



Etude de la biodistribution et de la toxicité des Nanoparticules de Fer chez le rat et sur une lignée de neuroblastome

Dalel Askri

► To cite this version:

Dalel Askri. Etude de la biodistribution et de la toxicité des Nanoparticules de Fer chez le rat et sur une lignée de neuroblastome. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes; Université de Carthage (Tunisie), 2018. Français. NNT: 2018GREAS021 . tel-02384612

HAL Id: tel-02384612

<https://theses.hal.science/tel-02384612>

Submitted on 28 Nov 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

**préparée dans le cadre d'une cotutelle entre la
Communauté Université Grenoble Alpes
et l'Université de Carthage**

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie
pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel du 25 mai 2016

Présentée par

« Dalel ASKRI »

Thèse dirigée par « **Pr. Mohsen SAKLY** » et « **Pr. Michel SEVE** »

préparée au sein de l'Unité de recherche de **Physiologie
Intégrée et la Plateforme de Protéomique Prométhée**

dans les **Écoles Doctorales : Sciences, Vie et Matière (Bizerte)
et Ingénierie pour la santé la Cognition et l'Environnement
(Grenoble)**

Etude de la biodistribution et de la toxicité des nanoparticules de fer chez le rat et sur une lignée de neuroblastome

Thèse soutenue publiquement le « **26 Septembre 2018** »,
devant le jury composé de :

M. Hichem SEBAI

MC Institut Supérieur de Biotechnologie de Béja, Rapporteur

Mme Marie CARRIERE

IR CNRS, CEA de Grenoble, Université Grenoble Alpes, Membre

M. Laurent CHAVATTE

CR Ecole Normale Supérieure de Lyon, Membre

M. Kamel KACEM

PR Faculté des Sciences de Bizerte, Membre

M. Mohsen SAKLY

PR Faculté des Sciences de Bizerte, Membre

M. Michel SEVE

PR Université Grenoble Alpes, Membre

M. Luc FERRARI

PR Université de Lorraine, Rapporteur & Président



A mes très chers parents,

Aucun mot et aucune langue ne pourra exprimer mes sentiments envers vous.

A mon cher mari Foued

A mes chers frères Bilel et Hamza

A mes chères cousines Ilhem, Ismahane, Asma, Wiem, Wided et Houda

A mes chers grands parents qui nous ont quittés

A toute ma famille, à toute ma belle-famille.

A tous mes chères amies : Souhir, Chayma, Assia, Ilwad, Marwa,

Amira, Haïfa, Fatma, Afef, Karima, Takwa, Wafa et Maïwenn

A mes chers amis de la faculté,

Pour tout le soutien que vous m'avez offert, je vous dis

MERCI.

A tous ceux qui m'aiment.

Remerciements

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.

Marcel Proust

La thèse de doctorat représente un travail s'inscrivant dans la durée, et pour cette raison, constitue le fil conducteur d'une tranche de vie de son auteur, parfois au crépuscule de la candeur étudiante, et souvent à l'aube de la maturité scientifique. De nombreuses personnes se retrouvent ainsi de manière fortuite ou non, pour le pire ou le meilleur, entre le doctorant et son doctorat.

Morgan David

Ce sont certaines de ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans mes remerciements.

Mes premiers remerciements seront adressés à mes deux directeurs de thèse Professeur Mohsen Sakly et Professeur Michel Sève.

Un immense merci à Professeur Mohsen Sakly. Des qualités scientifiques exceptionnelles mêlées d'une gentillesse extraordinaire font de Pr Sakly la clef de voûte de la réalisation de ma thèse. Ses conseils avisés m'ont permis de découvrir les fabuleux plaisirs de la recherche sous ses apparences les plus diverses. Je n'oublierai jamais son soutien et sa disponibilité dans les moments de doute. J'ai connu Professeur Sakly en tant qu'étudiante en M1 et depuis, tout au long de mes études de troisième cycle, il a su m'apporter un soutien constant, une disponibilité, une écoute, une confiance, des encouragements et des conseils précieux et avisés à la hauteur de ses compétences et de ses réelles qualités humaines.

Je remercie vivement Professeur Michel Sève pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'acceptant d'être son étudiante dès mon stage de M2, et ainsi d'entrer dans le monde de la protéomique et celui de la recherche scientifique en général. Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. Un grand merci pour son encadrement, ses conseils avisés, et sa bonne humeur. Merci pour tout ce que j'ai appris de ce grand Monsieur, mais également pour son intérêt et son soutien dans certains moments difficiles, sa grande disponibilité malgré ses nombreuses charges et ses nombreux conseils durant la réalisation des expériences et la rédaction de ma thèse.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance à mon encadreur, Docteur Salem Amara pour son soutien et ses encouragements. J'ai connu Dr Amara pendant mon Master en Tunisie et je lui dois une partie de l'élaboration de mon sujet de thèse en cotutelle et de la motivation nécessaire à aller de l'avant. Un grand merci pour tout ce qu'il a fait pour moi.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Tunisien, de la région Auvergne-Rhône Alpes et de l'Ambassade de France en Tunisie qui m'ont permis, grâce à des allocations de recherche et diverses aides financières, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

J'exprime mes chaleureux remerciements à l'ensemble des membres de mon jury, Dr Hichem Sebai pour avoir accepté d'être mon rapporteur, Dr Marie Carrière, Dr Laurent Chavatte et Pr Kamel Kacem, pour avoir accepté de venir examiner mes travaux et Pr Luc Ferrari pour avoir accepté d'être mon rapporteur et de présider ce jury. Je remercie également mon Professeur Philippe Sabatier d'avoir accepté notre invitation pour participer à ce jury en tant que membre invité.

Mention spéciale à Docteur Sylvia G. Lehmann. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'ont témoignés les membres de la plateforme de Protéomique Prométhée : Docteur Sandrine Bougoin-Voillard, ma chère encadrante de M2, Docteur Sylvie Michelland et Madame Valérie Cunin qui m'ont soutenu sur les plans professionnel et personnel au quotidien me permettant ainsi de finaliser cette thèse de doctorat. Je n'oublierai jamais nos « petites et grandes » discussions et les bons moments qu'on a passés ensemble au laboratoire ou bien pendant les événements scientifiques auxquels nous avons assisté ensemble.

Je remercie également Docteur Walid Rachidi et Monsieur David Béal pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de Chimie Interface Biologie pour l'Environnement, la Santé et la Toxicologie au CEA de Grenoble et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

Je tiens, tout particulièrement, à témoigner une vive reconnaissance à Docteur Josiane Arnaud pour son aide et ses conseils. Elle était toujours présente pour me supporter au bon moment. Merci également à Professeur Nathalie Sturm, Docteur Benoit Chovelon et à Madame Sylvie Berthier avec qui j'ai collaboré et j'ai discuté pour longtemps mes travaux de thèse.

J'adresse toute ma gratitude à mes collègues Souhir, Imen, Naima, Alfonso, Issa, Muriel, Mathias, Min et Xiaoxi, et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Je ne saurais terminer sans remercier toutes ces personnes dans l'ombre dont la contribution à mon travail est non négligeable. Un grand merci aussi à tous les professionnels et les scientifiques rencontrés dans les conférences de part et d'autre de la méditerranée et dont nos échanges ont enrichi l'expérience de la thèse.

