 72 h to WC-Co NPs at 5, 25, 50 (only for A549 cell line), 75 and 150 $\mu\text{g/mL}$. Percentages of WC-Co NPs-positive and negative cells were determined by WC-Co NPs-induced change in SSC signal. Triton (0.005% and 0.01%) was used as positive control for cell death measurements. Percentages of dead cells were determined by mean of the To-Pro3 signal in the FL4 channel. Data represent the mean percentage \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student's t-test, * corresponding to $p < 0.01$).

NP release

To estimate WC-Co NP release from the cells, WC-Co NP cell content was measured (SSC) either after 72 hours of continuous exposure (Supplementary 5, column 1) or 24 hours of exposure followed by 48 hours of growth in fresh culture medium (Supplementary 5, column 2). SCC variations were measured for the three cell lines exposed to 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of WC-Co NPs. Overall, we observed that when cells were exposed for 24 hours and then cultivated in fresh medium, the number of WC-Co NP-positive A549 cells decreased as a function of time, whereas this positivity remained stable for Caki-1 and Hep3B cells (Supplementary 5). Interestingly, the number of WC-Co NP-positive cells also decreased after 72 hours of continuous exposure of A549 cells to these particles (Supplementary 5a), whilst remaining constant for Caki-1 and Hep3B cells (Supplementary 5b and 5c, respectively). Since no cell death was observed in A549 cells after WC-Co NP exposure, these results strongly suggest that these cells can expel the NPs, which may not be the case for Caki-1 and Hep3B cells.

Production of Reactive Oxygen Species

To measure the production of intracellular reactive oxygen species (ROS), we used either a conventional protocol, which due to its processing time does not enable an analysis of ROS production earlier than 60 minutes after exposure (Figures 3a and 3b), or a method that we specially adapted to analyze ROS at a timepoint earlier than 30 minutes after exposure (see materials and methods; Figure 3c and Figure 4).

The first experiments were performed using Caki-1 cells exposed to WC-Co NPs using either the conventional protocol (Figure 3a) or a modified protocol (Chen et al., 2010, Kuhnel et al., 2012) involving a 30 min pre-incubation of the cells with the CM-H₂DCFDA probe (Figure 3b). In both cases, no increases in ROS levels were detected even at a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dosage of WC-Co NPs. In contrast, exposure to H₂O₂ (6.6 mM, positive control) led to a strong increase in the ROS levels under the same conditions, with a 27.3- and 3.5-fold increase over unexposed cells observed for the conventional and pre-incubation protocols, respectively (Figure 3a and 3b). To ensure that NPs themselves did not induce any effect in terms of the collected signal, a negative control was systematically performed at the highest WC-Co NP concentration (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) without CM-H₂DCFDA probe (sample names labelled with an R⁻; Figure 3 column 2). For both protocols, we did not observe any changes in the ROS level compared to control cells without a CM-H₂DCFDA probe (TR⁻), thus indicating that no interference occurred in the FL1 channel even for WC-Co NP concentrations up to 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 3, column 2).

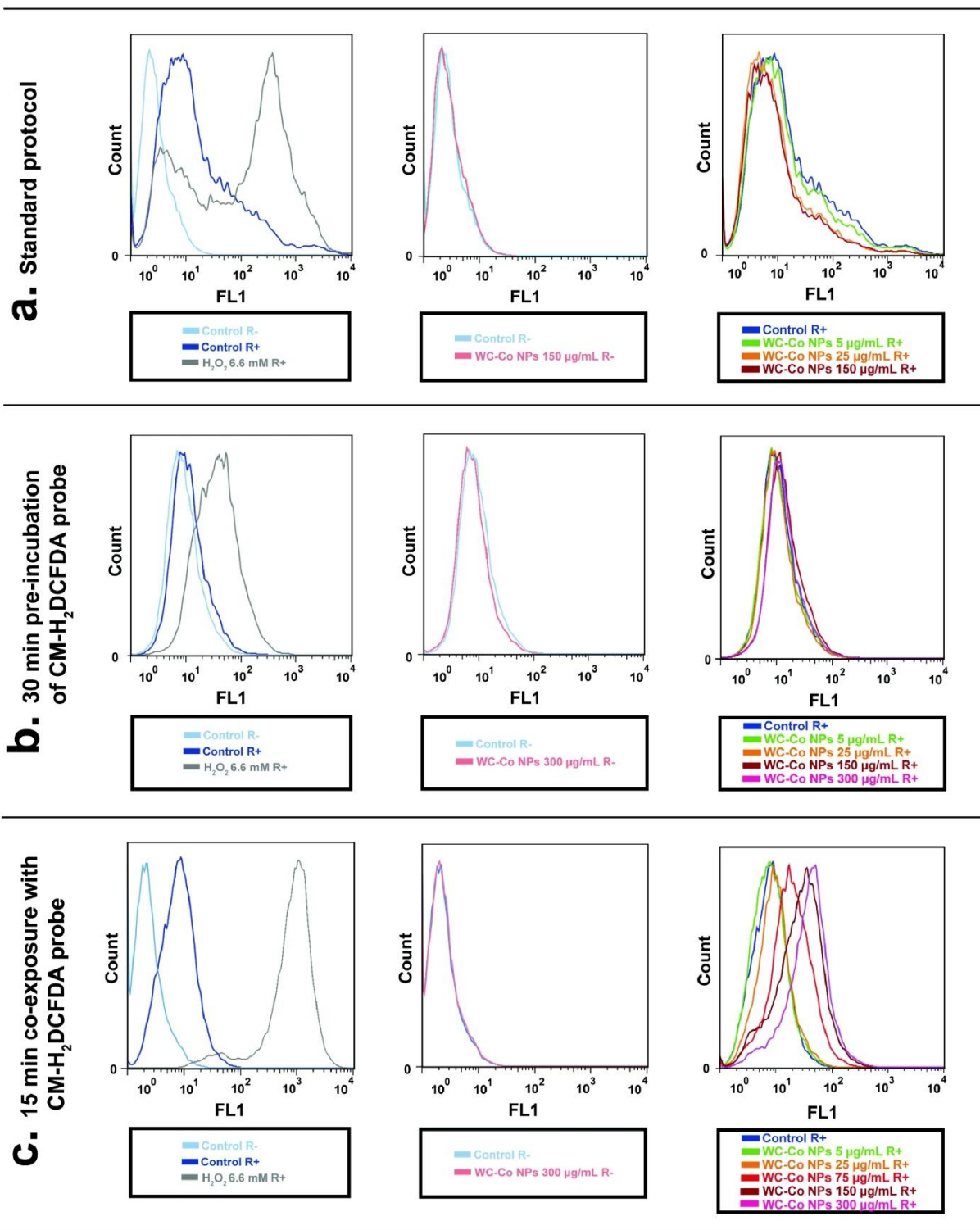


Figure 3. CM-H₂DCFDA protocol strongly impacts ROS detection efficiency. Example of ROS dosages for Caki-1 cells exposed 15 min to WC-Co NPs using conventional protocol (a), protocol using a 30 min pre-incubation with the CM-H₂DCFDA probe before NPs exposure (b) and a 15 min co-exposure to WC-Co NPs and to CM-H₂DCFDA probe (c). H₂O₂ at 6.6 mM was used as positive control in each protocol. Possible interferences between the CM-H₂DCFDA probe and WC-Co NPs were also controlled. The signals from Control R- and the highest concentration of NPs (150 or 300 µg/mL, depending on the experiment) being perfectly superimposed (column 2) testify that no interferences occur in the different protocols. Data correspond to one representative experiment among three independent experiences.

Due to the processing time, these conventional protocols did not permit us to analyze ROS production at an earlier timepoint than 60 minutes after WC-Co NP exposure.

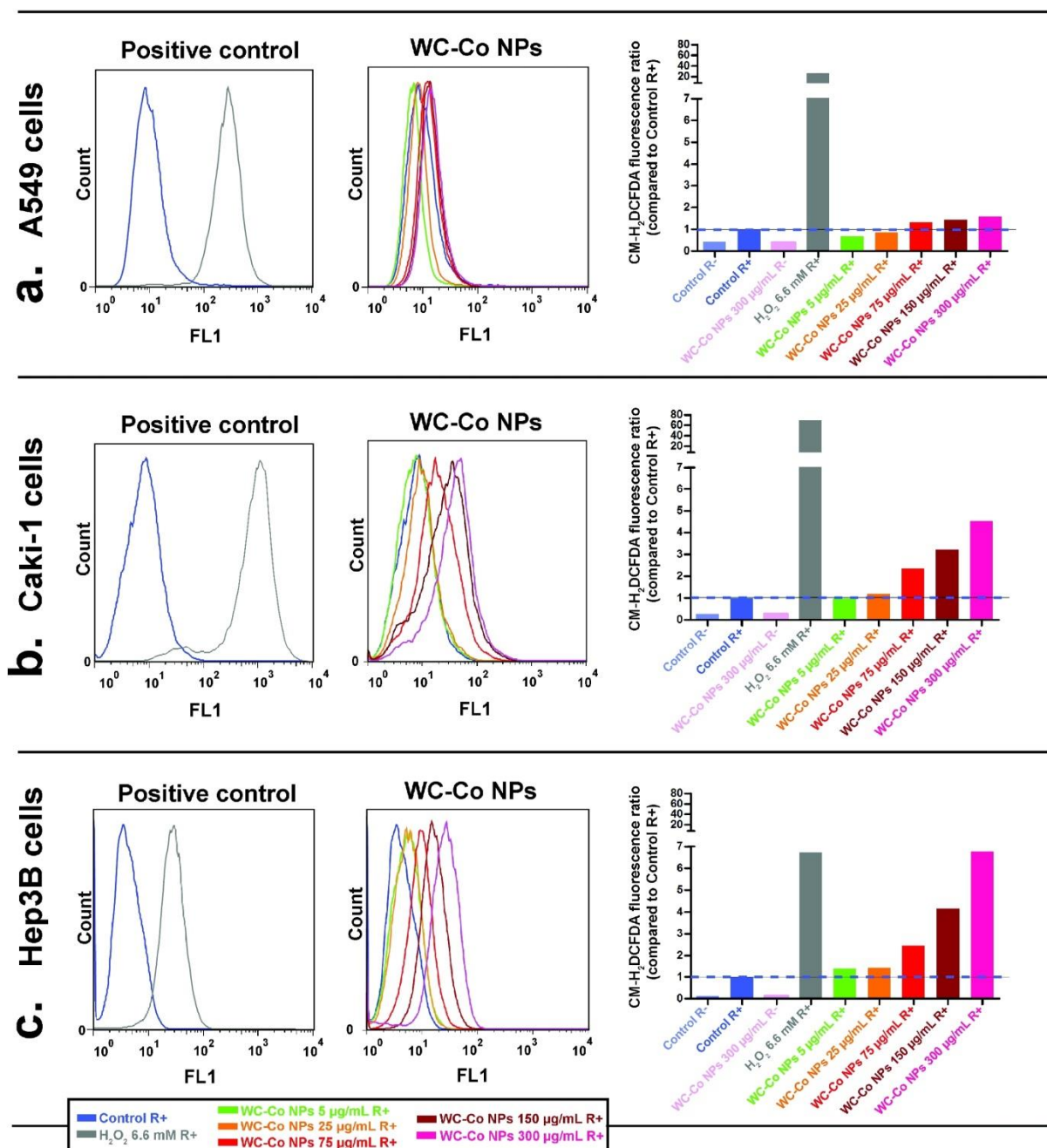


Figure 4. ROS induced by WC-Co NPs using the adapted protocol. A549 (a), Caki-1 (b) and Hep3B (c) cells were exposed 15 min to WC-Co NPs from 5 to 300 µg/mL and H₂O₂ (6.6 mM) was used as positive control. ROS were detected using CM-H₂DCFDA probe on FL1 channel. Possible interferences between the CM-H₂DCFDA probe and WC-Co NPs were also controlled. The signals from Control R- and the highest concentration of NPs (150 or 300 µg/mL, depending on the experiment) being perfectly superimposed (column 2), testified that no interferences occur in the different protocols. Data correspond to one representative experiment among three independent experiences.

Finally, we attempted a co-exposure of WC-Co NPs and CM-H₂DCFDA probe for 15 minutes. This protocol was specifically adapted to analyze ROS in the first 30 minutes after exposure and was formerly validated by Caki-1 cell co-exposure to probe and H₂O₂. Figures 3c and 4b show the strong observed increase in the signal (x67) compared with unexposed cells. Using this protocol, it was possible to detect a significant dose-dependent ROS increase after WC-Co NP Caki-1 cell exposure for 15 min (Figure 3c and Figure 4b). We also performed the same co-exposure protocol with NPs and CM-H₂DCFDA probe using the A549 and Hep3B cell lines (Figure 4). As in Caki-1 cells, WC-Co NPs at a dosage from 5 to 300 µg/mL induced a dose-dependent increase in the ROS levels in Hep3B cells. This was up to a 7-fold increase compared with unexposed cells, equaling the ROS level detected after treatment with H₂O₂ (Figure 4c). Surprisingly, we did not observe any significant increase in ROS generation after a 15 min exposure of A549 cells to WC-Co NPs, even at the highest dose of 300 µg/mL, whilst a 26-fold increase was measured after treatment with H₂O₂ compared with unexposed cells (Figure 4a).

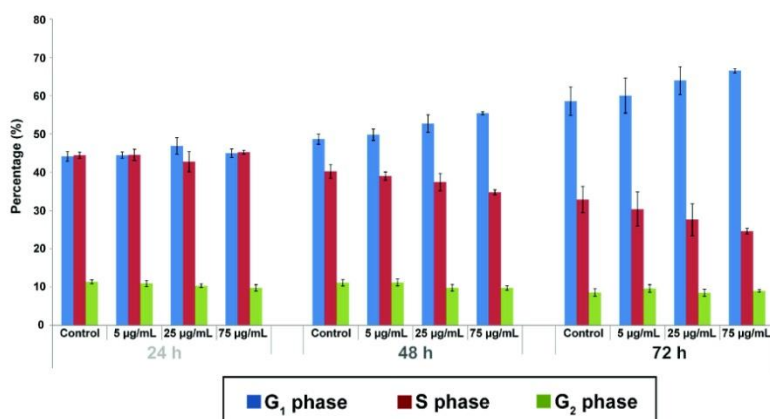
Cell cycle analysis

The impact of WC-Co NPs on the cell cycle was studied by propidium iodide (PI) staining using FlowJo software. All cell lines were treated for 24, 48 and 72 hours with 5, 25 and 75 µg/mL of WC-Co NPs. No significant cell cycle modification compared to the control conditions was observed in A549 cells, even at the highest concentration (75 µg/mL; Figure 5a). Caki-1 cells exposed for 24 hours to WC-Co NPs presented a significant double blockage in G₁ and G₂ (as seen by the decrease in S-phase cells) at the highest concentration (75 µg/mL) which was more intense after 48 and 72 hours (Figure 5b). Finally, WC-Co NPs showed a strong dose- (even at the lowest concentration of 5 µg/mL) and time-dependent impact on the cell cycle in Hep3B cells (Figure 5c).

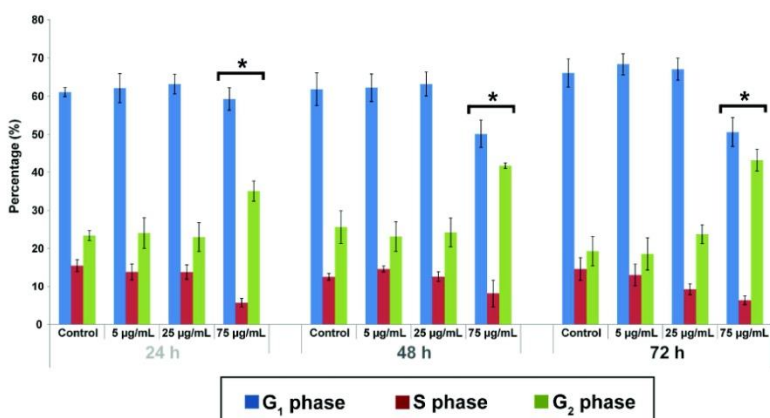
Genotoxicity of WC-Co NPs

The genotoxicity of WC-Co NPs was measured by assessing the distribution of γ-H2Ax foci per nucleus on Caki-1 and Hep3B cell lines (Figure 6). Given the negative results obtained for the other endpoints after the treatment of A549 cells with WC-Co NPs, genotoxicity was not analyzed in A549 cells. Irradiation was used as a positive control and a dose-dependent increase in the number of foci was detected compared to non-irradiated Caki-1 cells (Figure 6a). The overall results showed that WC-Co NPs are genotoxic in Caki-1 and Hep3B cells after 24 hours of exposure, as indicated by the increase in the number of γ-H2Ax foci at an NP concentration of 25 µg/mL (Figure 6b).

a. A549 cells



b. Caki-1 cells



c. Hep3B cells

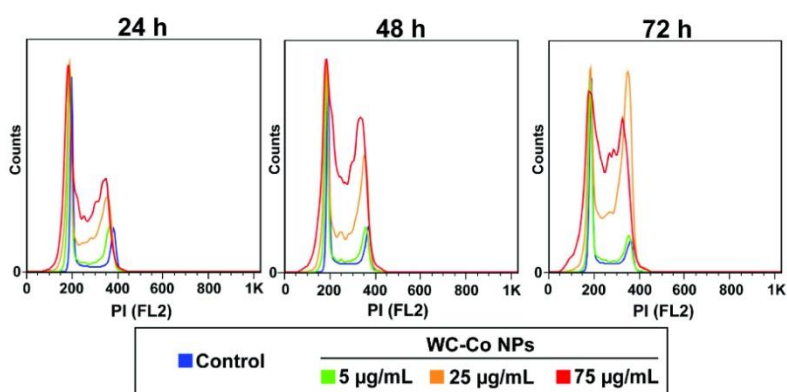
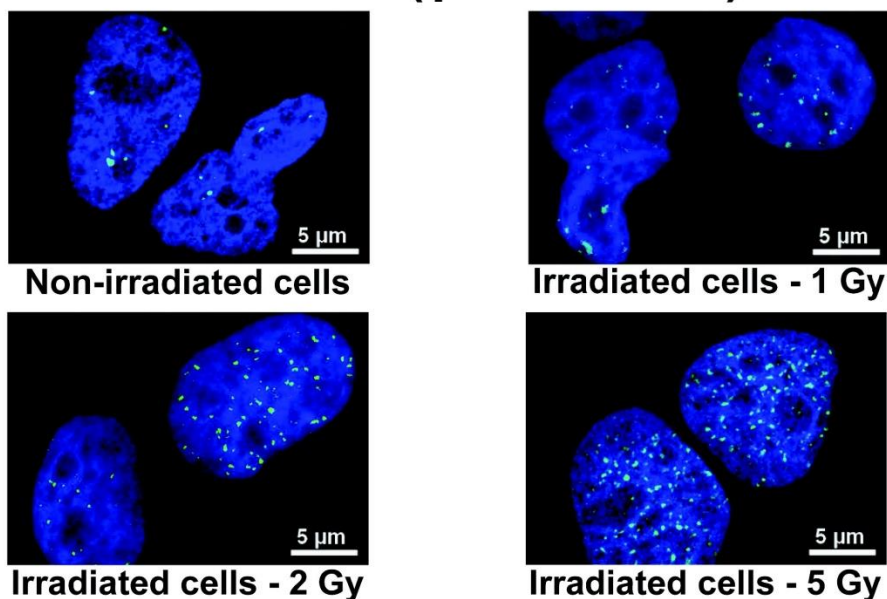


Figure 5. Cell cycle analysis after an exposure to WC-Co NPs. Cell cycle analysis for A549 (a), Caki-1 (b) and Hep3B (c) cell lines exposed 24, 48 and 72 h to 5, 25 and 75 µg/mL of WC-Co NPs. DNA content was estimated by measurement of PI fluorescence on FL2 channel. For A549 and Caki-1 cell lines, data correspond to the mean values of three independent experiences while for Hep3B cell line, data correspond to one representative experiment among three independent experiences (Cell cycle percentages were not provided for Hep3B cell line as the FlowJo cell cycle analysis tool was unable to correctly fit the cell cycle curve). Statistical analysis was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student's t-test, * corresponding to $p < 0.01$).

a. Positive control (γ -irradiation)



b. WC-Co NPs (24 h)

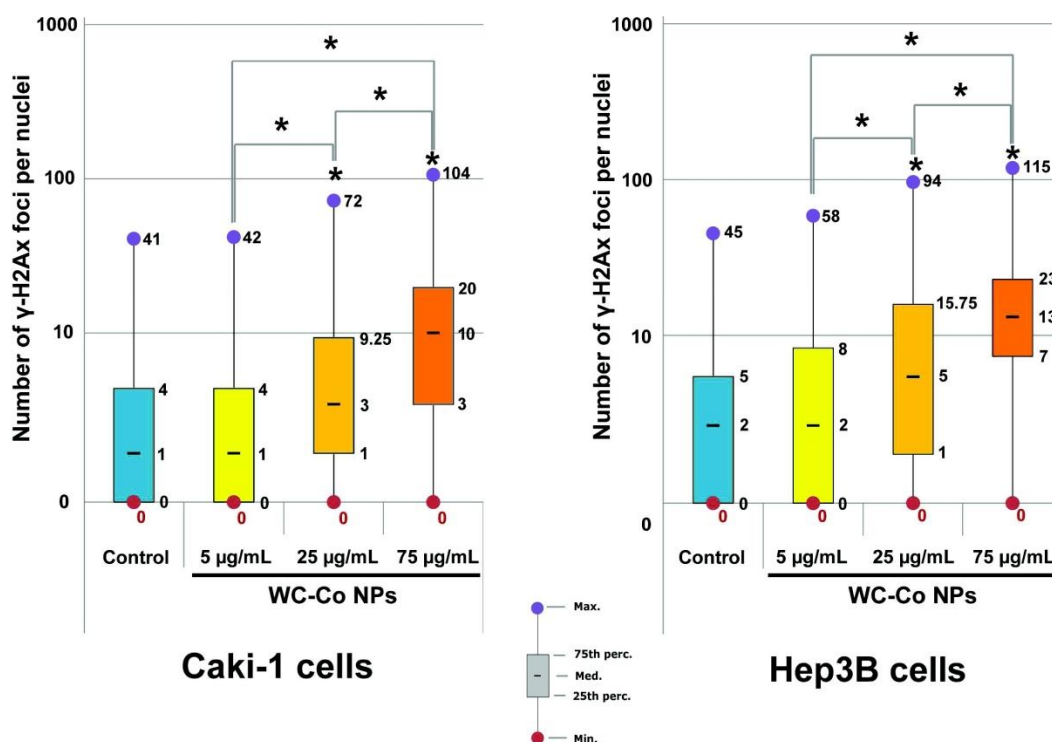


Figure 6. WC-Co NPs genotoxicity measured by γ -H2Ax foci counts. Counts were performed on at least 200 cells per condition and results are depicted as box plot distribution values [minimum (min), maximum (max), median, 25th and 75th percentiles (25th and 75th perc.)] of the number of foci obtained in each tested condition. A Wilcoxon rank test (comparisons versus control cells not exposed to NPs) was performed (* corresponds to $p < 0.01$). For both cell lines, WC-Co NPs induce genotoxicity following a dose dependent effect.