Résumé

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont utilisées dans plusieurs domaines notamment en Biomédecine comme agents théranostiques en Cancérologie et aussi comme agents de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique. Avec l'augmentation de la production et de l'utilisation de ces NPs de fer, il y a une évidente augmentation de l'exposition humaine et environnementale à ces NPs, et qui peut présenter un risque. Le sujet de ma thèse porte sur l'étude de l'impact physiopathologique et de la toxicité des nanoparticules de fer (NPs de fer) en utilisant un modèle cellulaire de neuroblastome et un modèle d'étude animal, le rat Wistar. L'objectif des travaux de recherche de la partie *in vitro* est d'évaluer les effets cytotoxiques et génotoxiques ainsi que les effets sur l'expression des protéines cellulaires suite à l'exposition des cellules SH-SY5Y à des concentrations croissantes des NPs de fer. Nous avons montré que les NPs de fer induisent des perturbations cellulaires d'une manière dépendante de la taille et de la concentration. L'analyse protéomique suivie par l'annotation des gènes avec l'ontologie et l'analyse des voies de signalisation a mis en évidence les effets des NPs de fer sur le cytosquelette, l'apoptose et le développement du cancer. Les objectifs de nos travaux de recherche réalisés *in vivo* consistent à étudier les effets physiopathologiques des NPs de fer administrées par trois voies différentes, intraveineuse, intranasale et orale, à savoir leur impact sur le comportement émotionnel et cognitif ainsi que sur l'homéostasie des neurotransmetteurs et des éléments traces. Les résultats ont montré que les NPs de fer n'induisent pas de modification concernant l'anxiété, la locomotion, l'apprentissage et la mémoire chez le rat quelle que soit la voie d'administration. Cependant, ces NPs provoquent une perturbation des niveaux des catécholamines et des éléments traces au niveau cérébral. Les effets les plus marqués ont été observés suite à l'instillation intranasale des NPs et se manifestent par une diminution de taux du fer sérique, la thrombocytose et la présence des foyers inflammatoires au niveau hépatique. L'analyse comparative des trois voies d'administration a montré que la voie intraveineuse est la moins toxique. Enfin, l'étude protéomique des protéomes du cerveau, du foie et du poumon a permis d'évaluer la toxicité des NPs de fer au niveau protéique et moléculaire. Les résultats obtenus présentent un support important pour l'estimation et la compréhension des effets potentiellement adverses de ces NPs qui présentent une certaine toxicité non négligeable de point de vue moléculaire et physiopathologique. Ainsi, leur utilisation dans le domaine biomédical doit être prise avec beaucoup de précaution pour éviter au maximum tout risque lié à leur exposition afin d'améliorer leur biocompatibilité et ainsi augmenter leurs avantages.

Mots clés: Nanoparticules de fer; Toxicité; Rat; SH-SY5Y; Physiopathologie; Cognition; Protéomique

Abstract

Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) are used in several fields notably in Biomedicine as theranostic agents in Oncology and also as contrast agents in Magnetic Resonance Imaging. With the increase in the production and use of IONPs, there is a clear increase in human and environmental exposure to these NPs, which may pose a risk. The subject of my thesis is the study of the physiopathological impact and toxicity of iron oxide nanoparticles using a cell model of neuroblastoma and an animal study model, the Wistar rat. The aim of the research work of the *in vitro* part is to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects as well as the effects on the expression of cellular proteins following the exposure of SH-SY5Y cells to increasing concentrations of iron NPs. We have shown that iron NPs induce cellular perturbations in a size and concentration dependent manner. Proteomic analysis followed by ontological gene annotation and signaling pathway analysis revealed the effects of IONPs on cytoskeleton, apoptosis and cancer development. The aims of our research carried out *in vivo* are to investigate the pathophysiological effects of iron NPs administered by three different routes, intravenous, intranasal and oral, also their impact on emotional and cognitive behavior as well as neurotransmitter and trace element homeostasis. The results showed that IONPs do not induce any changes in anxiety, locomotion, learning and memory in rats regardless of the administration route. However, these NPs cause a disruption of catecholamine and trace element levels in the brain. The most marked effects have been observed following intranasal instillation of NPs and are manifested by a decrease in serum iron levels, thrombocytosis and the presence of inflammatory foci in the liver. The comparative analysis of the three routes of administration showed that the intravenous route is the least toxic. Finally, the proteomic study of the proteomes of the brain, liver and lung has made it possible to evaluate the toxicity of the NPs of iron at the protein and molecular level. The obtained results provide an important support for the estimation and understanding of potentially adverse effects of these NPs, which have a certain toxicity that is not negligible from a molecular and physiopathological point of view. Thus, great care must be taken regarding their use in the biomedical field to minimize any risk related to IONP exposure in order to improve their biocompatibility and thus increase their benefits.

Key words: Iron nanoparticles; Toxicity; Rat; SH-SY5Y; Physiopathology; Cognition; Proteomics

Communications des travaux de thèse

Publications :

- **“Intranasal instillation of iron oxide nanoparticles induces inflammation and perturbation of trace elements and neurotransmitters, but not behavioral impairment in rats”**

Auteurs : **Dalel Askri**, Souhir Ouni, Said Galai, Josiane Arnaud, Benoit Chovelon, Sylvia G. Lehmann, Nathalie Sturm, Mohsen Sakly, Michel Sève, and Salem Amara

Publié le 05 Avril 2018 à Environmental Science and Pollution Research
doi: 10.1007/s11356-018-1854-0

- **“Sub-acute intravenous exposure to Fe₂O₃ nanoparticles does not alter cognitive performances and catecholamine levels, but slightly disrupts plasma iron level and brain iron content in rats”**

Auteurs : **Dalel Askri**, Souhir Ouni, Said Galai, Benoit Chovelon, Josiane Arnaud, Sylvia G. Lehmann, Mohsen Sakly, Michel Sève, and Salem Amara

Publié le 6 juin 2018 à Journal of Trace Elements in Medicine and Biology
doi: 10.1016/j.jtemb.2018.06.006

- **“Investigating the toxic effects induced by Iron Oxide Nanoparticles on neuroblastoma cell line: an integrative study combining cytotoxic, genotoxic and proteomic tools.”**

Auteurs: **Dalel Askri**, Valérie Cunin, David Beal, Sylvie Berthier, Benoit Chovelon, Josiane Arnaud, Walid Rachidi, Mohsen Sakly, Salem Amara, Michel Sève, and Sylvia G. Lehmann

Soumis et en révision depuis le 24 Septembre 2018 à « Nanotoxicology »

- **“Proteome changes after sub-acute intranasal iron oxide nanoparticle exposure in Wistar rat”**

Auteurs : **Dalel Askri**, Valérie Cunin, David Beal, Walid Rachidi, Mohsen Sakly, Salem Amara, Sylvia G. Lehmann, and Michel Sève

À soumettre à « Journal of Proteomics »

- **“Effects of Copper Oxide Nanoparticles on cognitive performances in Wistar rats”**

Auteurs : Souhir Ouni, **Dalel Askri**, Mustapha Jeljeli, Hafedh Abdelmalek, Mohsen Sakly, and Salem Amara

En révision à Behavioural Pharmacology.

Communications orales :

-Séminaire du Jeudi du LBFA de Grenoble, Grenoble, France, Juillet 2018

« Évaluation de l'impact physiopathologique des Nanoparticules de fer sur le rat suite à une exposition intraveineuse.» Dalel Askri *et al.*

-Les 1^{ères} journées de la Société Francophone d'Etude et de Recherche sur les Eléments Toxiques et Essentiels (SFERETE), Pau, France, Décembre 2017

« Étude de l'effet de l'administration des Nanoparticules d'oxyde de Fer sur la physiopathologie, l'homéostasie des minéraux et le protéome chez Le Rat. » Dalel Askri *et al.*

- La 7^{ème} Rencontre Internationale de l'Institut des Métaux en Biologie de Grenoble (IMBG), Villard-de-Lans, France, Septembre 2017

“Investigating the Pathophysiological Effects and the Proteome Changes after Iron Oxide Nanoparticles Administration.” Dalel Askri *et al.*

- La 35^{ème} Rencontre Informelle de Spectrométrie de masse, Aussois, France, Mai 2017

“Proteomic Analysis for Studying Iron Oxide Nanoparticles Effects on Wistar Rat.”

Dalel Askri *et al.*

-Séminaire du Jeudi du LBFA de Grenoble, Grenoble, France, Avril 2017

« Effets de l'administration intranasale des nanoparticules de Fer sur la physiologie et le protéome du rat Wistar. » Dalel Askri *et al.*

- Les 6^{èmes} Journées Scientifiques de l'Association Tunisienne de Toxicologie, Tabarka, Tunisie, Janvier 2017

“Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Adult Wistar Rat's Physiology.” Askri Dalel *et al.*

- Le 5^{ème} Congrès de l'Association Tunisienne de Physiologie & de Bio-surveillance de l'Environnement, Hammamet, Tunisie, Décembre 2016

“Effects of Intranasally Administered Iron Oxide Nanoparticles on Biochemical and Hematological Parameters of Adult Wistar Rats.” Dalel Askri *et al.*

Communications affichées :

-Journée de la Recherche Médicale 2018, Grenoble, France, Juin 2018

-Conférence de Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Fluxomique & Electrophorèse et Analyse Protéomique (SMMAP), Marne-la-Vallée, France, Octobre 2017

“Investigating Iron Oxide Nanoparticles Effects on Rat Using Proteomic Tools”. Dalel Askri *et al.*

-The 5th World Congress and Expo on Nanotechnology and Material Science, Barcelone, Espagne, Avril 2017

- Journée de la Recherche Médicale 2017, Grenoble, France, Juin 2017

“Study of the Toxic Effects Induced by Iron Oxide Nanoparticles on SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line. Dalel Askri *et al.*

- Le 37^{ème} Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie, Paris, France, Mars 2017 “Etude de la Toxicité Hématologique des Nanoparticules de Fer chez le Rat.” Dalel Askri *et al.*

- Le 1^{er} Colloque Jeunes Chercheurs de l'Institut Pasteur de Tunis, Tunis, Tunisie, Décembre 2016

“Effects of Iron Oxide Nanoparticles on SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line.” ASKRI Dalel *et al.*

-La 16^{ème} journée scientifique de l'école doctorale EDISCE, Grenoble, France, Juin 2016

“Behavioral Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Adult Male Rats.” Dalel Askri *et al.*

- Le 6^{ème} Colloque International Sciences & Environnement, Bizerte, Tunisie, Mars 2016

“Study of Iron Nanoparticles Effects on Biochemical and Hematological Parameters in Adult Male Rats.” Dalel Askri *et al.*

- Le 4^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, Hammamet, Tunisie, Mars 2016

“Acute Toxicity Induced by Single Iron Nanoparticles Intravenous Injection in Male Rats.” Dalel Askri *et al.*

Sommaire

Plan général du manuscrit

I.	INTRODUCTION	35
II.	SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	39
A.	Les nanotechnologies	39
B.	Toxicité des nanoparticules	63
C.	Modèles d'études toxicologiques.....	73
D.	Méthodes d'études et d'exploration des effets des nanoparticules	79
E.	Etude protéomique	97
III.	OBJECTIFS DU TRAVAIL ET CHOIX METHODOLOGIQUES	111
IV.	MATERIEL ET METHODES	115
A.	Les nanoparticules d'oxyde de fer.....	115
B.	Etude sur modèle cellulaire.....	117
C.	Etudes sur modèle animal	122
D.	Etude protéomique	129
V.	RESULTATS ET DISCUSSION	137
A.	Etude <i>in vitro</i> des effets des NPs de fer sur les cellules SH-SY5Y	137
B.	Etudes <i>in vivo</i>	191
VI.	DISCUSSION GENERALE	305
VII.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	323
VIII.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	329
IX.	ANNEXES.....	348
A.	ANNEXE 1 : Tableaux des protéines dérégulées suite à l'exposition des cellules aux Nanoparticules de fer (de l'article I).....	350
B.	ANNEXE 2 : Tableaux des protéines dérégulées suite à l'exposition intranasale des rats Wistar aux Nanoparticules de fer (dans le cerveau, le foie et le poumon)	358
C.	ANNEXE 3 : Posters.....	374

Plan détaillé du manuscrit

I.	INTRODUCTION	35
II.	SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	39
A.	Les nanotechnologies	39
1.	Définitions	39
2.	Réglementation	40
a)	En France	40
b)	En Europe	44
3.	Les nanoparticules : caractéristiques et applications	45
a)	Exposition aux nanoparticules.....	48
b)	Métabolisme, dégradation, accumulation et excrétion.....	50
4.	Les nanoparticules d'oxyde de fer.....	52
a)	Méthodes de synthèse des nanoparticules de fer	53
b)	Revêtement de surface des nanoparticules de fer	57
c)	Applications des nanoparticules de fer	58
B.	Toxicité des nanoparticules.....	63
1.	Nanotoxicologie : Définition.....	63
2.	Toxicité et caractéristiques des nanoparticules	63
a)	Taille	64
b)	Surface et charge.....	65
c)	Morphologie	66
d)	Agglomération et agrégation	67
e)	Composition chimique.....	67
3.	Caractérisation physicochimique des nanoparticules.....	68
a)	Mesure des paramètres en poudre et en suspension.....	68
b)	Caractéristiques de surface	69
4.	Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer.....	70
C.	Modèles d'études toxicologiques.....	73
1.	Modèles cellulaires.....	73
a)	Cellules primaires	73
b)	Lignées cellulaires.....	74
2.	Modèles animaux	76
D.	Méthodes d'études et d'exploration des effets des nanoparticules	79
1.	Evaluation de la toxicité <i>in vitro</i>	80

a)	Etude de la cytotoxicité	80
b)	Etude de la génotoxicité	83
c)	Etude du stress oxydatif	85
2.	Evaluation de la toxicité <i>in vivo</i>	87
a)	Etude de la biodistribution et la clairance.....	87
b)	Etude des paramètres hématologiques et biochimiques.....	88
c)	Etude histologique.....	89
d)	Etude comportementale	90
3.	Etude de l'internalisation et la localisation intracellulaire des nanoparticules	91
4.	Les approches omiques	92
a)	La génomique	94
b)	La transcriptomique	94
c)	La protéomique	95
d)	La métabolomique.....	96
E.	Etude protéomique	97
1.	Introduction de la protéomique.....	97
2.	Spectrométrie de masse.....	98
3.	Préparation de l'échantillon	99
4.	Séparation des peptides.....	100
5.	Quantification des protéines par spectrométrie de masse.....	103
6.	Analyse Bioinformatique	106
III.	OBJECTIFS DU TRAVAIL ET CHOIX METHODOLOGIQUES	111
IV.	MATERIEL ET METHODES	115
A.	Les nanoparticules d'oxyde de fer.....	115
1.	Préparation des nanoparticules d'oxyde de fer	115
2.	Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer.....	115
B.	Etude sur modèle cellulaire.....	117
1.	Mise en solution des nanoparticules d'oxyde de fer	117
2.	Culture cellulaire des cellules SH-SY5Y.....	117
3.	Traitement des cellules par les nanoparticules de fer	117
4.	Etude de la viabilité cellulaire par le test MTT	117
5.	Etude de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion au bleu de trypan.....	118
6.	Etude du cycle cellulaire, de la taille et de la granularité des cellules par cytométrie en flux	118
7.	Test de génotoxicité Comète.....	119
8.	Microscopie à Fluorescence : étude du MMP, la teneur en Ca ²⁺ , l'intégrité de la membrane et l'induction ROS	120