DISCUSSION

To date, no extensive study combining real-time follow-up of cell growth, cytotoxicity/genotoxicity, NPs internalization, ROS generation and cell cycle analysis of various cell lines representative of potential retention organs has been reported for WC-Co NPs. Our present study focuses on *in vitro* cytotoxicity/genotoxicity of the well-characterized WC-Co NPs which were investigated in A549 (lung), Hep3B (liver) and Caki-1 (kidney) cell lines using WC-Co NP concentrations from 1 to 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (corresponding to 0.67 to 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). This range of concentrations is comparable to those used in other WC-Co NP studies (up to 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Bastian et al., 2009, Ding et al., 2009). A549 human lung carcinoma cells were chosen as one of our experimental models as they are of human origin, are representative of a target organ of one of the main routes of NP exposure (pulmonary), and are proficient for p53 DNA repair and apoptosis (Gonzalez et al., 2014). To study secondary target organs, the Caki-1 cell line was chosen as it is representative of human kidney proximal tubules (Glube et al., 2007). Hep3B cells were also included in this study as they have been used previously in drug metabolism and toxicity studies (Suzuki et al., 2008, Guo et al., 2011).

To fully interpret NP toxicity data, a prerequisite task is to define if these particles enter cells, as it has already been demonstrated that NPs can cause DNA damage across cellular barriers (Bhabra et al., 2009). To evaluate NP localization in our current study, we first followed SSC deviations by flow cytometry, as previously described for TiO_2 NPs (Zucker et al., 2010), silver NPs (Zucker and Daniel, 2012, Zucker et al., 2013) and more recently for diamond NPs (Paget et al., 2013). We successfully measured WC-Co NP-cell interactions (either NP interactions with the cell membrane and/or NP entry into the cell; Supplementary 1). SSC variations indicated that NP internalization was lower overall in A549 cells compared to Caki-1 and Hep3B cells (Supplementary 2). To validate WC-Co NP detection by flow cytometry, confocal microscopy using a spectral mode was preferred to the darkfield microscopy method used previously for detecting silver and TiO_2 NPs (Zucker and Daniel, 2012) but without any information in the z dimension. We found that confocal microscopy coupled to 3D cell volume reconstruction was a more powerful and more sensitive technique for this purpose (Supplementary 3). To compare the techniques, we chose A549 cells as they contained fewer NPs, as evidenced by the lower SSC variation than the other cell types (Supplementary 2a). The results obtained using confocal microscopy (Supplementary 3) were similar to the data obtained by flow cytometry and thus reinforced the usefulness of flow cytometry for the easy and rapid detection of intracellular WC-Co NPs.

To analyze WC-Co NP toxicity, we used a real-time monitoring xCELLigence[®] system, which is a useful and sensitive method for simultaneously screening many cell

lines at different concentrations (Ke et al., 2011), without artifactual variations on the signal when dealing with nanoparticles (Paget et al., 2013). For the A549 cell line, exposure to WC-Co NPs did not induce any significant cellular effects. (Figure 1a). On the other hand, strong dose- and time-dependent decreases in the CI values were observed for the Caki-1 and Hep3B cell lines after exposure to WC-Co NPs at doses > 25 µg/mL (Figure 1b and 1c). As CI variations could reflect changes in cell viability, morphology and in the membrane potentials of cells, we also analyzed cell viability by flow cytometry. Cell death was analyzed by To-Pro-3 labeling (FL4) (Van Hooijdonk et al., 1994) and by combining the analysis of WC-Co NP-cell interactions and mortality (SSC/FL4), we were able to discriminate viable cells with and without NPs and dead cells. Interestingly, no cell death was observed for the A549 cell line (Figure 2a). This absence of A549 cell mortality in our current experiments accorded with previously reported findings of no mortality after a 72 h exposure to lower concentrations (< 30 µg/mL) of WC-Co NPs (Bastian et al., 2009).

In contrast to our findings in A549 cells, cell death was detected in Caki-1 and Hep3B cells after exposure to WC-Co NPs (Figure 2b and 2c, respectively). Surprisingly, with regard to the number of viable cells containing NPs, we observed that the percentage of WC-Co NP-positive A549 cells decreased with time (except at the highest NP concentration) (Figure 2a) but increased or reached a plateau in the case of Caki-1 and Hep3b cells (Figure 2b and 2c). Since this reduction in the number of WC-Co NP-positive A549 cells was observed in the absence of cell death, the most likely explanation for this phenomenon was that these lung cells, unlike Caki-1 and Hep3B cells, contain multidrug pump(s) (Lehmann et al., 2001, Meschini et al., 2002) that could facilitate WC-Co NP efflux. It should be mentioned in this regard that A549 cells have the capability to uptake and release SiO₂ nanoparticles (Stayton et al., 2009). To verify if this capability applied also to WC-Co NPs in these cells, we tracked the NP content in A549 cells after a 24 h exposure followed by washes and incubation in NP-free cell culture medium (Supplementary 5). We observed a continuous decrease in SSC deviation which indicated the ability of A549 cells to expel WC-Co NPs (Supplementary 5a). Under the same conditions, we did not observe any variation in SCC deviation for the Caki-1 and Hep3B cell lines (Supplementary 5b and c).

WC-Co particles are known to induce ROS and consequential cytotoxicity/genotoxicity in different cellular models (Fenoglio et al., 2008, Zhang et al., 2010, Zhao et al., 2013). To assay ROS in our present experiments, we used the CM-H₂DCFDA probe. We exposed cells for 15 min since this was previously described as the critical timepoint for observing the ROS burst induced by WC-Co particles (Lombaert et al., 2013). We failed to detect ROS using the conventional protocol, suggesting a 1 hour manipulation delay, or when using a modified protocol in which we pre-loaded the cells

with the CM-H₂DCFDA probe which has been shown to work in one report (Chen et al., 2010) but not in another study (Kuhnel et al., 2012) (Figure 3a and 3b).

Suspecting that the test did not work due to a delay between exposure with the probe and ROS measurement, we performed a 15 min co-exposure of the cells to WC-Co NPs and the CM-H₂DCFDA probe (Figure 3c) which enabled the detection of ROS within 15 minutes of treatment. As seen in Figures 3c, 4b and 4c, we observed a clear and strong dose-dependent early ROS signal after WC-Co NP treatment of Caki-1 and Hep3B cells, which was in agreement with our xCELLigence[®] profiles and cell mortality (flow cytometry) data. In contrast, and as expected due to the absence of cytotoxicity, we observed only slight ROS induction in A549 cells after exposure to WC-Co NPs (Figure 4a). Taken together, these results clearly confirm that WC-Co NPs induce ROS within minutes of exposure and that analyzing ROS production at a longer time after exposure may not yield a signal and therefore give false negative results. The absence of detectable ROS in A549 cells correlated with the lack of toxicity by WC-Co NPs and the small amount of these particles detected in the cells at 15 min after exposure indicate that the threshold for oxidative stress induction was possibly not reached in A549 cells.

Since it has now been established that nanomaterials can cause DNA damage through ROS induction (Singh et al., 2009), we analyzed the cell cycle (Figure 5) and the formation of DNA double strand breaks (Figure 6) in our WC-Co NP exposed cell lines. For measuring DNA double strand breaks, we assayed H2Ax phosphorylation as it is considered to be a sensitive method for this purpose (Redon et al., 2011) and a powerful approach to predicting *in vivo* genotoxicity (Smart et al., 2011). A significant blockage at both G₁ and G₂ and a dose-dependent increase in DNA double strand breaks were observed in Caki-1 cells exposed to WC-Co NPs, these cell cycle perturbation and DNA double strand breaks being even more pronounced in Hep3B cells (Figures 5c and 6b).

Our current data collectively show that WC-Co NPs are cytotoxic and genotoxic in Caki-1 and Hep3B cells as they induce ROS generation, this toxicity being less pronounced for Caki-1 cells which are *TP53* wild-type, compared to Hep3B cells, that are *TP53* deficient (<http://p53.iarc.fr/CellLines.aspx>). With regard to the cell cycle, no significant differences were observed in A549 cells exposed to WC-Co NPs compared to unexposed cells (Figure 5a). The slight variation of G₁/S/G₂ percentages noted in A549 control cells indicated that these cells reached confluence.

CONCLUSIONS

From a technical point of view, our current data indicate that flow cytometry is a very sensitive and useful method for detecting WC-Co NPs in cells. We have also demonstrated and validated the use of confocal microscopy as a method for visualizing the internalization of such unlabeled NPs within cells. Moreover, combined with existing data (Aranda et al., 2013), our results show that the CM-H₂DCFDA probe must be cautiously used in nanotoxicology studies and that conventional protocol(s) must be adapted to avoid false negative results.

From a general point of view, our results shed light on the ability of WC-Co NPs to directly and quickly generate ROS in human renal and liver cells as they enter the cells. This ROS generation leads to DNA double strand breaks, cell cycle arrest and/or mitotic catastrophe, and ultimate cell death. On the other hand, neither ROS production nor cytotoxic effects were observed in A549 cells exposed to WC-Co NPs, which were poorly internalized in these cells during the first minutes of exposure. Moreover, A549 cells were eventually able to expel NPs that had gained entry to these cells. The cellular uptake and toxicity/genotoxicity of WC-Co NPs differ according to cell type and this seems to be mainly related to immediate WC-Co NP uptake and thus to immediate ROS induction.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing financial interests. This work was funded by the French national research program NANOTRANS, the NanoSciences CEA-Transverse program, Dim C'Nano IdF, the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Nanoreg, the French National Association for Research and Technology (ANRT) and the Servier Group.

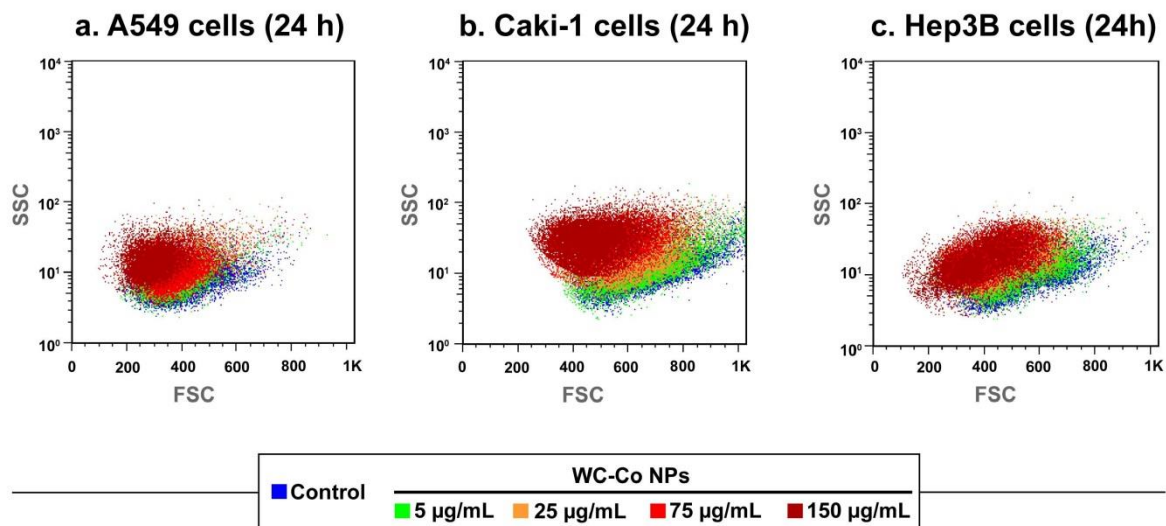
REFERENCES

- Aranda, A, Sequedo, L, Tolosa, L, Quintas, G, Burello, E, Castell, JV & Gombau, L 2013. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27, 954-963.
- Bastian, S, Busch, W, Kuhnel, D, Springer, A, Meissner, T, Holke, R, Scholz, S, Iwe, M, Pompe, W, Gelinsky, M, Potthoff, A, Richter, V, Ikonomidou, C & Schirmer, K 2009. Toxicity of tungsten carbide and cobalt-doped tungsten carbide nanoparticles in mammalian cells in vitro. *Environmental health perspectives*, 117, 530-536.
- Bhabra, G, Sood, A, Fisher, B, Cartwright, L, Saunders, M, Evans, WH, Surprenant, A, Lopez-Castejon, G, Mann, S, Davis, SA, Hails, LA, Ingham, E, Verkade, P, Lane, J, Heesom, K, Newson, R & Case, CP 2009. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nature nanotechnology*, 4, 876-883.
- Chen, X, Zhong, Z, Xu, Z, Chen, L & Wang, Y 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free radical research*, 44, 587-604.
- Ding, M, Kisin, ER, Zhao, J, Bowman, L, Lu, Y, Jiang, B, Leonard, S, Vallyathan, V, Castranova, V, Murray, AR, Fadeel, B & Shvedova, AA 2009. Size-dependent effects of tungsten carbide-cobalt particles on oxygen radical production and activation of cell signaling pathways in murine epidermal cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 241, 260-268.
- Fenoglio, I, Corazzari, I, Francia, C, Bodoardo, S & Fubini, B 2008. The oxidation of glutathione by cobalt/tungsten carbide contributes to hard metal-induced oxidative stress. *Free radical research*, 42, 437-745.
- Glube, N, Giessler, A, Wolfrum, U & Langguth, P 2007. Caki-1 cells represent an in vitro model system for studying the human proximal tubule epithelium. *Nephron. Experimental nephrology*, 107, e47-56.
- Gonzalez, L, Lukamowicz-Rajska, M, Thomassen, LC, Kirschhock, CE, Leyns, L, Lison, D, Martens, JA, Elhajouji, A & Kirsch-Volders, M 2014. Co-assessment of cell cycle and micronucleus frequencies demonstrates the influence of serum on the in vitro genotoxic response to amorphous monodisperse silica nanoparticles of varying sizes. *Nanotoxicology*, 8, 876-884.
- Guo, L, Dial, S, Shi, L, Branham, W, Liu, J, Fang, JL, Green, B, Deng, H, Kaput, J & Ning, B 2011. Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 39, 528-538.
- IARC 2006. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 86, 1-294.
- Ke, N, Wang, X, Xu, X & Abassi, YA 2011. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol*, 740, 33-43.
- Kuhnel, D, Scheffler, K, Wellner, P, Meissner, T, Potthoff, A, Busch, W, Springer, A & Schirmer, K 2012. Comparative evaluation of particle properties, formation of reactive oxygen

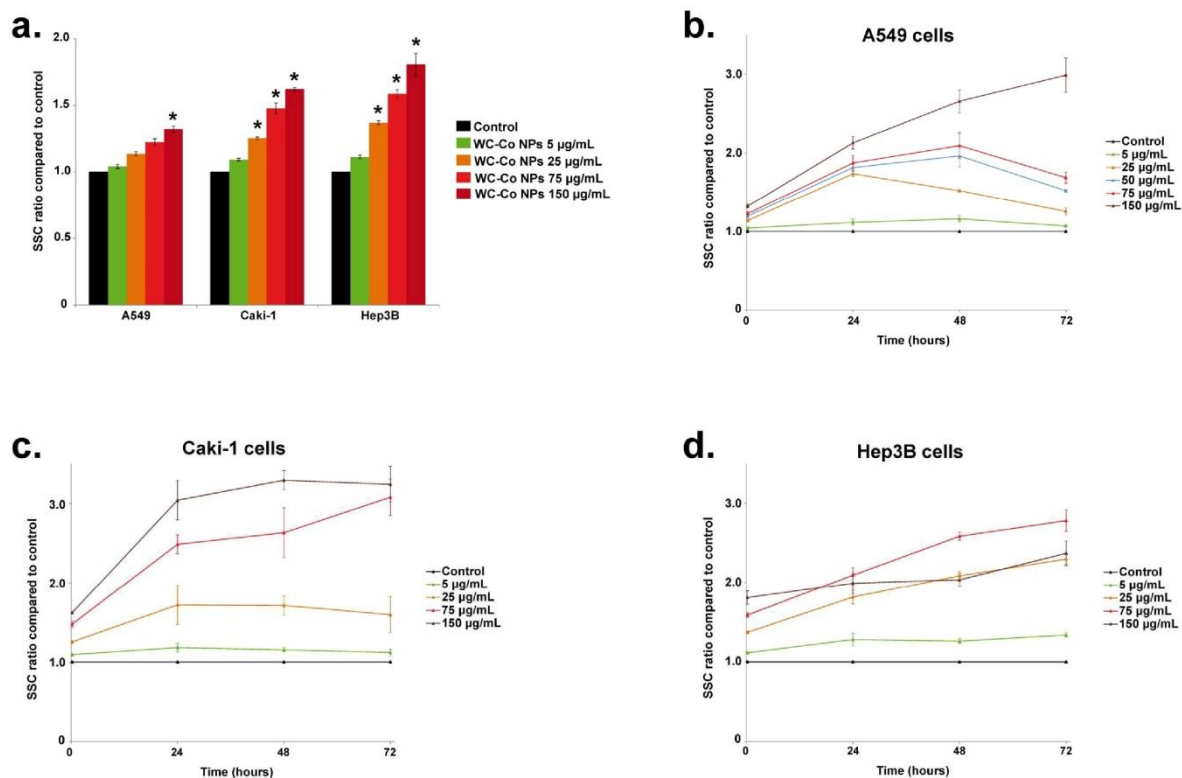
- species and genotoxic potential of tungsten carbide based nanoparticles in vitro. *Journal of hazardous materials*, 227-228, 418-426.
- Lehmann, T, Kohler, C, Weidauer, E, Taege, C & Foth, H 2001. Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology*, 167, 59-72.
- Lison, D, Carbonnelle, P, Mollo, L, Lauwerys, R & Fubini, B 1995. Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem Res Toxicol*, 8, 600-606.
- Lombaert, N, Castrucci, E, Decordier, I, Van Hummelen, P, Kirsch-Volders, M, Cundari, E & Lison, D 2013. Hard-metal (WC-Co) particles trigger a signaling cascade involving p38 MAPK, HIF-1 α , HMOX1, and p53 activation in human PBMC. *Archives of toxicology*, 87, 259-268.
- Meschini, S, Marra, M, Calcabrini, A, Monti, E, Gariboldi, M, Dolfini, E & Arancia, G 2002. Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 16, 389-398.
- Moche, H, Chevalier, D, Barois, N, Lorge, E, Claude, N & Nessler, F 2014. Tungsten carbide-cobalt as a nanoparticulate reference positive control in in vitro genotoxicity assays. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 137, 125-134.
- Moulin, JJ, Wild, P, Romazini, S, Lasfargues, G, Peltier, A, Bozec, C, Deguerry, P, Pellet, F & Perdrix, A 1998. Lung cancer risk in hard-metal workers. *Am. J. Epidemiol.*, 148, 241-248.
- Nunez, R 2001. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 3, 67-70.
- Paget, V, Sergent, JA, Grall, R, Altmeyer, S, Girard, HA, Petit, T, Gesset, C, Mermoux, M, Bergonzo, P, Arnault, JC & Chevillard, S 2013. Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines. *Nanotoxicology*.
- Redon, CE, Nakamura, AJ, Martin, OA, Parekh, PR, Weyemi, US & Bonner, WM 2011. Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging (Albany NY)*, 3, 168-174.
- Richter, V & Ruthendorf, M 1999. On hardness and toughness of ultrafine and nanocrystalline hard materials. *Int. J. Refract. Met. Hard Mater*, 17, 141-152.
- Sergent, JA, Paget, V & Chevillard, S 2012. Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann. Occup. Hyg.*, 56, 622-630.
- Singh, N, Manshian, B, Jenkins, GJ, Griffiths, SM, Williams, PM, Maffei, TG, Wright, CJ & Doak, SH 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30, 3891-3914.
- Smart, DJ, Ahmedi, KP, Harvey, JS & Lynch, AM 2011. Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay. *Mutat. Res.*, 715, 25-31.
- Stayton, I, Winiarz, J, Shannon, K & Ma, Y 2009. Study of uptake and loss of silica nanoparticles in living human lung epithelial cells at single cell level. *Anal. Bioanal. Chem.*, 394, 1595-1608.