9. Microscopie en Darkfield.....	121
C. Etudes sur modèle animal	122
1. Mesures biochimiques et hématologiques	122
2. Dosage des éléments traces.....	122
3. Dosage des neurotransmetteurs.....	123
4. Tests de comportement	123
a) Labyrinthe en croix surélevé	123
b) Open Field.....	124
c) Piscine de Morris	125
5. Anatomo-pathologie	127
D. Etude protéomique	129
1. Extraction des protéines.....	129
2. Dosage des protéines par la méthode BCA	129
3. Digestion des protéines par la méthode FASP (Filter Aided Sample Preparation)	129
4. Dessalage et Dosage des peptides par la méthode BCA peptides	130
5. Marquage isobarique par la méthode iTRAQ.....	130
6. Fractionnement OFFGEL.....	131
7. Fractionnement en phase inverse par HPLC	131
8. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF	132
9. Analyse Bioinformatique : ProteinPilot, isobar, gene ontology et PathwayStudio.....	132
a) ProteinPilot et isobar.....	132
b) Ontologie génique et analyse de réseau protéique	133
V. RESULTATS ET DISCUSSION	137
A. Etude <i>in vitro</i> des effets des NPs de fer sur les cellules SH-SY5Y	137
1. Introduction.....	137
a) Résumé des principaux résultats.....	138
b) Conclusion	138
c) Article I.....	139
B. Etudes <i>in vivo</i>	191
1. Introduction.....	191
2. Effets de l'administration intranasale des NPs de fer	191
a) Résumé des principaux résultats.....	192
b) Conclusion	192
c) Article II.....	193
3. Effets de l'administration intraveineuse des NPs de fer	227
a) Résumé des principaux résultats.....	227

b) Conclusion	227
c) Article III.....	228
4. Effets de l'administration orale des NPs de fer	257
a) Principaux résultats et discussion	257
b) Conclusion	257
c) Article IV	258
5. Etude protéomique des extraits protéiques du foie, poumon et cerveau suite à l'exposition intranasale	293
VI. DISCUSSION GENERALE	305
1. Cytotoxicité et génotoxicité des Nanoparticules de Fer	305
2. Analyse protéomique sur les cellules SH-SY5Y	309
3. Effets physiopathologiques sur le rat	312
a) Effet sur la santé générale	312
b) Effet sur le cerveau et la cognition	312
c) Effet sur la formule sanguine et l'inflammation	315
d) Effet sur le foie et les enzymes hépatiques	316
e) Effet sur les poumons	317
4. Analyse protéomique sur les organes de rat	318
VII. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	323
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	329
IX. ANNEXES.....	348
A. ANNEXE 1 : Tableaux des protéines dérégulées suite à l'exposition des cellules aux Nanoparticules de fer (de l'article I).....	350
B. ANNEXE 2 : Tableaux des protéines dérégulées suite à l'exposition intranasale des rats Wistar aux Nanoparticules de fer (dans le cerveau, le foie et le poumon)	358
C. ANNEXE 3 : Posters.....	374

Table des figures

Figure 1: L'échelle nanométrique	39
Figure 2 : Evolution du nombre de publications sur les nano entre 2010 et 2017	40
Figure 3: Augmentation de la surface avec diminution de la taille	45
Figure 4 : Domaines d'application des NPs	46
Figure 5 : Classement des 10 meilleures entreprises cosmétiques en termes de nombre de brevets liés aux nanotechnologies [7].....	47
Figure 6 : Principaux nanomatériaux utilisés en cosmétique [7].....	47
Figure 7 : Voies d'exposition aux NPs [9].....	48
Figure 8 : Voies de translocation potentielles des NPs inhalées [12].....	49
Figure 9 : Les trois méthodes de synthèse des NPs d'oxyde de fer et les techniques utilisées [32].....	54
Figure 10 : Représentation schématique de la méthode sol-gel [34].....	56
Figure 11 : Différents types de revêtements de surface des nanoparticules: (a) matériaux inorganiques (b) molécules organiques à longue chaîne (c) polymères organiques [36]	57
Figure 12 : Applications des NPs d'oxyde de fer dans divers domaines [37].....	58
Figure 13 : Applications des NPs d'oxyde de fer en biomédecine [43].....	61
Figure 14 : Evolution du nombre de publications sur "nanoparticle toxic"	63
Figure 15 : Voies d'internalisation des nanoparticules selon la taille [49].....	65
Figure 16 : Charges de surface et potentiel zeta (D'après SDTech Nano).....	66
Figure 17 : Agglomération et Agrégation des nanoparticules	67
Figure 18 : Différents destins et effets des nanotiges d'or (Au NRs) dans les cellules cancéreuses (A), les cellules normales et les cellules souches (B) en raison des voies distinctes pour le trafic cellulaire [84]	75
Figure 19 : Principaux paramètres étudiés par des études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> [86].....	79
Figure 20 : Principe du test MTT	80
Figure 21 : Causes et effets du stress oxydatif [104].....	85
Figure 22 : Accumulation cytoplasmique du fer après coloration de Perl's.....	90
Figure 23 : Schéma représentatif des « omiques » [128]	93
Figure 24 : les approches protéomiques “Top-down” et “Bottom-up” [148].....	98
Figure 25 : L' isoélectrofocalisation OFF-GEL [157].....	100
Figure 26 : Principe général de la MS/MS	101
Figure 27 : Spectre MS et MS/MS obtenus.....	102
Figure 28 : Structure schématique du tag iTRAQ 4-plex.....	105
Figure 29 : Aperçu global de la méthode de marquage iTRAQ.....	105
Figure 30 : Aperçu des données PANTHER [168]	108
Figure 31 : Le labyrinthe en croix surélevé.....	124
Figure 32 : Un rat dans le dispositif de l'« Open field» (D'après Open Science).....	125
Figure 33 : La piscine de Morris (D'après https://de.wikipedia.org)	126
Figure 34 : Différents marquages réalisés des peptides du poumon, foie et cerveau	294

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des nanomatériaux en familles	41
Tableau 2 : Somme des quantités produites (P) et importées (I) pour chacune des familles de substances à l'état nanoparticulaire en France en 2017.....	42
Tableau 3 : Catégories de substances produites et/ou importées en quantités supérieures à 100 t (tonnes) en France en 2017	43
Tableau 4 : Les différences de propriétés dans l'adsorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion entre les nanoparticules et les petites molécules [20]	52
Tableau 5 : Comparaison des avantages et inconvénients des méthodes de synthèse des NPs d'oxyde de fer [32]	55
Tableau 6 : Quelques propriétés de différents matériaux organiques de revêtement de surface (avec modification d'après Umut 2013) [36].....	58
Tableau 7 : Médicaments à base des NPs d'oxyde de fer approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et/ou la Commission européenne (CE). Sinerem a été retirée par Guerbet (partenaire européen d'AMAG Pharma) en 2007. Le Ferumoxide a été abandonné par AMAG Pharma en 2008 et la production de Retrovist a été abandonnée en 2009 (D'après Cortajarena et al. 2014) [4]	60
Tableau 8: Solutions pour dessalage C18 spin column 30 µg (89873 – ThermoScientific)	130
Tableau 9 : Les voies de signalisation liées au système nerveux identifiées suite à la dérégulation des protéines pulmonaires et cérébrales.....	295
Tableau 10 : Les voies de signalisation liées aux processus inflammatoires, immunitaires, apoptotiques et cancéreux identifiées suite à la dérégulation des protéines pulmonaires et cérébrales.....	295
Tableau 11 : Les processus biologiques dans lesquels les DEP sont impliquées au niveau du cerveau	296
Tableau 12 : Les processus biologiques dans lesquels les DEP sont impliquées au niveau du foie ...	297
Tableau 13 : Les processus biologiques dans lesquels les DEP sont impliquées au niveau du poumon	297
Tableau 14 : Exemples des protéines dérégulées au niveau du cerveau suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants	298
Tableau 15 : Exemples des protéines sur-exprimées au niveau du foie suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants	299
Tableau 16 : Exemples des protéines sous-exprimées au niveau du foie suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants	299
Tableau 17 : Exemples des protéines sous-exprimées au niveau du poumon suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants.....	300
Tableau 18 : Exemples des protéines sous-exprimées au niveau du poumon suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants.....	300

Table des abréviations

2DGE : Two dimensional differential gel electrophoresis
ACN : Acétonitrile
Ag : Argent
 Al_2O_3 : Oxyde d'aluminium
ALP : Phosphatase alcaline
ALT : Alanine aminotransferase
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail
AST : Aspartate aminotransférase
Au : Or
BCA : Acide bicinchoninique
BHE : Barrières hémato-encéphaliques
BioGRID : Biological General Repository for Interaction Datasets
BrdU : 5-bromo-2 désoxyuridine
CHCA : Cyno-4-hydroxy-cinnamique
CID : Collision Induced Dissociation
CLHP : chromatographie liquide à haute performance
CMR : Substances cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction
CuO : Oxyde de cuivre
DCF : Dichlorofluorescéine
DCFDA : 2',7'diacétate de dichlorofluorescéine
DLS : Dynamic Light Scattering
DRX : Diffraction des rayons X
DTT : Dithiothreitol
EDXS : Spectroscopie X à dispersion d'énergie
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA : European Medicines Agency
ESI : ElectroSpray Ionisation
F : Fraction
FACS : Fluorescence-activated cell sorting
FASP : Préparation d'échantillons assistée par un filtre
FDA : Food and Drug Administration
 Fe_2O_3 : Oxyde ferrique, oxyde de fer III
 Fe_3O_4 : Oxyde de fer (II,III), magnétite
FITC : Fluorescein isothiocyanate
Fpg : Formamidopyrimidine DNA- glycosylase
FSC : Forward Scatterd light
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem
GSH : Glutathion
H&E : Hématoxyline-éosine
 HNO_3 : Acide nitrique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography
 HPRD : Human Protein Reference Database
 ICAT : Isotope-Coded Affinity Tag
 ICP-AES : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy
 ICPL : Isotope-Coded Protein Label
 ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma induit
 ICP-OES : Optical Emission Spectrometry
 IN : injection intranasale
 IntAct : Molecular Interaction Database
 IONPs : Iron oxide nanoparticles
 IP : Iodure de propidium
 IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
 iTRAQ : isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
 IV : injection traveineuse
 KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
 LC : Liquid chromatography
 LDH : Lactate déshydrogénase
m/z : masse/charge
 MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
 MDCK : Madin-Darby Canine Kidney
 MEB : Microscopie électronique par balayage
 MET : Microscopie électronique en transmission
 MgO : Oxyde de magnésium
 MINT : Molecular INTeraction database
 MMP : Potentiel transmembranaire mitochondrial
 MMTS : Méthyl méthaneethiosulfonate
 MnO₂ : Dioxyde de manganèse
 MPIDB: Microbial Protein Interaction Database
 MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
 MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
 NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
 NIOSH : National institute of occupational safety and health (Institut national de la santé et de la sécurité au travail Américain)
 NMx : Nanomatériaux
 NP : Nanoparticule
 NPs : Nanoparticules
 PANTHER : Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships
 PBS : Phosphate buffered Saline
 PBT : Substances persistantes, bioaccumulables et toxiques
 PEG : Polyéthylèneglycol
 PEI : Polyéthylèneimine
 PiP : Potential intron Polymorphism
 PTM : Modifications post-traductionnelles
 PVA : Alcool polyvinylique

PVP : Polyvinylpyrrolidone
 REACh : Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
 RMN : Résonance magnétique nucléaire
 ROS : Reactive Oxygen Species
 RP-CLHP : Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse ()
 RPE : résonance paramagnétique électronique
 S/N : Signal/Noise
 SCX : Strong Cation Exchange
 SDS : Dodécylsulfate de sodium
 SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide
 SiO₂ : Dioxyde de silice
 SP-ICP-MS : Single Particle-Induced Coupled Plasma-Mass Spectroscopy
 SSC : Side Scattered light
 STEM : microscopie électronique en transmission par balayage
 SVF : Sérum de veau fœtal
 TA : Température ambiante
 TEAB : Tetraethylammonium tetrahydroborate
 TEM : Transmission Electron Microscopy
 TEMED : Tetramethylethylenediamine
 TFA : Acide trifluoroacétique
 TiO₂ : Dioxyde de Titane
 TMT : Tandem Mass Tag
 TOF : Time of Flight
 Tunel : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)
 UV : Ultra-violet
 vPvB : Substances très persistantes et très bioaccumulables
 XPS : Spectroscopie photoélectronique par rayons X ou X-ray Photoelectron Spectroscopy
 XRD : X-Ray Diffraction
 XRF fluorescence par rayons X
 ZnO : Oxyde de zinc
 α- Fe₂O₃ : Hématite
 γ- Fe₂O₃ : Maghémite

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Les nanosciences et les nanotechnologies constituent une révolution scientifique apparue à partir des années soixante. Le « Nanomonde » regroupe tout objet de taille nanométrique doté de propriétés physicochimiques intéressantes pouvant être utilisé dans divers domaines, notamment industriel alimentaire, cosmétique ou électronique, environnemental et biomédical. Les Nanomatériaux (NMx) ou Nanoparticules (NPs) métalliques sont les plus utilisées et présentent le plus d'intérêt en application, comme en recherche scientifique. L'utilisation des NPs dépend essentiellement de leurs propriétés, en particulier leur composition. Ainsi, certains types, comme les NPs de dioxyde de titane TiO_2 et les NPs d'oxyde de zinc ZnO sont utilisées dans les crèmes solaires, grâce à leurs propriétés d'absorption des UVs. Les NPs d'oxyde de fer (Fe_2O_3 et Fe_3O_4) sont utilisées dans plusieurs champs d'application, mais principalement dans le domaine biomédical grâce à leurs propriétés magnétiques.

Dès leur émergence, les nanotechnologies ont toujours posé de nombreuses questions sur leurs risques, plus particulièrement ceux des NPs. En effet, dû à leur grande réactivité, les NPs présentent un risque potentiel sur la santé de l'Homme. Cependant, jusqu'à l'heure actuelle, et malgré des nombreuses investigations réalisées par les chercheurs, les mécanismes par lesquels les NPs peuvent interagir dans l'organisme ne sont pas complètement élucidés, ce qui est à l'origine de la difficulté de l'évaluation du risque « nano ».

Non seulement l'Homme peut être impacté par les nanotechnologies, mais l'environnement aussi. En effet, les NPs d'origine naturelle ou manufacturées sont relâchées dans l'environnement et peuvent souiller les sols et les eaux, et ainsi entrer dans la chaîne alimentaire des animaux qui se poursuit jusqu'à l'Homme. Les connaissances acquises sur le risque environnemental ne sont pas assez satisfaisantes. L'insuffisance de résultats de recherches en nanotoxicologie, même si ce phénomène a tendance à évoluer, ne nous offre actuellement pas toutes les garanties pour l'utilisation de ces objets en toute sécurité. Il est donc nécessaire de déterminer d'une façon précise et scientifique le risque toxique des produits « nano », dont leur présence sur le marché mondial augmente d'une année à l'autre.