- Suzuki, S, Oguro, A, Osada-Oka, M, Funae, Y & Imaoka, S 2008. Epoxyeicosatrienoic acids and/or their metabolites promote hypoxic response of cells. *Journal of pharmacological sciences*, 108, 79-88.
- Van Hooijdonk, CA, Glade, CP & Van Erp, PE 1994. TO-PRO-3 iodide: a novel HeNe laser-excitabile DNA stain as an alternative for propidium iodide in multiparameter flow cytometry. *Cytometry*, 17, 185-189.
- Zhang, XD, Zhao, J, Bowman, L, Shi, X, Castranova, V & Ding, M 2010. Tungsten carbide-cobalt particles activate Nrf2 and its downstream target genes in JB6 cells possibly by ROS generation. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 29, 31-40.
- Zhao, J, Bowman, L, Magaye, R, Leonard, SS, Castranova, V & Ding, M 2013. Apoptosis induced by tungsten carbide-cobalt nanoparticles in JB6 cells involves ROS generation through both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Int. J. Oncol.*, 42, 1349-1359.
- Zucker, RM & Daniel, KM 2012. Microscopy imaging methods for the detection of silver and titanium nanoparticles within cells. *Methods Mol Biol*, 906, 483-496.
- Zucker, RM, Daniel, KM, Massaro, EJ, Karafas, SJ, Degn, LL & Boyes, WK 2013. Detection of silver nanoparticles in cells by flow cytometry using light scatter and far-red fluorescence. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*.
- Zucker, RM, Massaro, EJ, Sanders, KM, Degn, LL & Boyes, WK 2010. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77, 677-685.

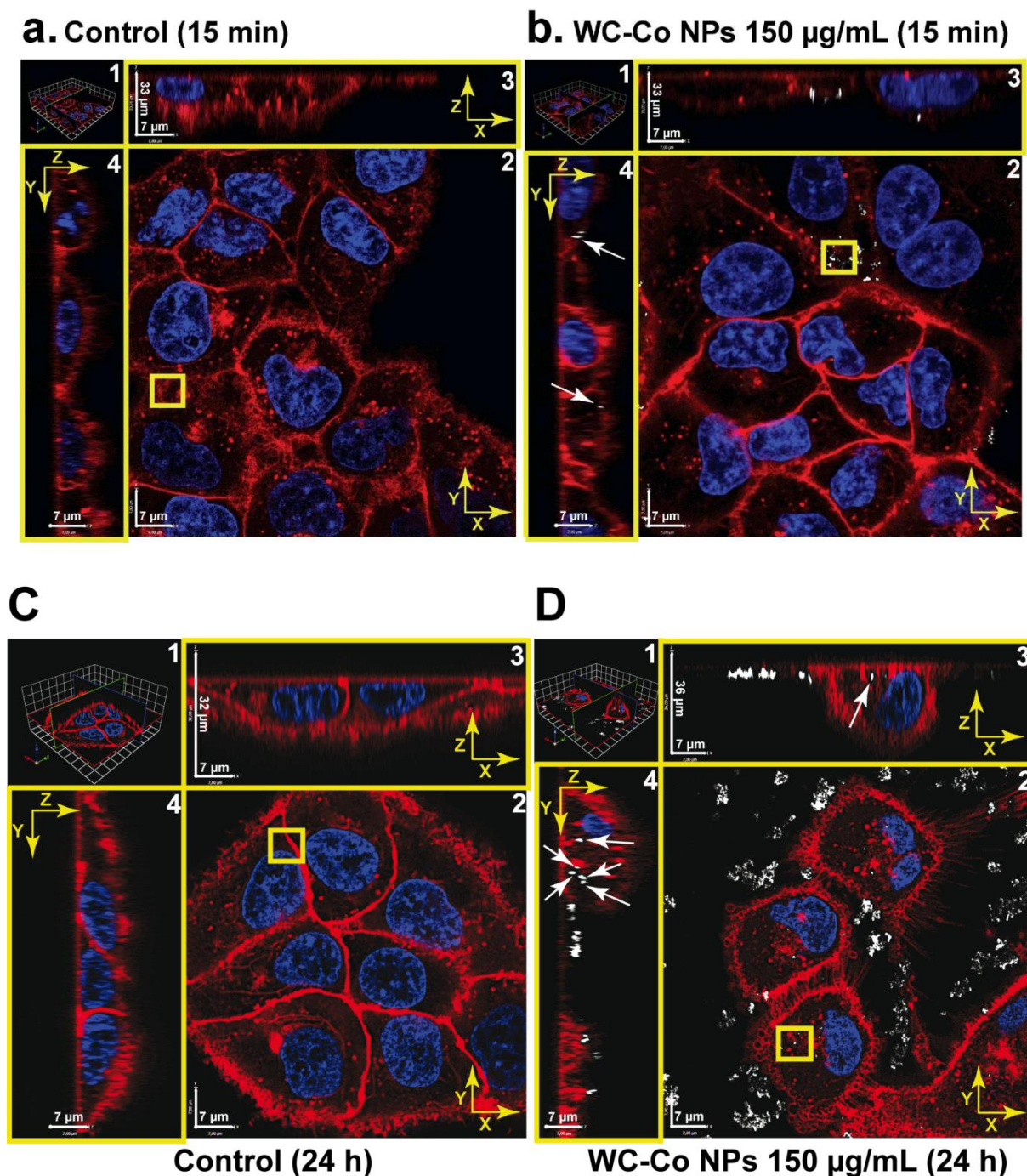
SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary 1. Validation of flow cytometry approach in WC-Co NPs/cells interactions. FSC versus SSC analysis (a) is presented for A549 (a), Caki-1 (b) and Hep3B (c) cells exposed to WC-Co NPs. Flow cytometry sensitivity allowed detection of WC-Co NPs/cells interactions from 5 µg/mL (green) compared with non-exposed cells (blue). The SSC signal increased with increasing concentration (25 µg/mL in orange, 75 µg/mL in red and 150 µg/mL in deep red).

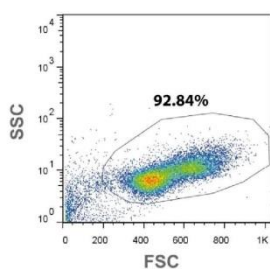


Supplementary 2. WC-Co NPs/cells interactions based on SSC variations. SSC ratios compared to non-exposed cells were assessed for A549, Caki-1 and Hep3B cell lines exposed up to 72 h with 5 to 150 µg/mL of WC-Co NPs. SSC ratios for the three cell lines after 15 min of exposure are represented on histogram form (a), and the whole kinetics (up to 72 h) represented on curves form for A549 (b), Caki-1 (c) and Hep3B (d) cell lines. Statistical analysis (a) was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student's t-test, * corresponding to $p < 0.01$).

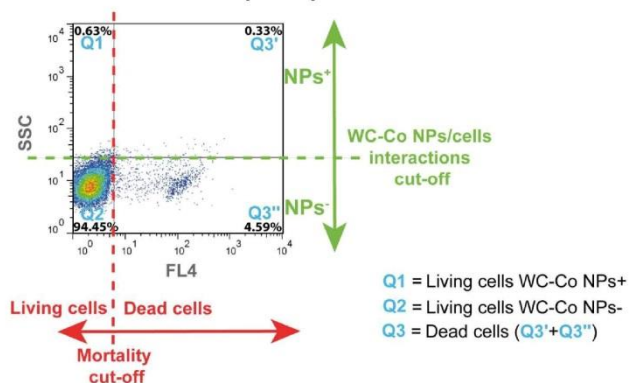


Supplementary 3. WC-Co NPs detection using confocal microscopy. A549 cells were exposed 15 min and 24 h (controls conditions in (a) and (c), respectively) to 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of WC-Co NPs (in (c) and (d), respectively). Nuclei were stained using Hoechst 33342 (blue), plasmic membranes were stained using Cell Mask Deep Red (red) while WC-Co NPs (white) were detected by using reflection. On each caption, panel (1) corresponds to 3D view of cells, panel (2) corresponds to a (X,Y) view on one Z, and panels (3) and (4) correspond to (X,Z) and (Y,Z) views, respectively. (X,Z) and (Y,Z) views (panels (3) and (4) respectively) were obtained from the intersection of (X) and (Y) axes within the yellow square on panel (2). White arrows indicate NPs within the cells on panels (3) and (4).

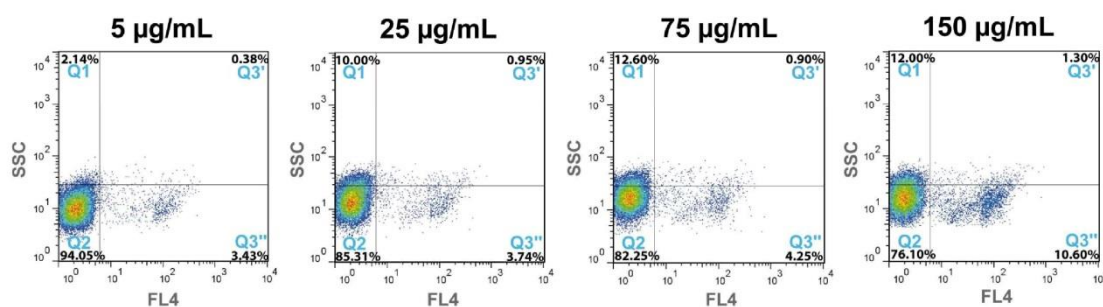
a. Control cells (24 h)



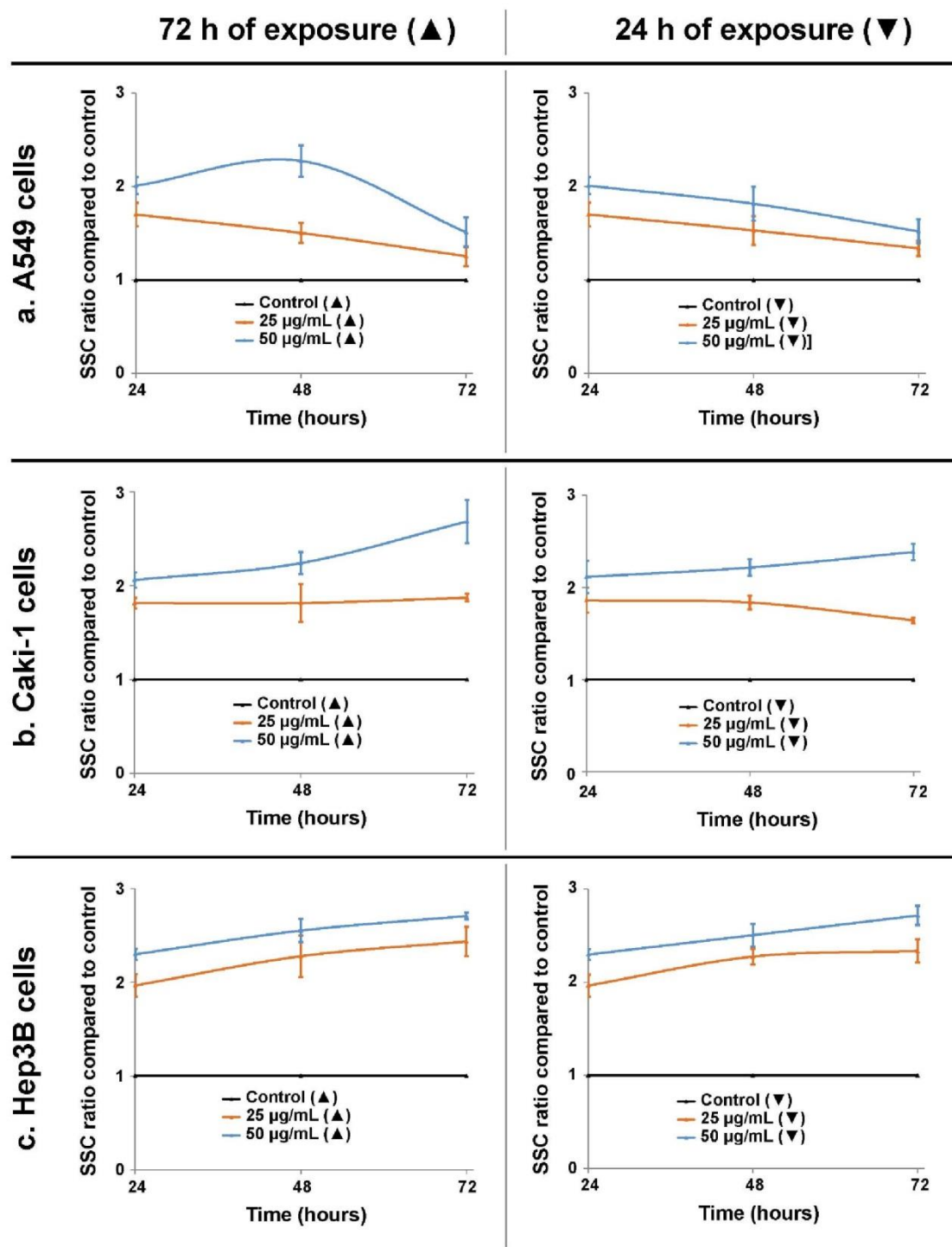
b. Control cells (24 h)



c. WC-Co NPs (24 h)

**Supplementary 4. Relationship between WC-Co NPs/Hep3B cells interactions and cell death.**

FSC versus SSC analysis is presented for non-exposed cells (a). Bi-parametric analysis of cell death detected by To-Pro-3 (FL4) versus increase of SCC signal for Hep3B control cells (b), Hep3B cells exposed for 24 h to WC-Co NPs at 5, 25, 75 and 150 µg/mL (c). Living cells NPs+, living cells NPs- and dead cells correspond to Q1, Q2 and Q3, respectively. The cut-offs (b) for NPs-positive cells (green line) and for dead cells (red line) were defined and set up as compared to control condition.



Supplementary 5. WC-Co NPs release study based on SSC variations. A549 (a), Caki-1 (b) and Hep3B (c) cells were: i) continuously exposed 72 h to 25 and 50 µg/mL of WC-Co NPs (column 1) ii) exposed 24 h to 25 and 50 µg/mL of WC-Co NPs, then replaced by fresh medium without NPs up to 72 h (column 2).

a. Characteristics of the dyes used in this study

Dye	Staining	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Hoechst 33342	Nucleus	350	461
WC-Co NPs	None (detected by reflection)	565	570
CellMask™ Deep Red	Plasma membrane	649	666

b. Ordering of sets and conditions used for confocal microscopy acquisitions

Set number	Dye	Staining	Laser used (nm)	Wavelengths gathering used (nm)	Laser power used (%) (upon the 1.5 W (theoretical max.) delivered by the system)
1	CellMask™ Deep Red	Plasma membrane	635	655-714	1
2	Nanoparticles	None (NPs reflection)	565	569-587	4
3	Hoechst 33342	Nucleus	405	420-470	3

Supplementary 6. Fluorophore characteristics and confocal microscopy settings. Dye characteristics (a) and settings used for confocal microscopy (b).

1.4. Etude préliminaire de la génotoxicité *in vivo* des WC-Co NP

Les résultats présentés ci-dessous ne font pas l'objet de publication, ils nécessiteront des analyses approfondies et des essais de confirmation. Cette étude ne permet donc pas de tirer de conclusions définitives, mais est présentée dans ce manuscrit car elle a été réalisée sur des systèmes *in vivo*, faisant suite aux résultats *in vitro* dans le cadre de l'utilisation du WC-Co comme nanoparticule de référence. Il s'agit d'une première approche permettant d'appréhender les problématiques du choix de la voie d'exposition, des niveaux de doses, des organes cibles à évaluer et des événements génétiques recherchés, à travers un test de mutation génique Pig-a et un test des comètes réalisés chez le rongeur.

1.4.1. Matériel et méthodes

1.4.1.1. Suspension des WC-Co NP

Les WC-Co NP sont mises en suspension selon le protocole décrit dans l'article 1. La seule modification consiste en l'utilisation de solution de sérum de rat ou de souris à 0,05% (selon l'espèce utilisée) dans l'eau ppi au lieu de la solution d'albumine sérique bovine (0,05%).

1.4.1.2. Animaux

Pour le test Pig-a, des rats Sprague-Dawley mâles (Charles River) ont été exposés par voie intraveineuse à différentes concentrations de WC-Co NP (12,5 et 25 mg/kg/j sous 10 mL/kg) ou au solvant (eau ppi + 0,05% de sérum de rat, 10 mL/kg), à raison de 3 administrations répétées à 24h d'intervalle. Chaque groupe est constitué de 5 animaux. Le groupe témoin positif est constitué de 4 animaux traités par gavage par du N-nitroso-N-éthylurée (ENU) à 40 mg/kg/j (3 administrations répétées).

Pour le test des comètes, des souris OF1 mâles (16 g) (Charles River) ont été exposées par instillation intranasale à différentes concentrations de WC-Co NP ou au solvant (eau ppi + 0,05% de sérum de souris), à raison de 3 administrations répétées à 24h d'intervalle. L'administration intranasale est réalisée par dépôt d'un volume de 15 µL chez des souris préalablement anesthésiées dans une chambre d'anesthésie avec de l'isoflurane à 2,5% et un débit d'air de 2,5 L/min. Chaque groupe est constitué de 4 souris. Les WC-Co NP sont administrées à des concentrations de 0,625 - 1,25 - 2,5 mg/mL sous

un volume de 15 µL, soit 9,375 - 18,75 - 37,5 µg/j correspondant environ à 0,47 - 0,94 - 1,875 mg/kg respectivement. Le groupe témoin positif est constitué de 3 animaux traités par une administration unique de méthylméthane-sulfonate (MMS) à 80 mg/kg par voie intra-péritonéale.

1.4.1.3. Test Pig-a

Le test Pig-a est réalisé selon les instructions du protocole du kit Rat Pig-a Mutation Assay (Litron Laboratories). Brièvement, des prélèvements sanguins sont réalisés chez les rats avant le premier traitement pour vérifier l'état basal en terme mutagenèse de chaque animal puis 30 et 45 jours après le premier traitement. Les plaquettes et les leucocytes sont éliminés par un gradient de densité (Lympholyte-Mammal, Cedarlane). Un marquage à l'aide d'un anti-corps anti-CD59 couplé à la phycoérythrine permet de différencier les cellules mutantes (CD59-) et non mutantes (CD59+), et un marquage des acides nucléiques (SYTO13) permet de différencier les leucocytes, les érythrocytes matures et les réticulocytes. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

1.4.1.4. Test des comètes *in vivo*

Environ 3h après la dernière administration, les animaux sont sacrifiés. Les poumons, le foie, la rate et les reins sont prélevés. Les cellules sont isolées par méthodes mécaniques : avec l'utilisation d'une Médimachine (BD Medimachine System, BD Biosciences) pour les cellules pulmonaires et rénales et par grattage à l'aide d'un écouvillon pour les cellules hépatiques et spléniques. Le test des comètes en conditions alcalines est ensuite réalisé selon le protocole décrit dans l'article 1. Pour chaque organe et chaque animal, 2 lames sont réalisées, à raison de 20000 cellules par lame. 100 cellules par lame sont analysées à l'aide du logiciel Comet Assay IV, et la médiane par animal du pourcentage d'ADN dans la queue des comètes (*Tail intensity*) est utilisée comme mesure de la fragmentation de l'ADN.

1.4.2. Résultats

1.4.2.1. Test de mutation génique *in vivo* Pig-a

Le test Pig-a nous a permis d'évaluer l'induction de mutations géniques au niveau des précurseurs hématopoïétiques chez des rats exposés aux WC-Co NP par voie intraveineuse (3 administrations répétées). La voie d'administration a été choisie afin d'assurer une exposition systémique. L'évaluation de la toxicité pour la moelle osseuse a été réalisée par l'évaluation de la fréquence de réticulocytes parmi les érythrocytes totaux. Aucune différence significative par rapport aux animaux témoins n'a été observée pour les animaux exposés aux WC-Co NP ni à l'ENU (résultats non présentés).