En recherche scientifique, plusieurs études ont été réalisées pour étudier les effets des NMx, appelées études nanotoxicologiques. Elles peuvent être répertoriées en deux catégories : les études *in vitro* et les études *in vivo*. Ces études sont très variées sur de nombreux points, tels

que le grand nombre de modèles utilisés, les voies et les temps d'exposition, les tests d'exploration réalisés ou encore les types de résultats obtenus. Dans les deux cas, le choix du modèle d'étude dépend du type des NPs, de la nature d'exposition et de l'effet recherché sur les cibles. Les études *in vitro*, comme celles *in vivo* donnent des résultats qualitatifs ou quantitatifs selon le plan expérimental de l'étude. Cependant, les mécanismes moléculaires et les biomarqueurs potentiels liés à l'exposition aux NPs ne sont pas totalement élucidés.

Plusieurs produits et médicaments dans le marché mondial contiennent des ingrédients « nano », principalement des NPs métalliques. Celles-ci et d'après plusieurs études de recherche ont la capacité de traverser les barrières de la peau et les membranes biologiques pour arriver au niveau des organes vitaux, notamment le cerveau. De même, plusieurs effets délétères ont été rapportés, tels que le syndrome inflammatoire, le stress oxydatif, les dommages à l'ADN ou encore les perturbations cognitives. Delà, on trouve qu'il est nécessaire d'évaluer d'une façon précise les effets potentiels des NPs de fer à l'échelle phénotypique et moléculaire.

Ainsi, dans notre présent travail, nous nous sommes proposés d'apporter plus d'informations et de répondre aux questions concernant l'éventuel impact toxique des NPs, plus précisément des NPs de fer, sur deux types d'organismes : les cellules tumorales de neuroblastome (étude *in vitro*) et les rats (études *in vivo*). En effet, les NPs de fer sont utilisées en biomédecine dans le traitement et le diagnostic du cancer et sont administrées par voie intraveineuse ou orale comme médicaments.

Pour se faire, nous avons choisi pour l'étude « *in vitro* » d'évaluer la toxicité des NPs de fer sur la lignée cellulaire de neuroblastome « SH-SY5Y », par combinaison de méthodes de cytotoxicité et de protéomique. Pour l'étude *in vivo*, nous avons choisi le rat Wistar comme modèle et combiner des méthodes d'exploration pathophysiologique avec la protéomique. En effet, ces dernières années, les approches « omiques » ont beaucoup été utilisées en nanotoxicologie, en particulier la protéomique aboutissant même à créer un nouveau terme scientifique, la « nanotoxicoprotéomique ».

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Les nanotechnologies

1. Définitions

Les nanotechnologies sont définies comme étant la science qui étudie la fabrication et la manipulation de structures, dispositifs et systèmes matériels de dimensions nanométriques. Ces nanomatériaux peuvent être d'origine naturelle, anthropique non-intentionnelle ou intentionnelle (manufacturés).

Les nanotechnologies sont basées sur la capacité de contrôler les structures à l'échelle atomique. Elles désignent les manipulations de la matière aux échelles atomiques et nanométriques (Figure 1) dans la gamme des 1–100 nanomètres (nm), pour créer et utiliser des matériaux, des outils et des systèmes possédant des propriétés et des fonctions inédites [1].

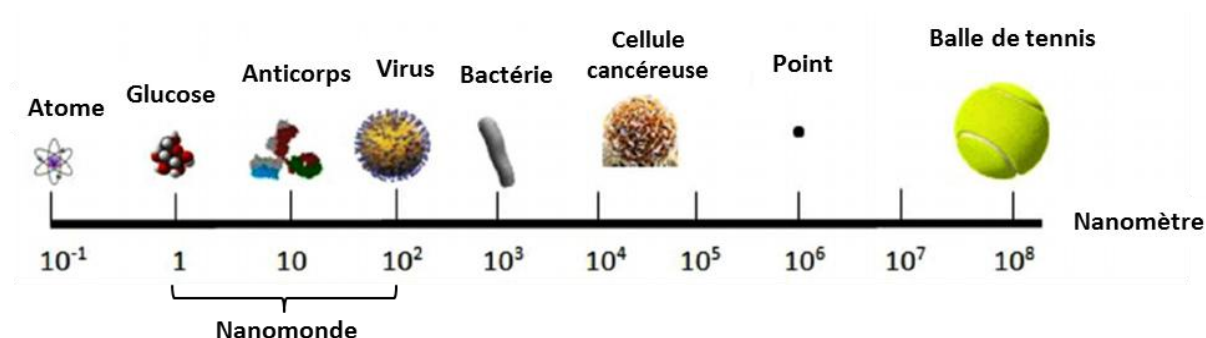


Figure 1: L'échelle nanométrique

Ces dernières années, les recherches en nanotechnologies se sont multipliées. Le graphique ci-dessous (Figure 2) montre l'évolution de façon régulière du nombre de publications sorties entre 2010 et 2017 en cherchant sur la base de données « Pubmed » (dernière mise à jour le 28 Mars 2018) les mots « nano » et « nanotechnology ». En effet, au bout de sept ans, le nombre des publications s'est multiplié par deux.

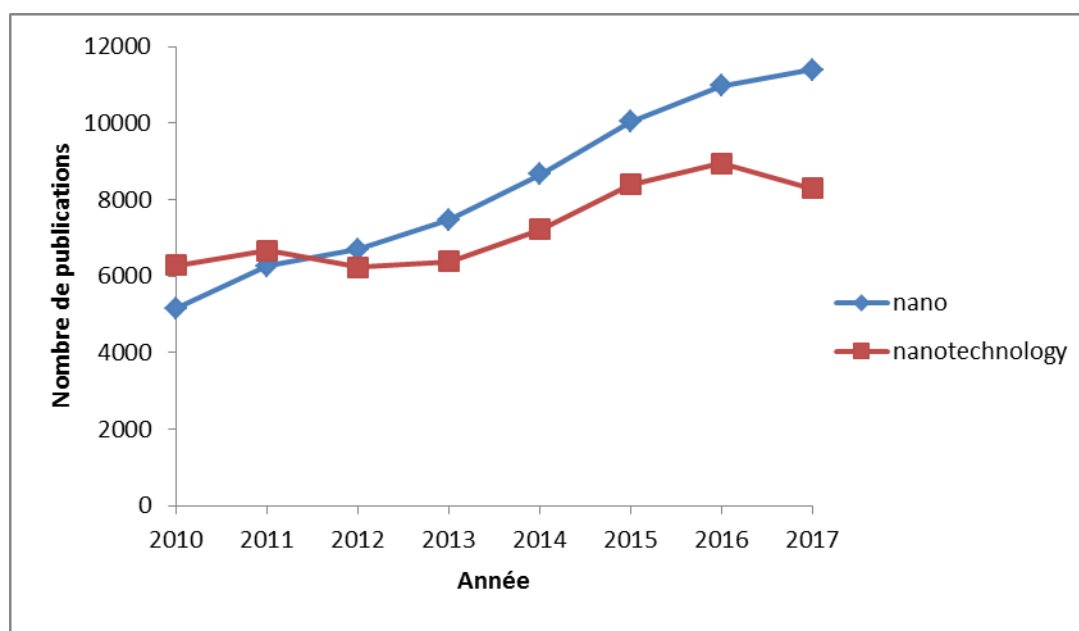


Figure 2 : Evolution du nombre de publications sur les nano entre 2010 et 2017

2. Réglementation

Les nanotechnologies soulèvent des interrogations sur leur impact sur la santé et l'environnement. Pour cela leur utilisation est régie par des réglementations à l'échelle nationale et européenne.

a) En France

En France, il existe une réglementation rigoureuse des nanomatériaux grâce aux différents lois et textes, tels que la loi n° 2010-788 du 12 juillet 2010 qui porte sur l'engagement national pour l'environnement ayant pour objectifs de mieux connaître les nanomatériaux et leurs usages pour le professionnel et le public, ainsi que leur traçabilité et la collecte l'exploitation de ces connaissances pour une meilleure évaluation des risques. Cette loi a introduit des articles dans le code de l'environnement. Les articles L. 523-1 et L. 523-2 prévoient que les substances à l'état nanoparticulaire font l'objet d'une déclaration annuelle et que les entités concernées transmettent, sur demande, des informations complémentaires relatives aux dangers et aux expositions auxquelles ces substances sont susceptibles de conduire. L'article L 523-1 prévoit également qu'une partie des informations déclarées sont rendues publiques. Deux textes d'application viennent compléter ce dispositif : - le décret n° 2012-232 du 17 février 2012 et l'arrêté du 6 août 2012.