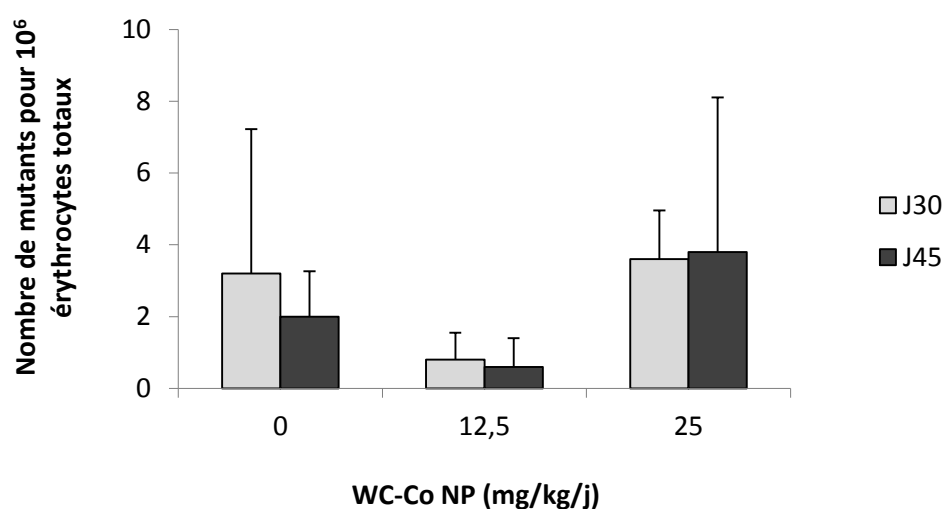


Figure 20 : Test Pig-a chez des rats exposés par voie intraveineuse aux WC-Co NP pendant 3 jours. Le nombre de mutants pour 10⁶ érythrocytes est évalué 30 et 45 jours après le traitement. L'ENU, utilisée comme témoin positif, a induit en moyenne 254 et 369 x 10⁻⁶ mutants à J30 et J45 respectivement.

L'évaluation des mutations géniques a été réalisée 30 puis 45 jours après la première administration par la détermination de la fréquence des érythrocytes totaux (réticulocytes et érythrocytes matures) mutants (CD59-). Alors qu'une augmentation de la fréquence d'érythrocytes mutants a été observée chez les animaux traités avec l'ENU (témoin positif), aucune induction de mutants n'a été mesurée chez les animaux exposés aux 2 doses de WC-Co NP étudiées (Figure 20).

1.4.2.2. Test des comètes *in vivo*

Le test des comètes nous a permis d'évaluer l'induction de lésions primaires de l'ADN sur des cellules pulmonaires, spléniques, hépatiques et rénales de souris exposées par voie intranasale aux WC-Co NP. L'instillation intranasale a été choisie comme voie d'administration, car il s'agit d'une voie non invasive, au contraire de l'instillation intratrachéale réalisée dans plusieurs études sur les microparticules de WC-Co (De Boeck et al., 2003b; Muller et al., 2008). Les différents organes étudiés correspondent à l'organe exposé (poumon), des organes du système réticulo-endothélial (rate, foie) et d'élimination (rein) (Figure 21).

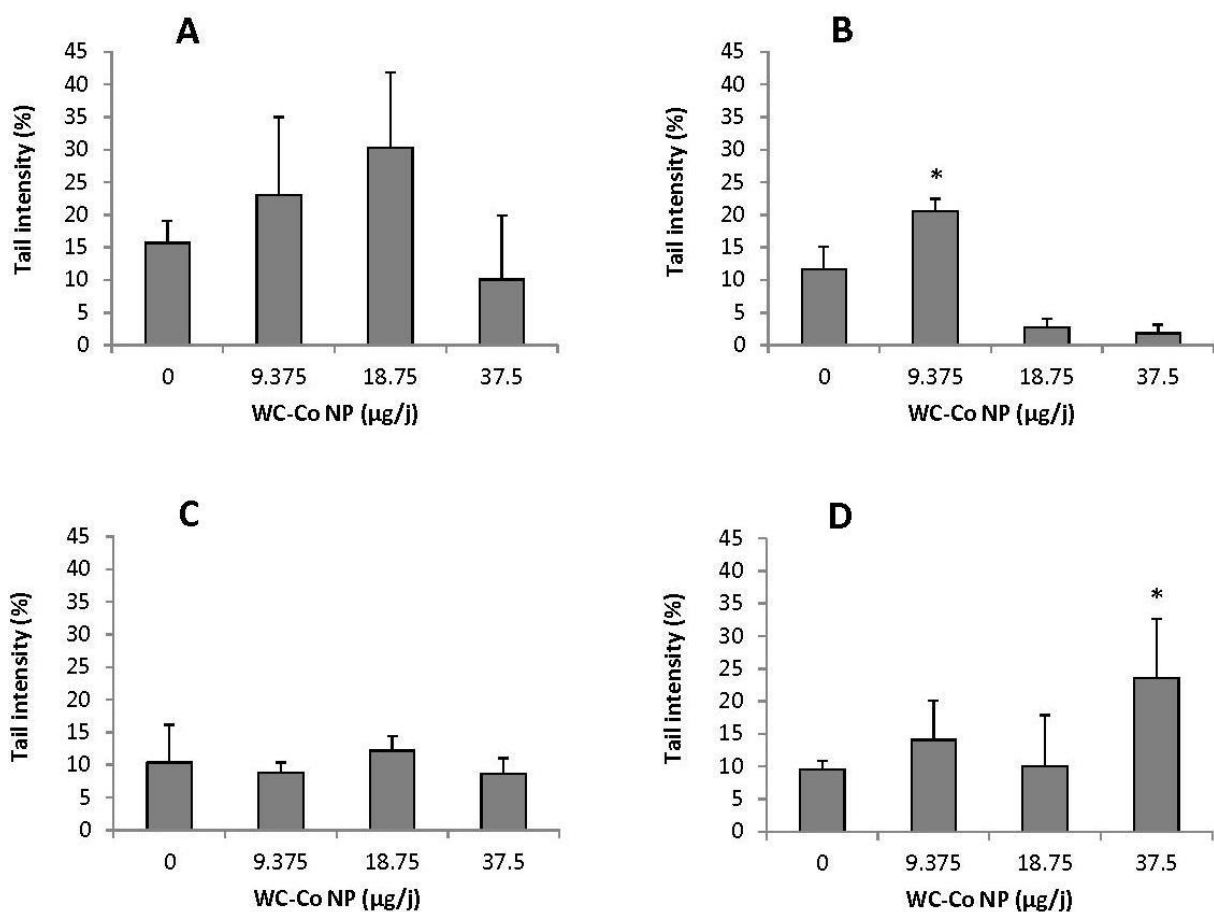


Figure 21 : Test des comètes *in vivo* chez des souris traitées par voie intranasale avec des WC-Co NP, à raison de 3 administrations répétées. A : poumon, B : rate, C : foie, D : rein. Les résultats représentent la moyenne +/- écart-type des médianes pour 4 animaux. Le MMS, utilisé comme témoin positif, a induit une migration d'ADN de 45,6% ($p < 0,05$) dans les cellules pulmonaires, 46,1% dans les cellules spléniques ($p < 0,05$), 57,1% dans les cellules hépatiques ($p < 0,05$) et 55,4% dans les cellules rénales ($p < 0,05$) (moyenne des médianes pour 3 animaux).

Au niveau du poumon (Figure 21 A), une augmentation de la fragmentation de l'ADN est observée aux doses faible et intermédiaire. Cet effet n'est pas statistiquement significatif probablement dû à une hétérogénéité inter-animale, et l'absence d'augmentation observée à la dose forte pourrait être liée à une cytotoxicité. En revanche, une augmentation statistiquement significative de lésions primaires de l'ADN est observée dans les cellules spléniques des animaux exposés à la concentration la plus faible de WC-Co NP, alors qu'aucune augmentation n'est observée aux doses supérieures, suggérant également une cytotoxicité (Figure 21 B). Aucune fragmentation de l'ADN n'est induite dans les cellules hépatiques quelle que soit la dose (Figure 21 C). Au niveau du rein, des lésions primaires de l'ADN ne sont détectées que chez les animaux traités avec la dose forte (Figure 21 D).

1.4.3. Discussion

Notre première approche de la génotoxicité *in vivo* des WC-Co NP permet de poser quelques hypothèses, qui devront toutefois être confirmées. Dans le test des comètes, les WC-Co NP ont induit des lésions primaires de l'ADN au niveau pulmonaire et extrapulmonaire, suggérant une translocation des nanoparticules, avec une accumulation probable au niveau de la rate (effets détectables à la dose faible uniquement) mais pas du foie (pas de lésions primaires de l'ADN quelle que soit la dose). Des lésions primaires de l'ADN ne sont détectées dans les reins que chez les animaux traités avec la dose forte. Une augmentation de la fragmentation de l'ADN est observée dans les poumons des animaux exposés aux doses faible et intermédiaire (avec une hétérogénéité inter-animaux), l'absence d'augmentation à la dose forte pouvant être liée à une cytotoxicité. L'induction de lésions primaires de l'ADN avait également été rapportée dans un test des comètes réalisé sur des pneumocytes de type 2 de rats exposés par instillation intratrachéale unique à 16,6 mg/kg de microparticules de WC-Co (De Boeck et al., 2003b).

Par ailleurs, le test de mutations géniques *in vivo* au locus Pig-a a été réalisé chez le rat après administration par voie intraveineuse des WC-Co NP. Le test Pig-a est un test relativement récent, et très peu d'études utilisant ce test sont publiées sur des nanomatériaux. Les WC-Co NP n'ont pas induit de mutations géniques dans le test Pig-a. L'exposition aux WC-Co NP de l'organe cible du test Pig-a, la moelle osseuse, devrait toutefois être confirmée pour valider nos résultats. En effet, l'évaluation de la fréquence de réticulocytes ne nous a pas permis de mettre évidence une toxicité vis-à-vis de la moelle osseuse, ni pour les animaux exposés aux WC-Co NP ni pour ceux traités avec l'ENU. Toutefois, dans la littérature, une diminution de la fréquence de réticulocytes

était observée dans les premiers jours suivant le traitement, en particulier avec l'ENU, suivie d'un effet rebond après deux semaines (Li et al., 2013; Sadiq et al., 2012). Il est donc probable que l'évaluation à 30 et 45 jours, comme effectué dans notre étude, ne permette pas de mettre en évidence une toxicité vis-à-vis de la moelle osseuse. Ces résultats pourraient être mis en parallèle avec ceux du test de mutations géniques *in vitro* sur cellules de lymphome de souris (MLA-TK), dans lequel seule une faible activité mutagène des WC-Co NP avait été observée, avec une significativité statistique uniquement à la concentration la plus forte (article 1).

Cette première approche de l'étude des WC-Co NP dans des tests de génotoxicité *in vivo* présente donc des limites et des incertitudes. En particulier, une hétérogénéité de réponse a été observée entre les différents animaux d'un même groupe, notamment dans le test des comètes sur cellules pulmonaires. Cela pourrait être lié à la voie d'administration, qui ne garantit pas que la totalité de la dose administrée parvienne dans les poumons (déglutition des animaux), ou à un problème d'interférence liée à la méthode mécanique d'isolement des cellules.

Des tests complémentaires pourront être envisagés afin de poursuivre ce travail préliminaire. Ainsi, des essais d'histopathologie permettraient de valider notre hypothèse de toxicité des WC-Co NP aux doses fortes vis-à-vis de la rate et du poumon. De même, des données d'exposition aux WC-Co NP des différents organes étudiés pourraient confirmer notre hypothèse d'accumulation des WC-Co NP dans certains organes. Par ailleurs, des tests sur animaux transgéniques seraient utiles pour l'évaluation des mutations géniques dans d'autres organes que la moelle osseuse étudiée par le test Pig-a. Ainsi, l'évaluation de la mutagénicité au niveau de la rate ou des poumons pourrait s'avérer plus intéressante en fonction de l'exposition de ces différents organes.

L'utilisation de tests évaluant d'autres évènements génétiques permettrait également de compléter ces premiers résultats. Ainsi, la réalisation d'un test des comètes modifié avec une enzyme permettant la détection des lésions oxydatives, de préférence hOGG1, plus spécifique, permettrait d'évaluer l'impact *in vivo* des mécanismes oxydants identifiés *in vitro*. D'autre part, le test des micronoyaux *in vivo*, en particulier sur la rate, le foie ou les poumons, pourrait apporter des informations sur les dommages chromosomiques induits au niveau de ces organes, qui seraient à comparer avec l'observation de lésions primaires de l'ADN. De Boeck et al. (2003b) ont d'ailleurs rapporté une induction de micronoyaux dans les pneumocytes de type 2 de rats 72h après une instillation intratrachéale unique de microparticules de WC-Co (16,6 mg/kg).

CHAPITRE 2. Etude de la génotoxicité in vitro de candidats nanovecteurs de médicaments

2.1. Etude de la génotoxicité de nanoparticules de diamant

Cette étude est réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (CEA Fontenay-aux-Roses, Dr Sylvie Chevillard et Dr Vincent Paget).

2.1.1. Matériel et méthodes

2.1.1.1. Nanoparticules de diamant

Les nanodiamants (NDs) de 20, 50 et 100 nm proviennent de chez Van Moppes. La caractérisation des ND-20nm et ND-100nm a été décrite précédemment, tout comme l'étape de préparation des suspensions mères à la concentration de 5 mg/mL dans l'eau ultrapure (Paget et al., 2013). La caractérisation des ND-50nm est en cours.

2.1.1.2. Culture cellulaire

Cellules 16-HBE. Les cellules épithéliales bronchiques 16-HBE proviennent du laboratoire du Dr D.C. Gruenert (Cochester, Vermont, USA). Après décongélation, les cellules sont incubées dans un milieu MEM (Minimum Essential Medium, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et un mélange pénicilline/streptomycine à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Ce milieu, désigné dans la suite du travail comme MEM complet, est renouvelé deux fois par semaine. A confluence, les cellules sont trypsinées, un passage à 500000 cellules par flasque 75 cm² est réalisé puis les cellules sont ré-incubées jusqu'à confluence. Les cellules sont finalement trypsinées et remises en culture en plaques 6 puits à 4x10⁵ cellules par puits pendant 24h avant le traitement.

Cellules T84. Les cellules intestinales T84 cells ont été généreusement fournies par le laboratoire du Dr Benoît Foligné (Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses,

Institut Pasteur de Lille). Après décongélation, les cellules sont incubées dans un milieu DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et un mélange pénicilline/streptomycine à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Ce milieu, désigné dans la suite du travail comme DMEM complet, est renouvelé deux fois par semaine. A confluence, les cellules sont trypsinées et remises en culture en plaques 6 puits à 2x10⁵ cellules par puits pendant une semaine avant le traitement.

2.1.1.3. Traitement des cellules

Les cellules sont incubées dans le milieu de culture approprié avec différentes concentrations de ND-20nm, ND-50nm et ND-100nm, le solvant ou les contrôles positifs. Les suspensions de NDs sont diluées au dixième dans le milieu de culture, sous un volume final de 5 mL par puits, avec des concentrations finales de 12,5 – 25 – 50 – 100 µg/mL, correspondant à 6,5 – 13 – 26 – 52 µg/cm² respectivement. Le MMS est utilisé comme témoin positif dans les tests des comètes standards à la concentration de 10 µg/mL pendant 4h. La glucose oxydase est utilisée comme témoin positif dans les tests des comètes modifiés avec hOGG1 aux concentrations de 0.0075 ou 0.01 U/mL dans les milieux de culture sans sérum pendant 30 min. La mitomycine C est utilisée comme témoin positif dans les tests des micronoyaux à la concentration de 0,5 µg/mL pendant 4h ou 0.075 µg/mL pendant 48h.

2.1.1.4. Test des comètes *in vitro* en conditions alcalines

Le test des comètes est réalisé selon le protocole décrit dans l'article 2, après 4h de traitement des cellules T84 et 16-HBE avec les NDs puis trypsinisation. La cytotoxicité est évaluée par la méthode d'exclusion du bleu Trypan. Afin de détecter d'éventuelles lésions oxydatives, le protocole modifié avec l'enzyme hOGG1 a été réalisé, selon un protocole similaire à celui décrit pour l'utilisation de la FPG (article 2). L'enzyme hOGG1 (New England Biolabs) a été utilisée à raison de 0,12 U/lame avec une incubation de 10 min à 37°C. 100 cellules ont été analysées par lame, correspondant à 200 cellules analysées par culture, avec 2 ou 3 cultures selon les concentrations de NDs. Le pourcentage de migration d'ADN, correspondant au pourcentage d'ADN ayant migré de la tête vers la queue de la comète est le paramètre utilisé pour l'analyse des lésions. Les sites hOGG1 spécifiques représentent la migration d'ADN supplémentaire induite par hOGG1, et sont calculés pour chaque culture par soustraction des médianes de migration d'ADN sans enzyme de celles avec hOGG1.

2.1.1.5. Test des micronoyaux *in vitro* sur cellules 16-HBE

Le test des micronoyaux a été réalisé sur des cellules 16-HBE traitées avec les NDs pendant 4h suivies d'une période de recouvrement de 44h ou traitées en continu pendant 48h (uniquement pour les NDs 20nm). Le protocole correspond à celui décrit dans l'article 1 pour les cellules L5178Y, avec quelques spécificités. Brièvement, après lavage des tapis cellulaires et trypsination, la cytotoxicité a été évaluée selon la méthode d'exclusion du bleu trypan. Après centrifugation et élimination du surnageant, les cellules ont été incubées pendant 10 min avec une solution hypotonique (MEM dilué au demi dans l'eau) puis pré-fixées par ajout de solution de Carnoy I (acide acétique glacial dilué au quart dans le méthanol). Après centrifugation et élimination du surnageant, les cellules sont suspendues dans une solution de Carnoy I pendant 10 min. La suspension cellulaire est ensuite étalée sur des lames de microscope (2 lames par culture), qui sont séchées puis colorées à l'aide de Giemsa à 4% dilué dans l'eau. Les lames sont ensuite codées et 1000 cellules sont analysées par lame, soit 2000 cellules par culture et par concentration.

2.1.1.6. Analyse statistique

Les méthodes statistiques décrites dans les articles 1 et 2 pour les tests des comètes et des micronoyaux ont été utilisées : le test non paramétrique de Mann-Whitney pour les tests des comètes et le test du Chi² pour les tests des micronoyaux.

2.1.2. Résultats

2.1.2.1. Etude des lésions primaires de l'ADN

Les lésions primaires l'ADN, oxydatives ou non, ont été étudiées à l'aide du test des comètes en conditions alcalines, grâce au protocole standard et au protocole modifié avec l'enzyme hOGG1. Après 4h de traitement des lignées cellulaires 16-HBE et T84 avec différentes concentrations des deux tailles de NDs, aucune diminution significative de la viabilité cellulaire n'a été mise en évidence par la méthode d'exclusion du bleu Trypan (résultats non présentés).

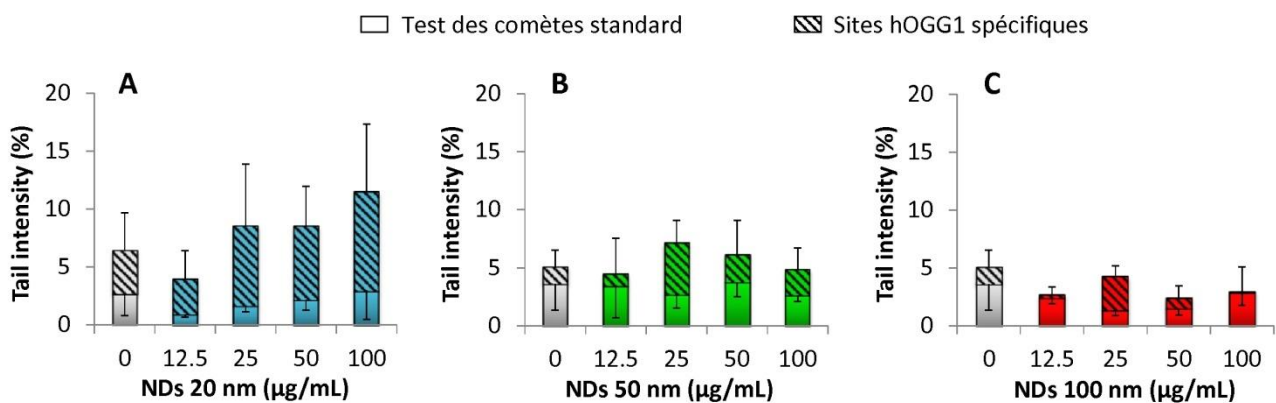


Figure 22 : Lésions primaires et lésions oxydatives de l'ADN dans des cellules 16-HBE exposées pendant 4h à différentes concentrations de NDs 20 nm (A), 50 nm (B) ou 100 nm (C).

Les résultats représentent les moyennes +/- écarts-types de 3 cultures. Dans les tests sur les NDs 20 nm (A), les résultats représentent les moyennes +/- écarts-types de 4 ou 6 cultures. Le MMS (10 µg/mL) a induit 41,6% de migration d'ADN dans le test standard et la glucose oxydase (0.0075 U/mL, 30 min) 11,9% de sites hOGG1 spécifiques. Dans les tests sur les NDs 50 et 100 nm, le MMS (10 µg/mL) a induit 56,1% de migration d'ADN dans le test standard et la glucose oxydase (0.01 U/mL, 30 min) 10,8% de sites hOGG1 spécifiques.

Globalement, les NDs n'ont pas induit d'augmentation statistiquement significative du pourcentage de migration d'ADN dans le test standard, ni de lésions hOGG1-spécifiques dans les cellules 16-HBE, quels que soient la taille des NDs (Figure 22). Toutefois, une légère augmentation des lésions détectées par hOGG1, non statistiquement significative, semble apparaître pour les plus fortes concentrations des ND-20nm dans les cellules 16-HBE.

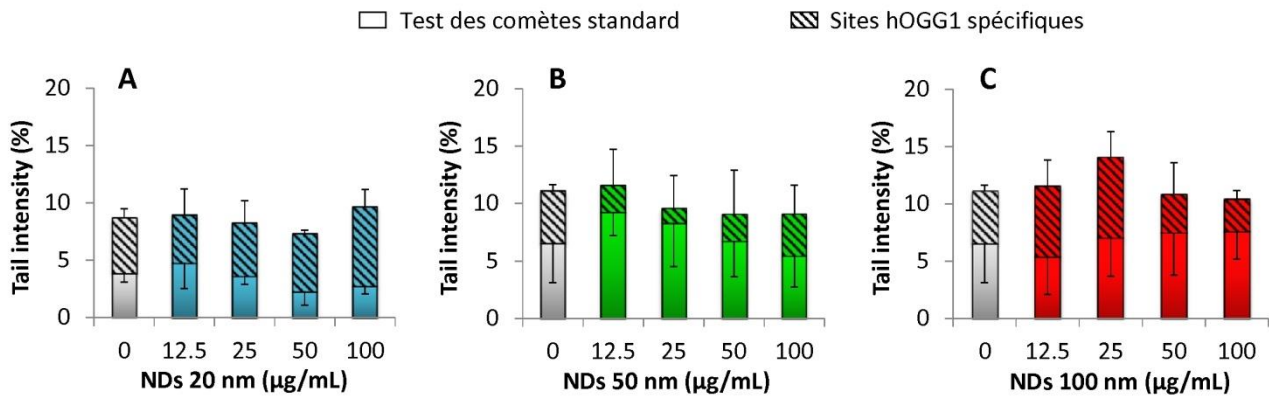


Figure 23 : Lésions primaires et lésions oxydatives de l'ADN dans des cellules T84 exposées pendant 4h à différentes concentrations de NDs 20 nm (A), 50 nm (B) ou 100 nm (C).

Les résultats représentent les moyennes +/- écarts-types de 3 cultures. Dans les tests sur les NDs 20 nm (A), le MMS (10 µg/mL) a induit 49,7% de migration d'ADN dans le test standard et la glucose oxydase (0.01 U/mL, 30 min) 9,7% de sites hOGG1 spécifiques en moyenne. Dans les tests sur les NDs 50 et 100 nm (B et C), le MMS (10 µg/mL) a induit 40,1% de migration d'ADN dans le test standard et la glucose oxydase (0.01 U/mL, 30 min) 7,6% de sites hOGG1 spécifiques.

Les NDs n'ont pas non plus induit d'augmentation statistiquement significative du pourcentage de migration d'ADN dans le test standard, ni de lésions hOGG1-spécifiques dans les cellules T84, quelle que soit la taille des NDs (Figure 23).

2.1.2.2. Etude des dommages chromosomiques

Le test des micronoyaux a dans un premier temps été réalisé après 4h de traitement suivi de 44h de recouvrement dans les cellules 16-HBE, pour les trois tailles de NDs. Aucune induction significative de micronoyaux n'a été observée, quelles que soient la taille des NDs ou la concentration analysée (Figure 24).

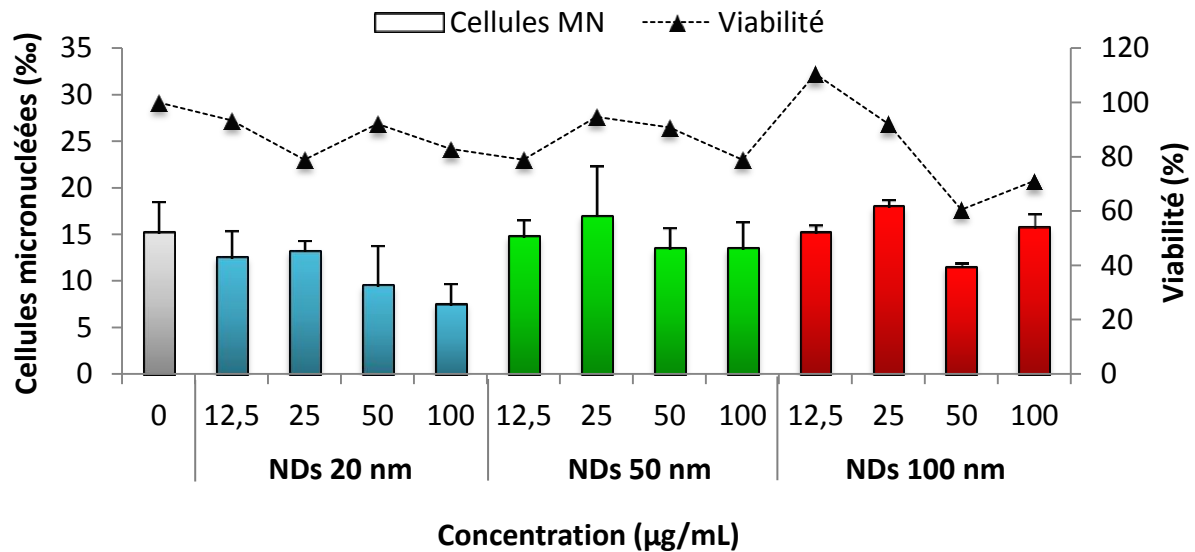


Figure 24 : Test des micronoyaux sur cellules 16-HBE exposées pendant 4h à différentes concentrations de NDs de trois tailles différentes (20nm, 50nm et 100nm), suivi d'une période de recouvrement de 44h. Moyenne +/- écart-type de 2 cultures. La mitomycine C (0,5 µg/mL), utilisée comme témoin positif, a induit 32% cellules micronucléées ($p < 0,001$).

Du fait de la légère augmentation des lésions hOGG1-spécifiques observée pour les plus fortes concentrations des ND-20nm dans le test des comètes sur cellules 16-HBE, cette taille de NDs a été plus particulièrement étudiée dans un test des micronoyaux sur cellules 16-HBE après un traitement continu de 48h (Figure 25). Les NDs n'ont pas non plus entraîné d'augmentation du nombre de micronoyaux dans ces conditions.

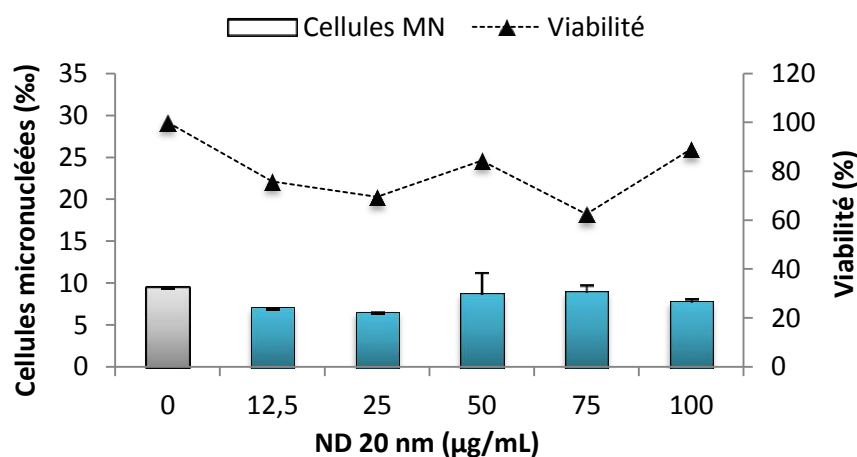


Figure 25 : Test des micronoyaux sur cellules 16-HBE exposées en continu pendant 48h à différentes concentrations de NDs 20nm. Moyenne +/- écart-type de 2 cultures. La mitomycine C (0,075 µg/mL), utilisée comme témoin positif, a induit 31,75% cellules micronucléées ($p < 0,001$).

2.1.3. Discussion

La génotoxicité de nanodiamants a été étudiée dans deux lignées cellulaires d'origine humaine, les cellules épithéliales bronchiques 16-HBE et les cellules intestinales (côlon) T84. Des tests des comètes, standard et modifié avec l'enzyme hOGG1, et des tests des micronoyaux ont été réalisés afin de mettre en évidence d'éventuelles lésions primaires de l'ADN, des lésions oxydatives de l'ADN ou des dommages chromosomiques. Trois tailles de nanodiamants ont été utilisées : 20, 50 et 100 nm.

Globalement, aucune induction significative de lésions primaires de l'ADN, oxydatives ou non, n'a été observée dans les cellules 16-HBE ou T84, quelle que soit la taille de nanodiamants étudiée. De plus, les nanodiamants n'ont pas induit de dommages chromosomiques dans le test des micronoyaux sur cellules 16-HBE. Nos résultats concordent donc avec ceux d'une étude sur les mêmes nanodiamants, dans laquelle aucune induction de cassures double-brin de l'ADN n'a été observée dans le test de détection des loci γ -H2AX dans plusieurs lignées cellulaires humaines hépatiques (Hep3B et HepG2), rénales (Caki-1 et Hek-293), intestinale (HT29) et pulmonaire (A549) (Paget et al., 2013).

2.2. Etude de la génotoxicité de nanocapsules lipidiques

Cette étude a été réalisée en collaboration avec M. Gaël Le Roux du Laboratoire Micro et Nanomédecines Biomimétiques (MINT, UMR INSERM 1066, Angers) du Pr Jean-Pierre Benoît.

2.2.1. Matériel et méthodes

2.2.1.1. Nanocapsules lipidiques

Les nanocapsules lipidiques (NCLs) ont été préparées au sein du laboratoire du Pr Jean-Pierre Benoît, selon le protocole décrit par (Groo et al., 2013), présentant quelques modifications par rapport au protocole original (Heurtault et al., 2002). Le cœur lipidique est constitué de Captex® 8000 (triglycéride d'acide caprylique, Abitec), la coque de Lipoid® 75-3 (lécithine de soja contenant en moyenne 69% de phosphatidylcholine, Lipoid GmbH) et de Solutol® HS15 (hydroxystéarate de polyéthylène glycol, BASF). Le mélange des trois constituants est chauffé à 90°C puis refroidi jusqu'à 70°C sous agitation magnétique. Trois cycles chauffage-refroidissement sont effectués. Après le dernier chauffage, le mélange est refroidi jusqu'à 78°C et de l'eau distillée à 4°C est ajoutée. La suspension est finalement filtrée sur filtre 0,2 µm.

En fonction de la proportion de Captex® 8000 et des surfactants, trois tailles de NCLs sont obtenues : 25, 55 et 100 nm. De plus la charge des NCLs a été modifiée par post-insertion de PEG phospholipidiques (Avanti Polar Lipids) :

- 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[methoxy(Polyethylene-Glycol)] (DSPE-PEG-OCH₃) pour une charge neutre
- 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[amino(Polyethylene-Glycol)] (DSPE-PEG-NH₂) pour une charge positive
- 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[carboxy(Polyethylene-Glycol)] (DSPE-PEG-COOH) pour une charge négative

2.2.1.2. Caractérisation des nanocapsules lipidiques

A l'aide d'un Zetasizer Nano-ZS (Malvern), la taille moyenne des NCLs et leur distribution de taille ont été mesurées par DLS dans les suspensions initiales. Le potentiel zêta a également été étudié dans les mêmes conditions.

2.2.1.3. Culture cellulaire

Des cultures primaires de lymphocytes humains ont été réalisées selon le protocole décrit dans l'article 1, à partir de sang total obtenu par ponction veineuse chez des donneurs volontaires non-fumeurs et en bonne santé de moins de 45 ans, n'ayant pas récemment été exposés à des substances mutagènes connues. La division des lymphocytes a été stimulée par la phytohématagglutinine A présente dans le milieu de culture (RPMI complet).

Deux cultures de lymphocytes humains ont été exposées avec différentes concentrations de chaque NCL étudiée, le solvant et les témoins positifs. Les suspensions initiales de chaque NCL ont été diluées dans de l'eau stérile, puis une dilution au dixième a été effectuée dans le milieu de culture lors du traitement des cellules, afin d'obtenir des concentrations finales de 312,5 - 625 - 1250 µg/mL.

2.2.1.4. Test des micronoyaux

Le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse a été réalisé sur des lymphocytes humains exposés pendant 24h à différentes concentrations de chaque NCL étudiée, suivies d'une période de recouvrement de 20h. Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans l'article 1. La cytotoxicité a été évaluée grâce à l'index de réplication. Pour chaque concentration et chacune des deux cultures, les cellules micronucléées ont été dénombrées sur un total de 1000 cellules mononucléées et 1000 cellules binucléées.

2.2.1.5. Test des comètes

Le test des comètes a été réalisé sur des lymphocytes humains exposés pendant 4h ou 24h à différentes concentrations de chaque NCL étudiée. Le test des comètes standard et un protocole modifié avec l'enzyme hOGG1 permettant de détecter d'éventuelles lésions oxydatives ont été réalisés. Le protocole utilisé pour le test standard est décrit dans les articles 1 et 2, et le test avec l'utilisation de hOGG1 a été réalisé selon un protocole similaire à celui décrit pour l'utilisation de la FPG dans l'article 2. L'enzyme hOGG1 a été utilisée à raison de 0,12 U/lame avec une incubation de 10 min à 37°C. Pour chaque concentration, 100 cellules par lame ont été analysées, correspondant à 200 cellules analysées pour chacune des deux cultures. Le pourcentage de migration d'ADN, correspondant au pourcentage d'ADN ayant migré de la tête vers la queue de la comète est le paramètre utilisé pour l'analyse des lésions. Les sites hOGG1

spécifiques sont calculés par soustraction du pourcentage de migration d'ADN sans enzyme du pourcentage de migration d'ADN avec hOGG1.

2.2.1.6. Analyse statistique

Comme décrit dans l'article 1, le test du Chi² a été utilisé pour les tests des micronoyaux. Concernant les tests des comètes, l'analyse statistique n'a pu être effectuée à cause d'un nombre de cultures trop faible (deux cultures).

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. Caractéristiques des nanocapsules lipidiques

Les caractéristiques en termes de distribution de taille et de potentiel zêta ont été mesurées pour chaque NCL. En fonction du type de DSPE-PEG post-inséré, la taille moyenne des NCLs varie de quelques nm, la taille minimale étant observées avec le DSPE-PEG-OCH₃. Les indices de polydispersité, inférieurs ou proches de 0.1 pour chaque NCL indiquent des distributions de taille plutôt étroites. Les trois tailles de NCLs sont bien différenciées.

Concernant les mesures de potentiel zêta, les NCLs post-insérées avec le DSPE-PEG-OCH₃, censées être de charge neutre, ont en fait un potentiel zêta légèrement négatif (entre -3,2 et -7,1 mV en moyenne). La post-insertion avec le DSPE-PEG-NH₂ confère bien un potentiel zêta positif aux NCLs, toutefois les valeurs absolues sont relativement faibles (entre +2,6 et +9,2 mV). Une faible différence de potentiel zêta est observée entre les NCLs « neutres » et « positives » pour la taille 25 nm. En revanche, des résultats plus satisfaisants sont obtenus pour les NCLs post-insérées avec le DSPE-PEG-COOH, qui leur confère un potentiel zêta négatif entre -24,8 et -34,7 mV.

Tableau 4 : Caractéristiques des nanocapsules lipidiques.

	Taille moyenne (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)
25 nm -OCH₃	27.0 ± 0.03	0.063 ± 0.012	- 3.2 ± 0.46
25 nm -NH₂	31.4 ± 0.28	0.100 ± 0.028	+ 2.6 ± 0.29
25 nm -COOH	28.7 ± 0.28	0.154 ± 0.028	- 24.8 ± 0.76
55 nm -OCH₃	56.6 ± 0.78	0.040 ± 0.012	- 5.6 ± 0.16
55 nm -NH₂	61.1 ± 0.59	0.035 ± 0.013	+ 7.4 ± 0.14
55 nm -COOH	61.4 ± 0.15	0.077 ± 0.029	- 31.9 ± 6.65
100 nm -OCH₃	112.1 ± 1.83	0.094 ± 0.007	- 7.1 ± 0.20
100 nm -NH₂	120.8 ± 1.85	0.128 ± 0.009	+ 9.2 ± 0.42
100 nm -COOH	117.0 ± 1.55	0.097 ± 0.031	- 38.7 ± 1.22

Les résultats représentent les moyennes +/- écart-type de 3 mesures.

2.2.2.2. Test des micronoyaux

Le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse a été réalisé après 24h d'exposition des lymphocytes humains aux 9 types de NCLs suivies d'une période de recouvrement de 20h en présence de cytochalasine B. Les concentrations ont été choisies après un essai préalable évaluant la cytotoxicité (résultats non présentés). La cytotoxicité a été mesurée par calcul de l'index de réplication. Globalement, les NCLs de 25 nm, en particulier celles chargées négativement (index de réplication de 53,3% pour la concentration maximale de 1250 µg/mL) ont induit la diminution de viabilité la plus importante.

Aucune NCL, quelle que soit la taille, la charge ou la concentration, n'a induit d'augmentation statistiquement significative de la fréquence de cellules micronucléées dans les cellules binucléées ni mononucléées (Figure 26).

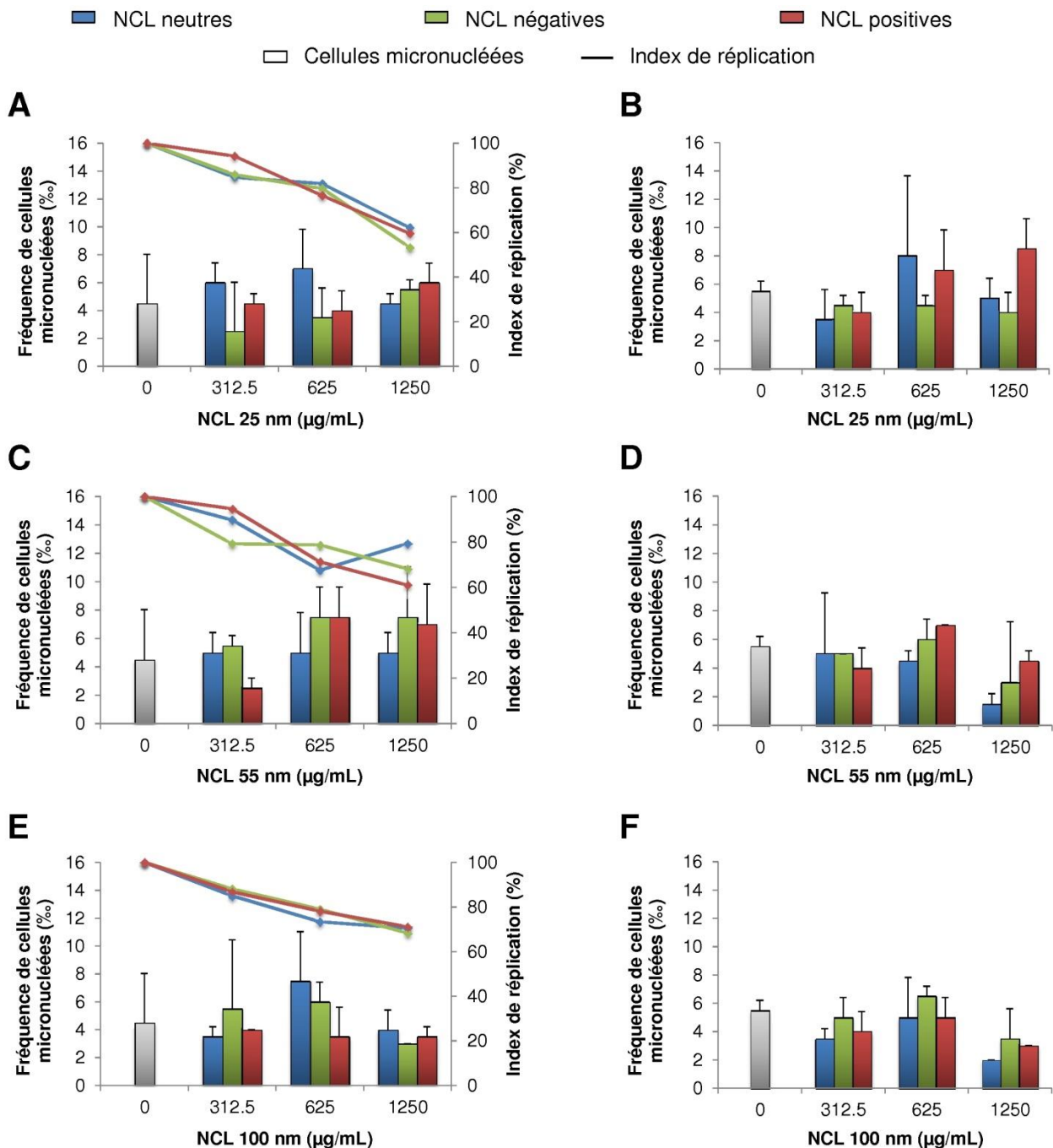


Figure 26 : Fréquence de cellules micronucléées (%) dans le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse sur lymphocytes humains exposés pendant 24h aux nanocapsules lipidiques (NCL) suivi d'une période de recouvrement de 20h. A,B : NCL de 25 nm ; C,D : NCL de 55 nm ; E,F : NCL de 100 nm, de charge neutre, négative ou positive. Les résultats (histogramme) représentent la moyenne +/- écart-type des fréquences de cellules micronucléées binucléées (A, C, E) et mononucléées (B, D, F) sur deux donneurs. La mitomycine C (0,075 $\mu\text{g/mL}$), utilisée comme témoin positif, induit une fréquence de cellules micronucléées de 61,5‰ dans les cellules binucléées et 16,5‰ dans les cellules mononucléées ($p < 0,001$). La cytotoxicité est évaluée par l'index de réplication (A, C, E, courbes).