La gestion des déclarations et des données qu'elles contiennent se fait par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (ANSES) (décret n°2012-232 du 17 février 2012). Depuis le 1^{er} Janvier 2013, les déclarations des substances à l'état nanoparticulaire sont déposées sur le registre national R-Nano. Le site Internet dédié et sécurisé « R-Nano », <http://www.r-nano.fr/>, est sous le contrôle de l'ANSES. Chaque année, le projet R-Nano publie un rapport annuel. Pour faciliter leur tâche, les nanomatériaux sont classés en familles (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des nanomatériaux en familles

Code Famille	Nom Famille
A	Nanomatériaux inorganiques
B	Métaux et alliages métalliques
C	Nanomatériaux carbonés
D	Nanopolymères
E	Silicates et argiles
F	Autres : nanomatériaux organiques, organométalliques et mixtes organique - inorganique

Les tableaux 2 et 3 illustrent les familles des nanomatériaux déclarés en France en 2017 ainsi que les catégories de substances produites et/ou importées en quantités supérieures à 100 tonnes en 2017.

Tableau 2 : Somme des quantités produites (P) et importées (I) pour chacune des familles de substances à l'état nanoparticulaire en France en 2017

Famille	Quantités P+I de la famille en bande de tonnage de la somme des quantités produites et importées sur le territoire national en 2017
A : Nanomatériaux inorganiques	>100 000 t
B : Métaux et alliages métalliques	1 à 100 kg
C : Nanomatériaux carbonés	>100 000 t
D : Nanopolymères	1 000 à 10 000 t
E : Silicates et argiles	1 000 à 10 000 t
F : Autres : nanomatériaux organiques, organométalliques et mixtes organique - inorganique	1 000 à 10000 t
G : Autres	100 à 1 000 t

Tableau 3 : Catégories de substances produites et/ou importées en quantités supérieures à 100 t (tonnes) en France en 2017

Nom générique	Bande de tonnage 2017
Noir de carbone	> 10 000 t
Dioxyde de silicone	> 10 000 t
Carbonate de calcium	> 10 000 t
Dioxyde de titane	> 10 000 t
Boehmite (Al(OH) ₃)	– 10 000 t
Acide silicique, sel de magnésium	1 000 – 10 000 t
Copolymère de chlorure de Vinylidene	1 000 – 10 000 t
Oxyde d'aluminium	1 000 – 10 000 t
Mélange d'oxyde de cérium et de dioxyde de zirconium	1 000 – 10 000 t
Isostéarate d'oxyde de Fer	100 - 1 000 t
Texturants alimentaires	100 - 1 000 t
Acides alimentaires	100 - 1 000 t
Dioxyde de cérium	100 - 1 000 t
Oxyde d'hydroxyde de fer	100 - 1 000 t
Trioxyde de fer	100 - 1 000 t
Conservateurs alimentaires	100 - 1 000 t
Arôme alimentaires	100 - 1 000 t
Acide silicique, sel de sodium d'aluminium	100 - 1 000 t
Isostéarate d'oxyde de cérium et de fer	100 - 1 000 t

À l'échelle européenne qu'à l'échelle nationale, la présence de nanomatériaux dans un produit commercialisé est soumise à une obligation d'étiquetage pour tous produits sur le marché. Cette obligation est entrée en vigueur précisément le 11 juillet 2013 pour les cosmétiques, le

1er septembre 2013 pour les biocides et le 13 décembre 2014 pour les denrées alimentaires. L'obligation d'étiquetage des nanomatériaux dans l'alimentation est en effet imposée par le règlement n°1169/2011 du 25 octobre 2011 dit INCO, concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires. L'article 18, alinéa 3 de ce règlement prévoit en effet que « tous les ingrédients qui se présentent sous forme de nanomatériaux manufacturés sont indiqués clairement dans la liste des ingrédients. Le nom de l'ingrédient est suivi du mot "nano" entre crochets ». En France, le 5 mai 2017, un nouvel arrêté fixant les conditions d'étiquetage des nanomatériaux synthétisés dans les denrées alimentaires a été publié au Journal Officiel et disant : « Tous les ingrédients des denrées alimentaires qui se présentent sous forme de nanomatériaux manufacturés sont indiqués clairement dans la liste de composants. Le nom de composants est suivi du mot “ nano ” entre crochets ». En mai 2017, un nouveau décret n°2017-765 relatif à la mise à disposition des informations obtenues en application des articles L.523-1 et L.523-2 du code de l'environnement a permis d'inscrire les observatoires régionaux des déchets à la liste des organismes qui peuvent accéder à une partie des informations déclarées.

b) En Europe

Mis en vigueur depuis Décembre 2006, la directive REACH est le règlement de l'Union Européenne concernant l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. Il définit les règles de mise sur le marché et d'utilisation des substances chimiques importées ou produites en Europe, avec deux objectifs principaux : un haut niveau de protection de la santé et de l'environnement et une augmentation de la compétitivité et de l'innovation. Basé principalement sur la santé publique et la protection environnementale, l'objectif majeur de REACH est de limiter la circulation des substances les plus dangereuses, telles que les substances cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR), les substances persistantes, bioaccumulables et toxiques (PBT), ou bien les substances très persistantes et très bioaccumulables (vPvB). Ainsi, l'enregistrement des substances produites ou commercialisées et l'assurance que ces dernières n'ont pas d'effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement par les industriels fabricants ou les importateurs sont exigés par REACH. Les dossiers d'enregistrement doivent impérativement inclure toutes les données sur les dangers et les risques des substances chimiques enregistrées.

Cependant cette réglementation présentait des lacunes qui sont largement critiquées par de nombreux acteurs tels que le Parlement Européen, le Centre Commun de Recherche, l'Agence

Européenne des produits chimiques et aussi la société civile. Ils demandent d'inclure une définition claire des nanomatériaux, de réduire le seuil de déclaration (à 10 kilos au lieu d'une tonne), de garantir que les nanomatériaux soient considérés comme de nouvelles substances et être enregistrés sous une catégorie à part indépendamment des substances correspondantes à l'échelle micrométrique.

Ces dernières années, le progrès de la déclaration mise en œuvre en France a attiré l'attention de plusieurs autres pays européens. Le Danemark et la Belgique sont les premiers pays qui ont mis en œuvre des obligations similaires concernant la déclaration des nanomatériaux. Ces initiatives sont de plus en plus suivies par d'autres pays en Europe.