2.2.2.3. Test des comètes

Le test des comètes a dans un premier temps été réalisé après 24h d'exposition des lymphocytes humains aux différentes NCLs, sur les cultures utilisées pour le test des micronoyaux. La cytotoxicité a donc été estimée avec les index de répliquations calculés pour le test des micronoyaux. Un test des comètes standard ainsi qu'un test des comètes modifié avec l'enzyme de réparation de l'ADN hOGG1 ont été effectués (Figure 27). Dans le test des comètes standard, un léger effet concentration-dépendant est globalement observé, avec une migration d'ADN plus importante pour les NCLs de 25 nm neutres et positives, de 55 nm neutres et négatives et de 100 nm négatives. Aucune induction concentration-dépendante des sites hOGG1 spécifiques n'est observée pour les différentes NCLs.

Comme dans les essais avec les nanoparticules de WC-Co nous avons observé une réponse plus importante dans le test des comètes après 4h d'exposition qu'après 24h (article 1), nous avons décidé de réaliser un deuxième essai après 4h de traitement avec les NCLs, en effectuant également un test des comètes standard et un test des comètes modifié avec l'enzyme de réparation de l'ADN hOGG1 (Figure 28). Toutefois, aucune induction dose-reliée de migration de l'ADN n'a été observée dans les lymphocytes humains exposés pendant 4h aux différentes NCLs, ni dans le test des comètes standard, ni dans le test modifié avec hOGG1.

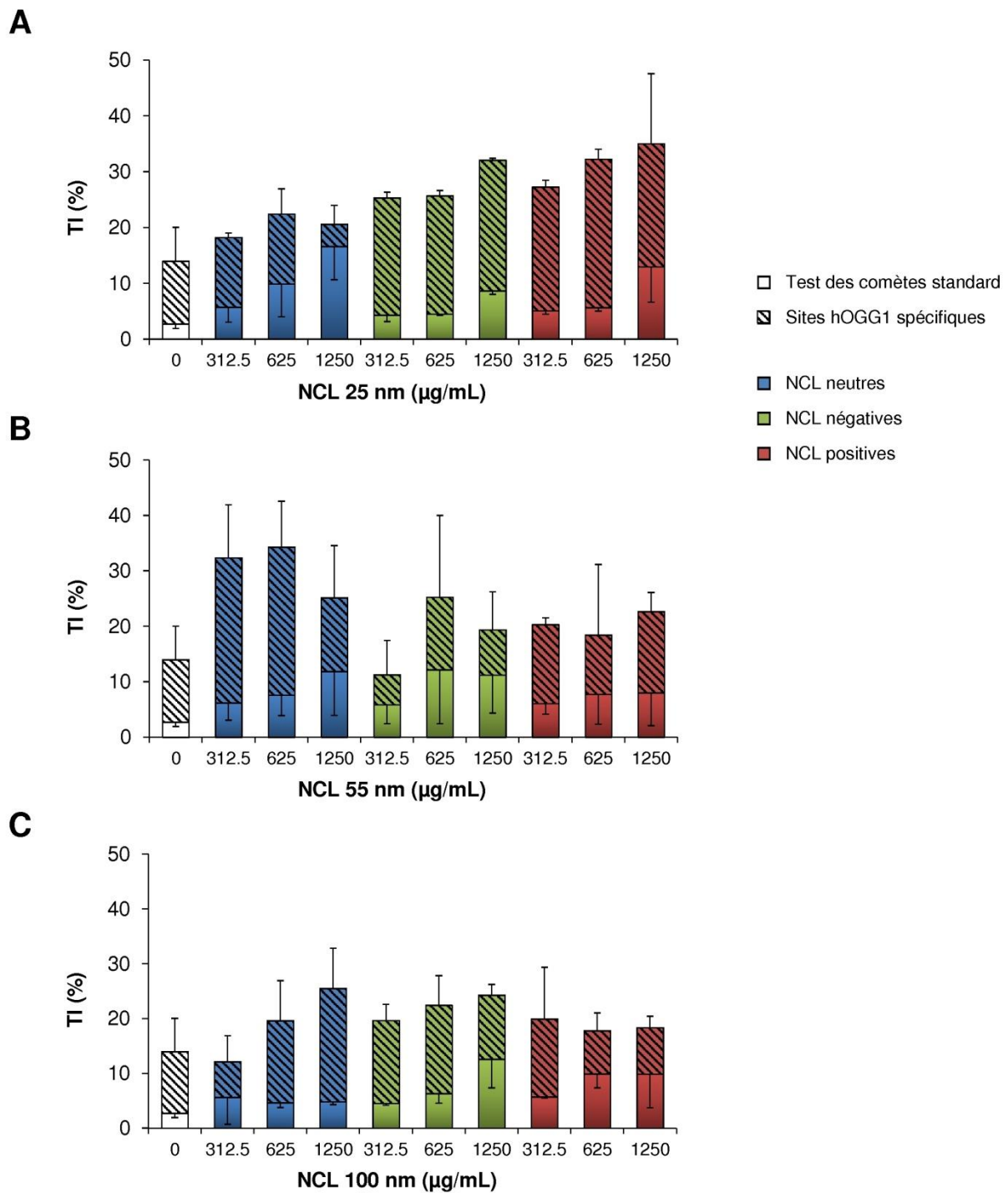


Figure 27 : Test des comètes sur lymphocytes humains après 24h d'exposition aux nanocapsules lipidiques (NCL) de 25 nm (A), 55 nm (B) ou 100 nm (C) de trois charges différentes. Le MMS (10 µg/mL), utilisé comme témoin positif, a induit une migration d'ADN de 8,9% dans le test des comètes standard.

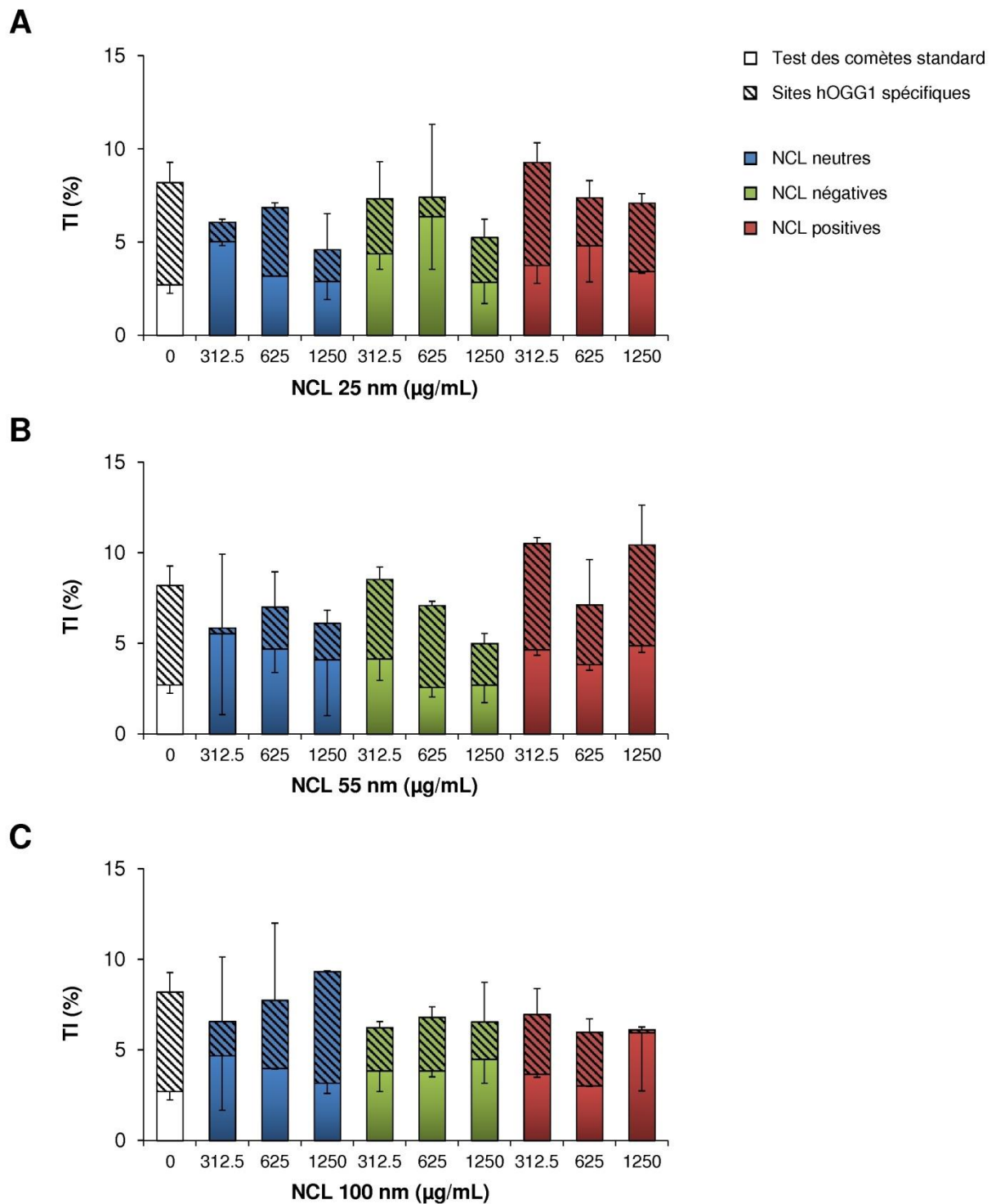


Figure 28 : Test des comètes sur lymphocytes humains après 4h d'exposition aux nanocapsules lipidiques (NCL) de 25 nm (A), 55 nm (B) ou 100 nm (C) de trois charges différentes. Le MMS (10 µg/mL), utilisé comme témoin positif, a induit une migration d'ADN de 22,4% dans le test des comètes standard.

2.2.3. Discussion

La caractérisation des NCLs nous a permis de séparer trois groupes de nanoparticules en fonction de leurs tailles bien distinctes. Toutefois, les valeurs de potentiel zêta entre les NCLs neutres et positives étaient très proches. Il faut également noter que les caractérisations ont été effectuées sur les suspensions initiales de NCLs, et la modification du pH des suspensions dans le milieu de culture tamponné pourrait entraîner des modifications de potentiel zêta.

Aucune des différentes NCLs n'a entraîné d'augmentation de la fréquence de cellules micronucléées dans les lymphocytes humains après une exposition de 24h suivie d'une période de recouvrement de 20h en présence de cytochalasine B. Les NCLs ne semblent donc pas induire de dommages chromosomiques. Quelques inductions de migration d'ADN ont été observées dans le test des comètes standard après 24h de traitement, toutefois ces résultats n'ont pas été reproduits après un traitement de 4h. L'induction de lésions primaires de l'ADN reste toutefois à confirmer, en effet le nombre de cultures utilisées dans nos essais ne nous a pas permis d'effectuer de tests statistiques. Dans les tests des comètes modifiés avec l'enzyme hOGG1, aucune lésion oxydative de l'ADN n'a été détectée dans des lymphocytes humains exposés pendant 24h ou 4h aux différentes NCLs. Toutefois ces résultats sont à confirmer par l'ajout d'un témoin positif oxydant, assurant que les conditions des tests permettent effectivement la détection des lésions oxydatives de l'ADN.

D'après ces résultats, les différentes NCLs étudiées, quelles que soient leur taille ou leur charge, ne semblent pas induire de génotoxicité *in vitro* dans des cultures de lymphocytes humains.

PARTIE 3. Discussion générale – Conclusions et perspectives

Discussion générale

L'exposition humaine aux nanomatériaux est en augmentation constante, et l'évaluation de leur potentiel génotoxique est donc d'une importance certaine. Cependant, la pertinence des tests standards de génotoxicité *in vitro* fréquemment utilisés pour les produits non-nanoparticulaire est souvent remise en cause. Un témoin positif de référence nanoparticulaire pour les essais de génotoxicité *in vitro* permettrait de vérifier la pertinence de ces tests, de les adapter ou d'en mettre au point de nouveaux, et constituerait donc une étape importante vers une meilleure évaluation des nanomatériaux. Toutefois, bien que plusieurs nanomatériaux aient été proposés comme témoin positif génotoxique (Di Bucchianico et al., 2013; Donaldson et al., 2010; Fubini et al., 2010), aucun d'entre eux n'est à ce jour validé par la communauté scientifique.

Dans ce travail, nous avons dans un premier temps étudié la possibilité d'utiliser des nanoparticules de WC-Co comme témoin positif dans plusieurs tests de génotoxicité *in vitro*. Puis nous avons étudié l'implication dans la génotoxicité des nanoparticules de WC-Co de mécanismes fréquemment décrits pour les nanomatériaux : phénomènes oxydatifs et aneuploïdie.

Par ailleurs, de nombreux nanomatériaux sont en développement dans le domaine médical, notamment pour la vectorisation de principes actifs. Une deuxième partie du travail a été consacrée à l'évaluation de la génotoxicité de candidats nanovecteurs de médicaments : des nanoparticules de diamants et des nanocapsules lipidiques.

Objectif 1 : Etude du WC-Co comme témoin positif sous forme nanoparticulaire pour les essais de génotoxicité *in vitro*

Dans la première partie de ce travail (article 1), nous avons étudié la possibilité d'utiliser des nanoparticules de WC-Co comme témoin positif de référence dans des essais de génotoxicité *in vitro*. Cet alliage avait déjà été utilisé sous forme microparticulaire comme témoin positif dans des essais de micronoyaux *in vitro* et *ex vivo* (Muller et al., 2008). Nous avons donc évalué le potentiel génotoxique des nanoparticules de WC-Co dans trois tests standards de génotoxicité, évaluant différents niveaux d'évènements génétiques : lésions primaires de l'ADN, mutations géniques et dommages chromosomiques. Le test de mutations géniques *in vitro* sur cellules de mammifères (MLA-TK) ainsi que le test des micronoyaux sont des tests utilisés dans les études réglementaires et possèdent des lignes directrices de l'OCDE : ligne directrice n°476 (OCDE, 1997b) pour le MLA-TK et ligne directrice n°487 (OCDE, 2010) pour le test des micronoyaux. Le test des comètes est quant à lui recommandé pour l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire (Afssaps, 2011).

Les résultats du MLA-TK indiquent que les nanoparticules de WC-Co ont un potentiel mutagène faible *in vitro*, et les augmentations significatives des fréquences de mutation ont été observées uniquement aux plus fortes concentrations analysées, associées à une cytotoxicité importante mais dans les limites acceptables recommandées par la ligne directrice de l'OCDE (valeurs de RTG entre 10 et 20%) (OCDE, 1997b). La faible amplitude d'augmentation des fréquences de mutation ainsi que la faible étendue de la gamme de concentrations induisant un effet biologiquement significatif rendent difficile l'utilisation des nanoparticules de WC-Co comme témoin positif de référence dans le test MLA-TK.

Le test des micronoyaux *in vitro* a été réalisé dans deux types cellulaires, dont l'utilisation pour les tests des micronoyaux a été validée dans des études internationales (Clare et al., 2006; Oliver et al., 2006), la lignée de lymphome de souris L5178Y et des lymphocytes humains en culture primaire. Pour les tests des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse dans les lymphocytes humains, la cytochalasine B a été ajoutée à la fin des périodes de traitement, afin d'éviter toute interférence avec l'internalisation cellulaire des nanoparticules de WC-Co. Les nanoparticules de WC-Co ont induit des résultats faiblement positifs dans cellules de lymphome de souris L5178Y. Pour les lymphocytes humains, l'amplitude de réponse était bien plus importante après un traitement de 24h suivi d'une période de recouvrement de 20h, qu'après un traitement de 4h suivi d'une période de recouvrement de 20h. Cette différence de réponse en fonction du schéma de traitement pourrait s'expliquer par le fait qu'un traitement plus long permet une exposition des cellules pendant la durée d'un cycle cellulaire complet,

et les nanoparticules pourraient ainsi accéder plus facilement à l'ADN pendant la mitose, lorsque la membrane nucléaire se désagrège (Doak et al., 2012). Une perturbation mécanique de la formation du fuseau mitotique pourrait également être provoquée par des nanoparticules présentes dans la cellule pendant la mitose (Gonzalez et al., 2008). Bastian et al. (2009) ont d'ailleurs mis en évidence la présence de nanoparticules de WC-Co similaires (10% Co, 50-300nm) dans le cytoplasme, mais pas dans le noyau, de cellules HaCaT, A549 et OLN-93. Les nanoparticules de WC-Co pourraient donc être utilisées comme témoin positif dans le test des micronoyaux *in vitro*, selon le type cellulaire et le schéma de traitement.

Des réponses différentes en fonction du type cellulaire et du schéma de traitement ont également été observées dans le test des comètes *in vitro*. En effet, aucune augmentation significative de la migration d'ADN n'a été observée pour les cellules de lymphome de souris L5178Y, aussi bien après 4h qu'après 24h de traitement. En revanche, pour les lymphocytes humains, une augmentation de la fragmentation de l'ADN a été observée, mais uniquement après 4h d'exposition. Toutefois, une hétérogénéité entre les réponses induites par les nanoparticules de WC-Co dans les lymphocytes humains provenant de donneurs différents a été mise en évidence. Cette hétérogénéité pourrait être liée à des variabilités interindividuelles en systèmes antioxydants, puisqu'un mécanisme oxydant a été décrit pour le WC-Co (Lison et al., 1995). Cette hypothèse a été émise par De Boeck et al. (1998) dans le cadre d'un test des comètes sur lymphocytes humains isolés exposés avec des microparticules de WC-Co, et cela pourrait particulièrement être le cas dans notre étude, puisque nous avons travaillé avec du sang total, en présence d'érythrocytes contenant des antioxydants. Les différences de réponses en fonction du type cellulaire seront discutées plus en détail dans les paragraphes suivants.

Finalement, nos résultats sont en faveur de l'utilisation des NP WC-Co comme témoin positif de référence dans certains tests de génotoxicité *in vitro*, notamment le test des micronoyaux, sous réserve de tenir compte de certains paramètres, tels que le type cellulaire et le schéma de traitement.

Objectif 2 : Mécanismes d'action des nanoparticules de WC-Co

Il est généralement admis que certains nanomatériaux sont capables d'interagir avec le fuseau mitotique ou ses constituants, tels que les centrosomes ou les microtubules, ou avec la ségrégation des chromosomes pendant la mitose, pouvant entraîner des évènements aneugènes (Donaldson et al., 2010; Gonzalez et al., 2008; Magdolenova et al., 2014).

Cependant, le mécanisme d'action génotoxique le plus fréquemment décrit pour les nanomatériaux implique des phénomènes oxydatifs, liés à des ERO générées à la surface des nanomatériaux ou produites par des constituants cellulaires, tels que les mitochondries, en réponse à l'interaction entre les nanomatériaux et les cellules. Un épuisement des antioxydants cellulaires peut également entraîner la formation de lésions oxydatives (Donaldson et al., 2010; Gonzalez et al., 2008; Magdolenova et al., 2014) : les ERO, notamment le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), très réactif, peuvent attaquer les protéines, les lipides et l'ADN. Dans ce dernier cas, les ERO peuvent induire des cassures de brin d'ADN, des sites abasiques ou des lésions des sucres ou des bases (Cooke et al., 2003; Evans et al., 2004).

1) Mécanismes aneugène / clastogène

Aucun des deux mécanismes aneugène ou clastogène n'est apparu comme prédominant dans nos résultats. En effet, certains suggèrent l'implication d'évènements clastogènes. Ainsi, l'induction de cassures de chromatides observée dans le test d'aberrations chromosomiques sur lymphocytes humains, ainsi que l'augmentation du nombre de micronoyaux ne présentant pas de marquage des centromères indiquent un potentiel clastogène (article 2). D'autre part, les fréquences de mutation des petites colonies étaient particulièrement augmentées par les nanoparticules de WC-Co dans le test MLA-TK (article 1), suggérant une activité clastogène.

Au contraire, l'induction de micronoyaux dans les cellules mononucléées dans le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse sur lymphocytes humains (article 1) suggérait plutôt un mécanisme aneugène, qui a été confirmé par l'augmentation du nombre de micronoyaux présentant un marquage des centromères et l'induction de cellules polyploïdes dans le test d'aberrations chromosomiques (article 2). En effet, une aneuploïdie peut provenir directement à partir de cellules diploïdes, mais également à partir de la division d'un intermédiaire tétraploïde dans le cas de la formation d'un fuseau multipolaire induisant une mauvaise ségrégation des chromosomes (King, 2008). Elhajouji et al. (1998) ont également montré que les composés aneugènes étaient

capables d'induire une polyploïdie par échappement mitotique. Les cellules tétraploïdes peuvent être formées à partir de plusieurs mécanismes, notamment l'échappement mitotique ou un blocage de la cytokinèse (Ganem et al., 2007). Des perturbations du fuseau mitotique peuvent être induites par des agents découpleurs de la phosphorylation oxydative pouvant interférer avec le fuseau mitotique par une inhibition de la production d'ATP mitochondriale et un efflux de Ca^{2+} de la mitochondrie (Önfelt, 1986). Un mécanisme aneugène a également été suspecté pour des microparticules de WC-Co, qui ont induit la formation de micronoyaux contenant des centromères dans des cellules MCF-7 (Muller et al., 2008).

2) Mécanismes oxydants

Un mécanisme oxydant a été proposé pour les microparticules de WC-Co : des électrons libérés par l'oxydation du cobalt pourraient être transférés à la surface du WC, où ils pourraient plus facilement réduire l'oxygène et générer des ERO (Lison et al., 1995). Cependant, De Boeck et al (1998) n'ont pas observé de lésions oxydatives de l'ADN dans des lymphocytes humains isolés exposés pendant 15 min à des microparticules de WC-Co dans le test des comètes modifié avec l'utilisation de l'enzyme FPG. Toutefois, il est probable que les nanoparticules puissent générer plus d'ERO que les microparticules, du fait de leur réactivité de surface plus importante (Gonzalez et al., 2008). Des études ont en effet montré que des nanoparticules de WC-Co induisaient une production plus importante de radicaux libres que les microparticules dans la lignée JB6 d'épiderme de souris (Ding et al., 2009; Zhao et al., 2013).

Le test des comètes modifié avec l'enzyme de réparation de l'ADN FPG a été réalisé afin d'étudier les dommages oxydatifs à l'ADN dans les cellules L5178Y et les lymphocytes humains (article 2). Nous avons observé une légère induction (non statistiquement significative) de sites sensibles à la FPG par les nanoparticules de WC-Co, mais uniquement dans les cellules de lymphome de souris L5178Y. Aucune lésion FPG-spécifique n'a en effet été observée dans les lymphocytes humains. Ces résultats pourraient donc indiquer la présence de dommages oxydatifs à l'ADN dans les cellules L5178Y, mais pas uniquement, la FPG détectant des bases oxydées telles que la 8-oxoGua, la FapyAde ou la FapyGua, mais également des lésions liées à l'alkylation de l'ADN (Collins, 2009; Speit et al., 2004).

Grâce à la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE), nous avons pu étudier la formation d'ERO dans des suspensions de nanoparticules de WC-Co en absence de cellules, et en présence de lymphocytes humains ou de cellules de lymphome de souris L5178Y (article 2). La production de radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) a été

observée dans toutes les suspensions de nanoparticules de WC-Co. En l'absence de cellules, la production de radicaux $\cdot\text{OH}$ a lieu dans les premières minutes suivant la mise en suspension des nanoparticules de WC-Co. En présence de cellules L5178Y, des radicaux $\cdot\text{OH}$ sont produits pendant la totalité de la période étudiée (45 min) et en quantité plus importante. En présence de lymphocytes humains, la production des radicaux $\cdot\text{OH}$ diffère en fonction du donneur. Pour l'un d'entre eux, la génération de radicaux $\cdot\text{OH}$ suit un profil semblable à celui des suspensions acellulaires, avec une production faible et limitée dans le temps, alors que la production de radicaux $\cdot\text{OH}$ en présence des lymphocytes provenant de l'autre donneur est plus importante et prolongée, similaire à celle observée en présence de cellules L5178Y.

Dans le mécanisme proposé par Lison et al. (1995), la production d'ERO par le WC-Co était associée à une dissolution du cobalt, qui, en tant que métal de transition, peut participer à des réactions de type Fenton (Leonard et al., 1998). Nous avons donc émis l'hypothèse que la production supplémentaire de radicaux $\cdot\text{OH}$ en présence de certaines cellules pourrait être induite par un mécanisme de type Fenton. Cette hypothèse a été confirmée par l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans une suspension acellulaire de nanoparticules de WC-Co, qui a entraîné une production plus importante et prolongée de radicaux $\cdot\text{OH}$. Nos résultats rejoignent ceux de Ding et al. (2009), qui ont montré une augmentation de la production de radicaux $\cdot\text{OH}$ dans des cellules JB6 exposées à des nanoparticules de WC-Co lors de l'ajout de H_2O_2 et une diminution en présence de catalase. Ces éléments suggèrent que les nanoparticules de WC-Co pourraient générer des radicaux $\cdot\text{OH}$ de manière intrinsèque lorsqu'elles sont mises en suspension dans un milieu aqueux, et également par l'intermédiaire d'une réaction de type Fenton lorsqu'elles sont en présence de H_2O_2 , notamment produit au niveau cellulaire.

La solubilisation d'ions cobalt à partir des nanoparticules de WC-Co pourrait également impliquer une inhibition de la réparation de l'ADN par le cobalt. En effet, les ions cobalt (II) sont capables de se substituer aux ions zinc (II) des protéines à doigt de zinc, dont font partie des protéines de réparation de l'ADN (Witkiewicz-Kucharczyk et Bal, 2006) et d'inhiber la réparation par excision de nucléotides (Hartwig et Schwerdtle, 2002; Kasten et al., 1997).

Du fait du mécanisme oxydant des nanoparticules de WC-Co, des différences de capacités anti-oxydantes cellulaires pourraient expliquer l'hétérogénéité des résultats entre les cellules de lymphome de souris L5178Y et les lymphocytes humains. Les lymphocytes humains pourraient également être protégés contre l'apparition de lésions oxydatives par la présence des érythrocytes (Porto et al., 2003), puisque toutes nos

études sur lymphocytes humains ont été réalisées sur sang total. Cette hypothèse est corroborée par la concentration de glucose oxydase nécessaire à l'induction de lésions oxydatives de l'ADN détectables dans le test des comètes avec FPG, beaucoup plus importante pour les cultures de lymphocytes humains (sang total) que pour les cellules de lymphome de souris L5178Y. De Boeck et al. (1998) n'ont cependant pas non plus observé d'induction significative de lésions FPG-spécifiques après une exposition de 15 min de cellules mononucléées humaines du sang périphérique isolées avec des microparticules de WC-Co. Toutefois, il est à noter que les microparticules de WC-Co induisent moins d'ERO que les nanoparticules (Ding et al., 2009; Zhao et al., 2013). Une autre hypothèse permettant d'expliquer les différences de réponse des deux types cellulaires est liée à leur statut p53. En effet, au contraire des lymphocytes humains en culture primaire, la lignée L5178Y est p53-déficiente (Storer et al., 1997), ce qui pourrait entraîner une accumulation de lésions du fait d'un déficit d'apoptose. Par ailleurs, l'origine humaine ou non peut également influencer sur la réponse cellulaire (Honma and Hayashi, 2011), et l'utilisation de cellules humaines p53-compétentes est recommandée pour les essais de génotoxicité (Fowler et al., 2012). Par ailleurs, des données non publiées ont montré que les cellules L5178Y étaient capables d'internaliser, mais pas d'externaliser, des nanoparticules polysaccharidiques cationiques. Des informations sur les capacités d'internalisation et d'externalisation des nanoparticules de WC-Co par les lymphocytes humains et les cellules L5178Y pourraient permettre une meilleure compréhension des différences observées.

Nous avons également mis en évidence des réponses hétérogènes entre différentes lignées cellulaires d'origine humaine, la lignée pulmonaire A549, la lignée hépatique Hep3B et la lignée rénale Caki-1 exposées aux nanoparticules de WC-Co dans le 3^{ème} article. Nous avons en effet observé des réponses différentes selon les lignées cellulaires dans les tests de cytotoxicité par mesure de l'impédance et par marquage avec du To-Pro3 détecté par cytométrie en flux. Ainsi, alors qu'une cytotoxicité a été observée pour les lignées Hep3B et Caki-1, aucune diminution significative de la viabilité cellulaire n'est apparue pour la lignée A549. Une telle absence de cytotoxicité de nanoparticules de WC-Co dans les cellules A549 a également été rapportée par Bastian et al. (2009) en comparaison avec des lignées intestinale (CaCo-2), oligodendrocytaire (OLN-93) et épithéliale (HaCaT). Par ailleurs, une étude du cycle cellulaire nous a permis de mettre en évidence un blocage en G1 et en G2 dans les cellules Caki-1 et surtout Hep3B. Sans surprise, aucune perturbation du cycle cellulaire n'a été observée dans les cellules A549. Ces perturbations du cycle cellulaire dans les lignées Caki-1 et Hep3B ont été corrélées avec une génotoxicité induite par les nanoparticules de WC-Co dans ces types cellulaires. En effet, une induction de cassures double-brin de l'ADN a été mise en évidence par la détection des foyers γ -H2AX dans les cellules Caki-1 et Hep3B exposées aux nanoparticules de WC-Co.

Un essai basé sur la détection d'une déviation du SSC en cytométrie en flux, d'après la méthode décrite par Zucker et al. (2010), et validé par microscopie confocale a pourtant confirmé que les nanoparticules étaient bien internalisées dans les trois lignées cellulaires. Toutefois, les nanoparticules de WC-Co n'étaient pas internalisées de la même manière dans les trois types cellulaires. En effet, l'internalisation était moins importante dans les cellules A549 que dans les autres types cellulaires, et nous avons de plus mis en évidence que les cellules A549, mais pas les cellules Hep3B et Caki-1, étaient capables d'expulser les nanoparticules de WC-Co. Une étude récente (Armstead et al., 2014) a également montré que l'internalisation cellulaire joue un rôle important dans la toxicité des nanoparticules de WC-Co. En effet, le WC-Co sous forme nanoparticulaire mais pas microparticulaire était internalisé dans des cellules d'épithélium pulmonaire BEAS-2B par un mécanisme principal dépendant de la polymérisation de l'actine. Toutefois, une diminution significative de la cytotoxicité a également été observée en présence de colchicine (inhibiteur de la polymérisation des microtubules) et de monodansylcadavérine (inhibiteur de l'endocytose clathrines-dépendante), suggérant l'implication de plusieurs mécanismes d'internalisation.

Nous avons déjà émis l'hypothèse dans les deux premiers articles que les différences de réponse cellulaires aux nanoparticules de WC-Co observées entre les cellules de lymphome de souris L5178Y et les lymphocytes humains, ainsi qu'entre des cultures de lymphocytes humains provenant de donneurs différents, pourraient être liées à leur mécanisme d'action d'oxydant. Dans le troisième article, la production d'ERO en réponse aux nanoparticules de WC-Co a été mesurée dans les lignées cellulaires Hep3B, Caki-1 et A549 par cytométrie en flux grâce à la sonde H₂DCFDA, avec un protocole spécifiquement adapté consistant en une co-exposition des cellules avec la sonde et les nanoparticules. En effet, les protocoles standards, incluant une durée non négligeable de manipulations entre le traitement des cellules et l'analyse au cytomètre, n'ont pas permis de mettre en évidence une production d'ERO dans les cellules incubées avec les nanoparticules de WC-Co. Une production importante d'ERO a été mesurée pour les lignées Hep3B et Caki-1 exposées aux nanoparticules de WC-Co. En revanche seule une très faible génération d'ERO a été observée pour la lignée A549, corrélée avec l'absence de cytotoxicité des nanoparticules de WC-Co et la faible quantité de nanoparticules de WC-Co détectées après 15 min d'exposition dans ce type cellulaire.

Ainsi, les réponses hétérogènes entre la lignée A549 et les deux autres types cellulaires semblent provenir de disparités dans les capacités d'internalisation et d'externalisation des nanoparticules de WC-Co, associées à une plus faible production d'ERO. Par ailleurs, les différences d'amplitude de réponse observées entre les cellules Hep3B et Caki-1 pourraient être liées à leur statut p53, la lignée Hep3B étant p53-déficiente et la lignée Caki-1 p53-compétente.

Pour conclure cette partie, nous pouvons retenir l'importance du choix du type cellulaire pour les essais de nano(géno)toxicité *in vitro*. Comme nous l'avons montré pour les nanoparticules de WC-Co, plusieurs paramètres pourraient influencer la réponse des cellules aux nanomatériaux, notamment leur origine humaine ou non, leurs capacités en systèmes anti-oxydants, leur statut p53 et leurs capacités d'internaliser et d'externaliser les nanomatériaux. Par ailleurs, d'autres critères peuvent s'appliquer pour le choix des types cellulaires, en particulier la représentativité des organes cibles potentiels des nanomatériaux.

Objectif 3 : Génotoxicité de candidats nanovecteurs de médicaments

De nombreux nanomatériaux sont en développement dans le domaine médical, pour des applications de vectorisation de principes actifs dans un but de ciblage thérapeutique ou d'amélioration de leur biodisponibilité, ou pour des applications diagnostiques telles que l'imagerie médicale. Si les études sur l'efficacité de ces candidats nanomédicaments sont très nombreuses dans la littérature, celles concernant leur potentielle toxicité sont plus rares. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la génotoxicité *in vitro* de deux types de candidats nanovecteurs de médicaments, des nanodiamants et des nanocapsules lipidiques (NCLs).

La génotoxicité de nanodiamants de 20, 50 et 100 nm a été étudiée dans deux lignées cellulaires d'origine humaine, les cellules épithéliales bronchiques 16-HBE et les cellules intestinales (côlon) T84. Globalement, aucune induction significative de lésions primaires ou oxydatives de l'ADN n'a été observée dans les tests des comètes sur cellules 16-HBE et T84, quelle que soit la taille de nanodiamants étudiée. De plus, les nanodiamants n'ont pas induit de dommages chromosomiques dans le test des micronoyaux sur cellules 16-HBE. Nos résultats concordent donc avec ceux d'une étude sur les mêmes nanodiamants, dans laquelle aucune induction de cassures double brin de l'ADN n'a été observée dans le test de détection des loci γ -H2AX dans plusieurs lignées cellulaires humaines pulmonaire (A549), intestinale (HT29), hépatiques (Hep3B et HepG2) et rénales (Caki-1 et Hek-293) (Paget et al., 2013).

La génotoxicité de NCLs de trois tailles (25, 55 et 100 nm) et trois charges (neutre, négative, positive) différentes a été étudiée *in vitro* dans des lymphocytes humains en culture primaire (sang total). L'induction de dommages chromosomiques a été étudiée par des tests des micronoyaux, et les lésions primaires de l'ADN, oxydatives ou non, par des tests des comètes standards ou modifiés avec l'enzyme hOGG1. Aucune des

différentes NCLs n'a entraîné d'augmentation de la fréquence de cellules micronucléées après une exposition de 24h suivie d'une période de recouvrement de 20h. Les NCLs n'induisent pas de dommages chromosomiques dans ce système d'essai. Quelques augmentations de la fragmentation de l'ADN ont été observées dans le test des comètes standard après 24h de traitement, toutefois ces résultats n'ont pas été reproduits après un traitement de 4h. Aucune lésion oxydative de l'ADN n'a été détectée dans les tests des comètes modifiés avec l'enzyme hOGG1, dans des lymphocytes humains exposés pendant 24h ou 4h aux différentes NCLs. L'induction de lésions primaires de l'ADN reste toutefois à confirmer, en effet le nombre de cultures utilisées dans nos essais ne nous a pas permis d'effectuer de tests statistiques. D'après nos résultats, les différentes NCLs étudiées, quelles que soient leur taille ou leur charge, ne semblent pas induire de génotoxicité *in vitro* dans des cultures de lymphocytes humains.

Conclusions et perspectives

Ce travail a été réalisé autour de deux axes principaux : l'étude d'un candidat témoin positif génotoxique sous forme nanoparticulaire, le WC-Co, et l'évaluation de la génotoxicité *in vitro* de deux candidats nanovecteurs de médicaments, des nanodiamants et des nanocapsules lipidiques.

L'évaluation des deux types de candidats nanovecteurs de médicaments n'a pas montré de génotoxicité significative dans les tests des comètes et des micronoyaux *in vitro* sur différents types cellulaires, sans influence particulière des paramètres étudiés, c'est-à-dire la taille pour les nanodiamants, et la taille et la charge pour les nanocapsules lipidiques. Des confirmations seront toutefois apportées par la réalisation du test des micronoyaux sur cellules intestinales T84 exposées aux nanodiamants, pour lesquelles seul le test des comètes a pour l'instant été réalisé. Concernant les nanocapsules lipidiques, les résultats du test des comètes avec hOGG1 devront être validés par un témoin positif oxydant dans le système d'essai.

Nos résultats sur les nanoparticules de WC-Co sont en faveur de leur utilisation comme témoin génotoxique de référence dans certains tests de génotoxicité *in vitro*. Toutefois, leur utilisation pourrait être limitée par la nature du test de génotoxicité, le type cellulaire ainsi que le schéma de traitement. Dans les conditions de notre étude, il ressort que les nanoparticules de WC-Co pourraient constituer un bon témoin positif génotoxique dans le test des micronoyaux sur lymphocytes humains avec blocage de la cytokinèse (avec ajout de la cytochalasine B à la fin de la période de traitement) dans le cas d'un traitement long (24h) suivi d'une période de recouvrement de 20h.

L'étude des nanoparticules de WC-Co dans différents types cellulaires (lignée L5178Y de lymphome de souris vs lymphocytes humains en culture primaire et lignée A549 vs lignées Hep3B et Caki-1) ont également confirmé l'importance du choix du type cellulaire pour les essais de (géo)toxicité *in vitro* sur des nanomatériaux. En effet, en plus de la représentativité des organes cibles potentiels, d'autres caractéristiques cellulaires sont à prendre en compte, notamment l'origine humaine ou non des cellules, leur statut p53, leurs capacités d'internalisation et d'externalisation des nanomatériaux, leurs capacités anti-oxydantes. Par ailleurs, dans le cas de cultures primaires de cellules, l'hétérogénéité interindividuelle ne doit pas être négligée. Le choix du test mis en œuvre est également important, chacun permettant d'évaluer des événements génétiques spécifiques, et ainsi différents mécanismes d'action. Dans le cas des nanomatériaux, des

mécanismes oxydants sont fréquemment décrits, et nos résultats confirment qu'ils jouent un rôle important dans la génotoxicité des nanoparticules de WC-Co. La recherche d'une génération d'ERO, par des méthodes appropriées, ou de lésions oxydatives de l'ADN est donc importante. Les évènements aneugènes sont également à rechercher pour les nanomatériaux.

L'étude des mécanismes d'action des nanoparticules de WC-Co sera poursuivie par l'analyse des voies de signalisation impliquées dans la réponse cellulaire aux nanoparticules de WC-Co dans une étude de toxicogénomique sur cellules de lymphome de souris L5178Y. Les résultats actuellement disponibles permettent de mettre en évidence des effets précoces après un traitement de 4h, et des effets plus tardifs, après un traitement de 4h suivi de 20h de recouvrement et un traitement continu de 24h.

Il serait par la suite intéressant d'étudier la génotoxicité des nanoparticules de WC-Co *in vitro* dans d'autres types cellulaires. Par ailleurs, nos premiers résultats dans le test des comètes *in vivo* semblent plutôt prometteurs, bien qu'ils doivent être confirmés, notamment par des données d'exposition aux nanoparticules de WC-Co des différents organes étudiés. Ces études de génotoxicité *in vivo* devraient donc être poursuivies, par exemple par l'évaluation des dommages chromosomiques avec le test des micronoyaux, de préférence sur poumons, foie ou rate, ou la mise en évidence de lésions oxydatives de l'ADN, notamment avec le test des comètes modifié avec l'enzyme hOGG1. Ces essais permettraient d'étudier *in vivo* les mécanismes d'actions identifiés *in vitro* pour les nanoparticules de WC-Co, ainsi que d'évaluer leur potentiel comme témoin génotoxique de référence également dans des essais *in vivo*. En effet, des nanomatériaux de référence seraient également utiles pour les essais *in vivo*, qui tiennent une place importante dans l'évaluation des nanomatériaux.

En parallèle de la recherche de témoins positifs sous forme nanoparticulaire, des nanomatériaux utilisables comme témoins négatifs seraient également utiles. D'après nos résultats et ceux d'une étude précédente (Paget et al., 2013), des nanodiamants pourraient être proposés comme témoin négatif dans plusieurs tests de génotoxicité *in vitro*. En effet, les tests des comètes, des micronoyaux et de détection des foci γ -H2AX n'ont pas révélé de génotoxicité de ces nanodiamants dans plusieurs types cellulaires.

Références bibliographiques

- Afssaps (2011). Recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire.
- Ames, B.N. (1973). Carcinogens are mutagens: their detection and classification. *Environ. Health Perspect.* 6, 115–118.
- Anard, D., Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Belpaeme, K., and Lison, D. (1997). In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays. *Carcinogenesis* 18, 177–184.
- Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P., and Boczkowski, J. (2009). Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. *Rev. Mal. Respir.* 26, 625–637.
- Anses (2014). Évaluation des risques liés aux nanomatériaux - Enjeux et mise à jour des connaissances.
- Armstead, A.L., Arena, C.B., and Li, B. (2014). Exploring the potential role of tungsten carbide cobalt (WC-Co) nanoparticle internalization in observed toxicity toward lung epithelial cells in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278, 1–8.
- Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T., and Tan, W. (2012). Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomed.* 7, 1253–1271.
- Bastian, S., Busch, W., Kühnel, D., Springer, A., Meissner, T., Holke, R., Scholz, S., Iwe, M., Pompe, W., Gelinsky, M., et al. (2009). Toxicity of tungsten carbide and cobalt-doped tungsten carbide nanoparticles in mammalian cells in vitro. *Environ. Health Perspect.* 117, 530–536.
- Benning, V., Brault, D., Duvinage, C., Thybaud, V., and Melcion, C. (1994). Validation of the in vivo CD1 mouse splenocyte micronucleus test. *Mutagenesis* 9, 199–204.
- Beyersmann, D., and Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82, 493–512.
- De Boeck, M., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (1998). Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis* 19, 2021–2029.
- De Boeck, M., Lombaert, N., De Backer, S., Finsy, R., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (2003a). In vitro genotoxic effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. *Mutagenesis* 18, 177–186.

- De Boeck, M., Hoet, P., Lombaert, N., Nemery, B., Kirsch-Volders, M., and Lison, D. (2003b). In vivo genotoxicity of hard metal dust: induction of micronuclei in rat type II epithelial lung cells. *Carcinogenesis* 24, 1793–1800.
- Bouwmeester, H., Lynch, I., marvin, H.J.P., Dawson, K.A., Berges, M., Braguer, D., Byrne, H.J., Casey, A., Chambers, G., Clift, M.J.D., et al. (2011). Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices. *Nanotoxicology* 5, 1–11.
- Bryce, S.M., Bemis, J.C., and Dertinger, S.D. (2008). In vivo mutation assay based on the endogenous Pig-a locus. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 256–264.
- Di Bucchianico, S., Fabbrizi, M.R., Misra, S.K., Valsami-Jones, E., Berhanu, D., Reip, P., Bergamaschi, E., and Migliore, L. (2013). Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. *Mutagenesis* 28, 287–299.
- Catalán, J., Järventaus, H., Vippola, M., Savolainen, K., and Norppa, H. (2012). Induction of chromosomal aberrations by carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles in human lymphocytes *in vitro*. *Nanotoxicology* 6, 825–836.
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z.G., and Shin, D.M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 1310–1316.
- Chou, L.Y.T., Ming, K., and Chan, W.C.W. (2011). Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 40, 233–245.
- Clare, M.G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V., et al. (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II. Using human lymphocytes. *Mutat. Res.* 607, 37–60.
- Collins, A. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res.* 681, 24–32.
- Collins, A.R. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 794–800.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., and Dobson, V.L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733–1735.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195–1214.
- Couvreur, P. (2013). Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 21–23.
- Ding, M., Kisin, E.R., Zhao, J., Bowman, L., Lu, Y., Jiang, B., Leonard, S., Vallyathan, V., Castranova, V., Murray, A.R., et al. (2009). Size-dependent effects of tungsten carbide-cobalt particles on oxygen radical production and activation of cell signaling pathways in murine epidermal cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 260–268.

- Dizdaroglu, M. (2005). Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat. Res.* 591, 45–59.
- Doak, S.H., Griffiths, S.M., Manshian, B., Singh, N., Williams, P.M., Brown, A.P., and Jenkins, G.J.S. (2009). Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* 24, 285–293.
- Doak, S.H., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., and Singh, N. (2012). In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat. Res.* 745, 104–111.
- Dobrovolskaia, M.A., and McNeil, S.E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2, 469–478.
- Donaldson, K., Poland, C.A., and Schins, R.P.F. (2010). Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology* 4, 414–420.
- Dworak, N., Wnuk, M., Zebrowski, J., Bartosz, G., and Lewinska, A. (2014). Genotoxic and mutagenic activity of diamond nanoparticles in human peripheral lymphocytes in vitro. *Carbon* 68, 763–776.
- ECHA (2012). Report on Survey of Worldwide CROs. Costs and Practicalities of Two New OECD Guidelines for Testing Chemical Substances OECD 443, Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, and OECD 488, Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Mutation Assay.
- Elhajouji, A., Cunha, M., and Kirsch-Volders, M. (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* 13, 193–198.
- Etheridge, M.L., Campbell, S.A., Erdman, A.G., Haynes, C.L., Wolf, S.M., and McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 9, 1–14.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 567, 1–61.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual. Chim.* 108–115.
- Fenech, M., and Morley, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147, 29–36.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., and Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125–132.

- Fowler, P., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Kirkland, D., Pfuhler, S., and Carmichael, P. (2012). Reduction of misleading (“false”) positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat. Res.* 742, 11–25.
- Fubini, B., Ghiazza, M., and Fenoglio, I. (2010). Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology* 4, 347–363.
- Ganem, N.J., Storchova, Z., and Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17, 157–162.
- Gao, G., Ze, Y., Zhao, X., Sang, X., Zheng, L., Ze, X., Gui, S., Sheng, L., Sun, Q., Hong, J., et al. (2013). Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J. Hazard. Mater.* 258-259, 133–143.
- Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., Menei, P., and Benoît, J.-P. (2006). A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1710–1722.
- Van Goethem, F., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (1997). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat. Res.* 392, 31–43.
- Gonzalez, L., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology* 2, 252–273.
- Gonzalez, L., Sanderson, B.J.S., and Kirsch-Volders, M. (2011). Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis* 26, 185–191.
- Groo, A.-C., Saulnier, P., Gimel, J.-C., Gravier, J., Ailhas, C., Benoit, J.-P., and Lagarce, F. (2013). Fate of paclitaxel lipid nanocapsules in intestinal mucus in view of their oral delivery. *Int. J. Nanomedicine* 8, 4291–4302.
- Guo, Y.-Y., Zhang, J., Zheng, Y.-F., Yang, J., and Zhu, X.-Q. (2011). Cytotoxic and genotoxic effects of multi-wall carbon nanotubes on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Mutat. Res.* 721, 184–191.
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Hagen, R., and Kleinsasser, N. (2011). Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol. Lett.* 201, 27–33.
- Hafner, A., Lovrić, J., Lakoš, G.P., and Pepić, I. (2014). Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int. J. Nanomedicine* 9, 1005–1023.
- Hartwig, A., and Schwerdtle, T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* 127, 47–54.

- Hastwell, P.W., Chai, L.-L., Roberts, K.J., Webster, T.W., Harvey, J.S., Rees, R.W., and Walmsley, R.M. (2006). High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay. *Mutat. Res.* *607*, 160–175.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., and Benoit, J.-P. (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* *19*, 875–880.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Venier-Julienne, M.-C., Proust, J.-E., Phan-Tan-Luu, R., and Benoît, J.-P. (2003). The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *18*, 55–61.
- Hirsjärvi, S., Dufort, S., Bastiat, G., Saulnier, P., Passirani, C., Coll, J.-L., and Benoît, J.-P. (2013a). Surface modification of lipid nanocapsules with polysaccharides: From physicochemical characteristics to in vivo aspects. *Acta Biomater.* *9*, 6686–6693.
- Hirsjärvi, S., Belloche, C., Hindré, F., Garcion, E., and Benoit, J.-P. (2013b). Tumour targeting of lipid nanocapsules grafted with cRGD peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV.*
- Hirsjärvi, S., Dufort, S., Gravier, J., Texier, I., Yan, Q., Bibette, J., Sancey, L., Josserand, V., Passirani, C., Benoit, J.-P., et al. (2013c). Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *9*, 375–387.
- Honma, M., and Hayashi, M. (2011). Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.* *52*, 373–384.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2006). Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. World Health Organ. Int. Agency Res. Cancer* *86*, 1–294.
- ICH (2011). ICH S2(R1). Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use.
- ISO (2008). ISO/TS 27687:2008 - Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate.
- ISO (2010). ISO/TS 80004-1:2010 - Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1: Core terms.
- Junghanns, J.-U.A.H., and Müller, R.H. (2008). Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int. J. Nanomedicine* *3*, 295–309.

- Kain, J., Karlsson, H.L., and Möller, L. (2012). DNA damage induced by micro- and nanoparticles--interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis* 27, 491–500.
- Kasten, U., Mullenders, L.H., and Hartwig, A. (1997). Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutat. Res.* 383, 81–89.
- Kato, T., Totsuka, Y., Ishino, K., Matsumoto, Y., Tada, Y., Nakae, D., Goto, S., Masuda, S., Ogo, S., Kawanishi, M., et al. (2013). Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology* 7, 452–461.
- Kaur, R., and Badea, I. (2013). Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems. *Int. J. Nanomedicine* 8, 203–220.
- Khatri, M., Bello, D., Pal, A.K., Cohen, J.M., Woskie, S., Gassert, T., Lan, J., Gu, A.Z., Demokritou, P., and Gaines, P. (2013). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory responses of nanoparticles from photocopiers in three human cell lines. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 42.
- King, R. (2008). When 2+2=5: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells. *Biochim Biophys Acta* 1786, 4–14.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D., and Schnekenburger, J. (2009). Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* 72, 370–377.
- Kwon, J.Y., Lee, S.Y., Koedrith, P., Lee, J.Y., Kim, K.-M., Oh, J.-M., Yang, S.I., Kim, M.-K., Lee, J.K., Jeong, J., et al. (2014). Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in in vitro and in vivo tests. *Mutat. Res.* 761, 1–9.
- Landsiedel, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K., and Oesch, F. (2009). Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers. *Mutat. Res.* 681, 241–258.
- Landsiedel, R., Fabian, E., Ma-Hock, L., van Ravenzwaay, B., Wohlleben, W., Wiench, K., and Oesch, F. (2012). Toxicology/biokinetics of nanomaterials. *Arch. Toxicol.* 86, 1021–1060.
- Larese Filon, F., Crosera, M., Adami, G., Bovenzi, M., Rossi, F., and Maina, G. (2011). Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin. *Nanotoxicology* 5, 493–501.
- Lasfargues, G. (1994). Lung cancer mortality in a French cohort of hard-metal workers. *Am. J. Ind. Med.* 26, 585–595.
- Lasfargues, G., Lardot, C., Delos, M., Lauwerys, R., and Lison, D. (1995). The delayed lung responses to single and repeated intratracheal administration of pure cobalt and hard metal powder in the rat. *Environ. Res.* 69, 108–121.

- Leonard, S., M. Gannett, P., Rojanasakul, Y., Schwegler-Berry, D., Castranova, V., Vallyathan, V., and Shi, X. (1998). Cobalt-mediated generation of reactive oxygen species and its possible mechanism. *J. Inorg. Biochem.* *70*, 239–244.
- Li, J., Zhu, Y., Li, W., Zhang, X., Peng, Y., and Huang, Q. (2010). Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug. *Biomaterials* *31*, 8410–8418.
- Li, Y., Bhalli, J.A., Ding, W., Yan, J., Pearce, M.G., Sadiq, R., Cunningham, C.K., Jones, M.Y., Monroe, W.A., Howard, P.C., et al. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*.
- Lison, D., Carbonnelle, P., Mollo, L., Lauwerys, R., and Fubini, B. (1995). Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* *8*, 600–606.
- Lison, D., Lauwerys, R., Demedts, M., and Nemery, B. (1996). Experimental research into the pathogenesis of cobalt/hard metal lung disease. *Eur. Respir. J.* *9*, 1024–1028.
- Louro, H., Tavares, A., Vital, N., Costa, P.M., Alverca, E., Zwart, E., de Jong, W.H., Fessard, V., Lavinha, J., and Silva, M.J. (2014). Integrated approach to the *in vivo* genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice. *Environ. Mol. Mutagen.*
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., and Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* *8*, 233–278.
- Manke, A., Wang, L., and Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity.
- Mathias, F.T., Romano, R.M., Kizys, M.M.L., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M.I., Dias-da-Silva, M.R., and Romano, M.A. (2014). Daily exposure to silver nanoparticles during prepubertal development decreases adult sperm and reproductive parameters. *Nanotoxicology* 1–7.
- Maupas, C., Moulari, B., Béduneau, A., Lamprecht, A., and Pellequer, Y. (2011). Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells. *Int. J. Pharm.* *411*, 136–141.
- Mei, N., Zhang, Y., Chen, Y., Guo, X., Ding, W., Ali, S.F., Biris, A.S., Rice, P., Moore, M.M., and Chen, T. (2012). Silver nanoparticle-induced mutations and oxidative stress in mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.* *53*, 409–419.
- Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T., and Sawyer, J. (1985). Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTr) mutants of L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* *151*, 161–174.
- Moulin, J.J., Wild, P., Romazini, S., Lasfargues, G., Peltier, A., Bozec, C., Deguerry, P., Pellet, F., and Perdrix, A. (1998). Lung cancer risk in hard-metal workers. *Am. J. Epidemiol.* *148*, 241–248.

- Muller, J., Decordier, I., Hoet, P.H., Lombaert, N., Thomassen, L., Huaux, F., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (2008). Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 29, 427–433.
- Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., and Hussain, S.M. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 101, 239–253.
- Nanogenotox (2013). Nanogenotox final report.
- National Toxicology Program (2011). Cobalt-tungsten carbide: powders and hard metals. Rep. Carcinog. Carcinog. Profiles US Dept Health Hum. Serv. Public Health Serv. Natl. Toxicol. Program 12, 115–120.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113, 823–839.
- OCDE (1997a). Essai n° 471: Essai de mutation réverse sur des bactéries.
- OCDE (1997b). OECD guideline for the testing of chemicals 476 - In vitro mammalian cell gene mutation test.
- OCDE (1997c). OECD guideline for the testing of chemicals 473 - In vitro mammalian chromosome aberration test.
- OCDE (1997d). Essai n° 475: Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères.
- OCDE (1997e). Essai n° 474: Le test de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères.
- OCDE (2010). OECD guideline for the testing of chemicals 487 - In vitro mammalian cell micronucleus test.
- OCDE (2012). Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials.
- OCDE (2013a). Draft TG on the in vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.
- OCDE (2013b). Essai n° 488 : Essais de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques.
- Ohyama, W., Gonda, M., Miyajima, H., Kondo, K., Noguchi, T., Yoshida, J., Hatakeyama, S., Watabe, E., Ueno, Y., Hayashi, M., et al. (2002). Collaborative validation study of the in vivo micronucleus test using mouse colonic epithelial cells. *Mutat. Res.* 518, 39–45.
- Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D., and Lorge, E. (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test V. Using L5178Y cells. *Mutat. Res.* 607, 125–152.

- Önfelt, A. (1986). Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and abnormal chromosome numbers. *Mutat Res.* 168, 249–300.
- Paget, V., Sergent, J.A., Grall, R., Altmeyer-Morel, S., Girard, H.A., Petit, T., Gesset, C., Mermoux, M., Bergonzo, P., Arnault, J.C., et al. (2013). Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines. *Nanotoxicology*.
- Panariti, A., Miserocchi, G., and Rivolta, I. (2012). The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol. Sci. Appl.* 5, 87–100.
- Parveen, S., Misra, R., and Sahoo, S. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine* 8, 147–166.
- Petit, T. (2013). Modifications de surface des nanodiamants : compréhension des mécanismes d'échanges électroniques et mise en évidence d'un effet thérapeutique. Thèse : PhD. Ecole Normale Supérieure de Cachan.
- Pettitt, M.E., and Lead, J.R. (2013). Minimum physicochemical characterisation requirements for nanomaterial regulation. *Environ. Int.* 52, 41–50.
- Porto, B., Chiecchio, L., Gaspar, J., Faber, A., Pinho, L., Rueff, J., and Malheiro, I. (2003). Role of haemoglobin in the protection of cultured lymphocytes against diepoxybutane (DEB), assessed by in vitro induced chromosome breakage. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 536, 61–67.
- Rauch, J., Kolch, W., Laurent, S., and Mahmoudi, M. (2013). Big signals from small particles: regulation of cell signaling pathways by nanoparticles. *Chem. Rev.* 113, 3391–3406.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 377, 159–169.
- Richter, V., and Ruthendorf, M. v (1999). On hardness and toughness of ultrafine and nanocrystalline hard materials. *Int. J. Refract. Met. Hard Mater.* 17, 141–152.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146, 905–916.
- Roger, E. (2009). Mise au point de nouveaux vecteurs colloïdaux pour améliorer l'absorption digestive de médicaments anticancéreux. Thèse : PhD. Université d'Angers.
- Rybak-Smith, M.J., and Sim, R.B. (2011). Complement activation by carbon nanotubes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1031–1041.

- Sadiq, R., Bhalli, J.A., Yan, J., Woodruff, R.S., Pearce, M.G., Li, Y., Mustafa, T., Watanabe, F., Pack, L.M., Biris, A.S., et al. (2012). Genotoxicity of TiO₂ anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. *Mutat. Res.* *745*, 65–72.
- Sadrieh, N., Wokovich, A.M., Gopee, N.V., Zheng, J., Haines, D., Parmiter, D., Siitonen, P.H., Cozart, C.R., Patri, A.K., McNeil, S.E., et al. (2010). Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO₂ Particles. *Toxicol. Sci.* *115*, 156–166.
- Saliou, B., Thomas, O., Lautram, N., Clavreul, A., Hureauux, J., Urban, T., Benoit, J.-P., and Lagarce, F. (2013). Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide. *Eur. J. Pharm. Sci.* *50*, 172–180.
- Sergent, J.-A., Paget, V., and Chevillard, S. (2012). Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann. Occup. Hyg.* *56*, 622–630.
- Shegokar, R., and Müller, R.H. (2010). Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int. J. Pharm.* *399*, 129–139.
- Shimizu, M., Tainaka, H., Oba, T., Mizuo, K., Umezawa, M., and Takeda, K. (2009). Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part. Fibre Toxicol.* *6*, 20.
- Shimkunas, R.A., Robinson, E., Lam, R., Lu, S., Xu, X., Zhang, X.-Q., Huang, H., Osawa, E., and Ho, D. (2009). Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles. *Biomaterials* *30*, 5720–5728.
- Simon-Deckers, A. (2008). Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques. Thèse : PhD. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., and Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* *30*, 3891–3914.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* *175*, 184–191.
- Smith, C.C., O'Donovan, M.R., and Martin, E.A. (2006). hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* *21*, 185–190.
- Solarska, K., Gajewska, A., Kaczorowski, W., Bartosz, G., and Mitura, K. (2012). Effect of nanodiamond powders on the viability and production of reactive oxygen and nitrogen species by human endothelial cells. *Diam. Relat. Mater.* *21*, 107–113.
- Speit, G., Schütz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., and Hoffmann, H. (2004). Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett.* *146*, 151–158.

- Storer, R.D., Kraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L., and DeLuca, J.G. (1997). The mouse lymphoma L5178Y Tk[±] cell line is heterozygous for a codon 170 mutation in the p53 tumor suppressor gene. *Mutat. Res.* 373, 157–165.
- Suzuki, H., Takasawa, H., Kobayashi, K., Terashima, Y., Shimada, Y., Ogawa, I., Tanaka, J., Imamura, T., Miyazaki, A., and Hayashi, M. (2009). Evaluation of a liver micronucleus assay with 12 chemicals using young rats (II): a study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test/Japanese Environmental Mutagen Society–Mammalian Mutagenicity Study Group. *Mutagenesis* 24, 9–16.
- Szebeni, J. (2005). Complement activation-related pseudoallergy: A new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology* 216, 106–121.
- Szebeni, J., Muggia, F., Gabizon, A., and Barenholz, Y. (2011). Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1020–1030.
- Takahashi, A., and Ohnishi, T. (2005). Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.* 229, 171–179.
- Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T., and Kinoshita, T. (1993). Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73, 703–711.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., and Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
- Toyooka, T., Amano, T., and Ibuki, Y. (2012). Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat. Res.* 742, 84–91.
- Treuel, L., Jiang, X., and Nienhaus, G.U. (2013). New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* 10.
- Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., and Schiestl, R.H. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 69, 8784–8789.
- Wang, J.J., Sanderson, B.J.S., and Wang, H. (2007a). Cytotoxicity and genotoxicity of ultrafine crystalline SiO₂ particulate in cultured human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 151–157.
- Wang, J.J., Sanderson, B.J.S., and Wang, H. (2007b). Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.* 628, 99–106.
- Warheit, D.B. (2008). How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 101, 183–185.

- Warheit, D.B., and Donner, E.M. (2010). Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines. *Nanotoxicology* 4, 409–413.
- Wick, P., Malek, A., Manser, P., Meili, D., Maeder-Althaus, X., Diener, L., Diener, P.-A., Zisch, A., Krug, H.F., and von Mandach, U. (2010). Barrier Capacity of Human Placenta for Nanosized Materials. *Environ. Health Perspect.* 118, 432–436.
- Wild, P., Perdrix, A., Romazini, S., Moulin, J.J., and Pellet, F. (2000). Lung cancer mortality in a site producing hard metals. *Occup. Environ. Med.* 57, 568–573.
- Witkiewicz-Kucharczyk, A., and Bal, W. (2006). Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 162, 29–42.
- Xiao, J., Duan, X., Yin, Q., Zhang, Z., Yu, H., and Li, Y. (2013). Nanodiamonds-mediated doxorubicin nuclear delivery to inhibit lung metastasis of breast cancer. *Biomaterials* 34, 9648–9656.
- Xing, Y., Xiong, W., Zhu, L., Osawa, E., Hussin, S., and Dai, L. (2011). DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds. *ACS Nano* 5, 2376–2384.
- Xu, A., Chai, Y., Nohmi, T., and Hei, T.K. (2009). Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells. *Part. Fibre Toxicol.* 6, 3.
- Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Mimura, K., Morishita, Y., Nozaki, M., Yoshida, T., Ogura, T., Nabeshi, H., Nagano, K., et al. (2011). Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nanotechnol.* 6, 321–328.
- Zhang, X., Yin, J., Kang, C., Li, J., Zhu, Y., Li, W., Huang, Q., and Zhu, Z. (2010). Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation. *Toxicol. Lett.* 198, 237–243.
- Zhao, J., Bowman, L., Magaye, R., Leonard, S., Castranova, V., and Ding, M. (2013). Apoptosis induced by tungsten carbide-cobalt nanoparticles in JB6 cells involves ROS generation through both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Int J Oncol* 42, 1349–1359.
- Zhu, Y., Li, J., Li, W., Zhang, Y., Yang, X., Chen, N., Sun, Y., Zhao, Y., Fan, C., and Huang, Q. (2012). The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems. *Theranostics* 2, 302–312.
- Zolnik, B.S., Gonzalez-Fernandez, A., Sadrieh, N., and Dobrovolskaia, M.A. (2010). Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology* 151, 458–465.
- Zucker, R.M., Massaro, E.J., Sanders, K.M., Degn, L.L., and Boyes, W.K. (2010). Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 77, 677–685.