3. Les nanoparticules : caractéristiques et applications

La taille des particules jusqu'à 100 nm est à l'origine des changements dans les propriétés physiques et chimiques des matériaux comparés à ceux observés à plus grande échelle. Les propriétés innovantes des nanoparticules (NPs) sont principalement dues à l'augmentation du rapport surface/volume et à la prédominance des effets de la mécanique quantique [2]. Lorsque la taille d'une particule diminue, le nombre de particules par gramme de matière augmente considérablement. Ainsi, le nombre d'atomes en surface de chaque particule augmente. Les nanoparticules ont donc un rapport surface/volume et un rapport surface/masse beaucoup plus élevés que des particules plus grosses de taille micrométrique. De nombreuses réactions chimiques se déroulent en surface, la réactivité chimique est donc beaucoup plus élevée dans le cas de NPs comparativement à une masse équivalente de particules non nanométriques [3] (Figure 3).

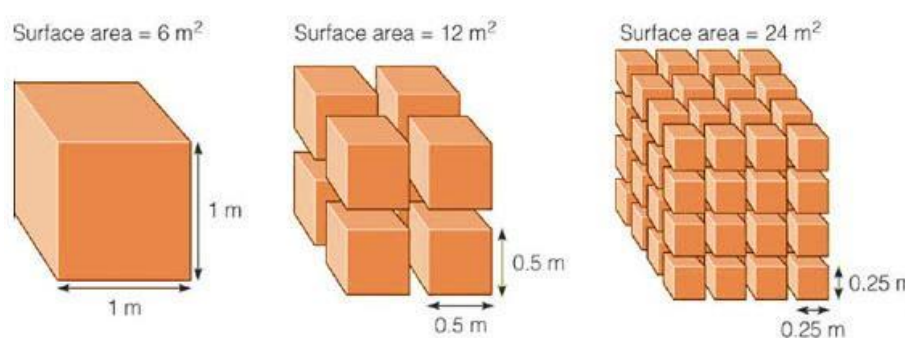


Figure 3: Augmentation de la surface avec diminution de la taille
(D'après Nanoscale-why size matter Niniti.com)

Il existe plusieurs types de NPs dont les plus documentées en littérature sont celles de composition métallique telles que TiO_2 , ZnO , MgO , CuO , Al_2O_3 , MnO_2 , Fe_3O_4 et Fe_2O_3 . Non seulement la composition des nanoparticules diffère, mais leur structure peut être aussi hétérogène. Ces nanoparticules peuvent être modifiées au niveau de leur surface (coating), ce qui modifie leurs propriétés physico-chimiques et ouvre les portes à leur utilisation dans de nombreuses applications [4]. La production croissante des NPs et leur utilisation de plus en plus fréquente dans l'industrie, mais aussi leur présence dans les objets et produits que nous utilisons tous les jours, font d'eux un sujet de recherche toujours en progression et très important pour connaître les risques et améliorer leur sécurité.

Grâce à leurs propriétés chimiques, physiques, électriques, magnétiques ou encore fluorescentes, les NPs sont utilisées dans divers champs d'application: cosmétique, biomédical, agriculture, alimentaire, environnemental, industriel, etc. [5] (Figure 4).

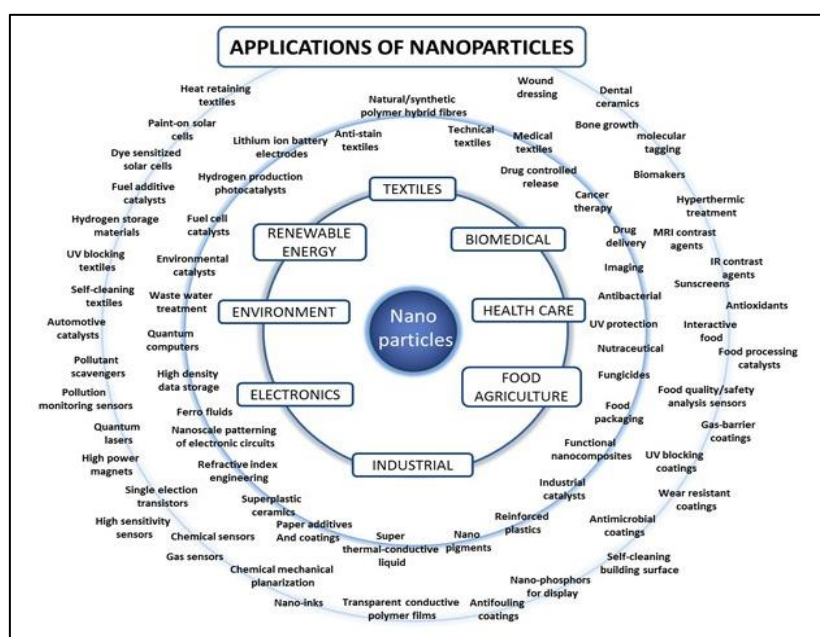


Figure 4 : Domaines d'application des NPs
(D'après <http://www.enteknomaterials.com>)

Les NPs sont largement utilisées dans les domaines biomédicaux y compris l'immunologie, la cardiologie, l'endocrinologie, l'ophtalmologie, l'oncologie, la pneumologie, etc. En outre, elles sont très utilisées dans des domaines spécialisés comme le ciblage d'organes comme le cerveau, le ciblage des tumeurs (biocapteurs ou agents de diagnostic/ traitement) et la vectorisation de médicaments ou de gènes. La nanotechnologie fournit également des systèmes, des dispositifs et des matériaux importants pour de meilleures applications pharmaceutiques [3,4]. En industrie, les NPs sont souvent utilisées comme détecteurs

chimiques, composants importants dans la fabrication des véhicules, ou agent anti-odeur dans les habits. En électronique, les NPs sont largement utilisées pour remplacer les diodes et les transistors grâce à leur sensibilité. Les applications des NPs pour l'environnement se résument principalement dans le traitement et la purification des eaux usées [6]. Les NPs sont très présentes aussi dans les produits cosmétiques et d'usage quotidien [7]. Elles offrent une meilleure protection UV, des effets durables, une pénétration plus profonde de la peau, une couleur et une qualité de finition accrues. Il a été rapporté à partir de différentes investigations que presque toutes les grandes marques internationales cosmétiques utilisent les nanotechnologies dans leurs différents produits et dépensent énormément pour obtenir des brevets liés aux nanotechnologies (Figure 5). Parmi ces produits : les écrans solaires, les crèmes de soin, les dentifrices, etc.

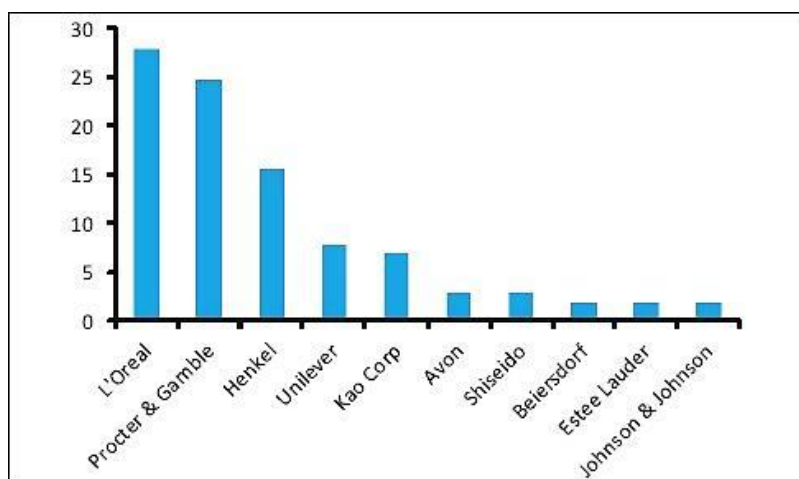


Figure 5 : Classement des 10 meilleures entreprises cosmétiques en termes de brevets liés aux nanotechnologies [7]

Les nanomatériaux les plus utilisées en cosmétique sont illustrées dans la figure 6. Les NPs d'argent sont les premières grâce à leur excellente capacité de pénétrer la peau.

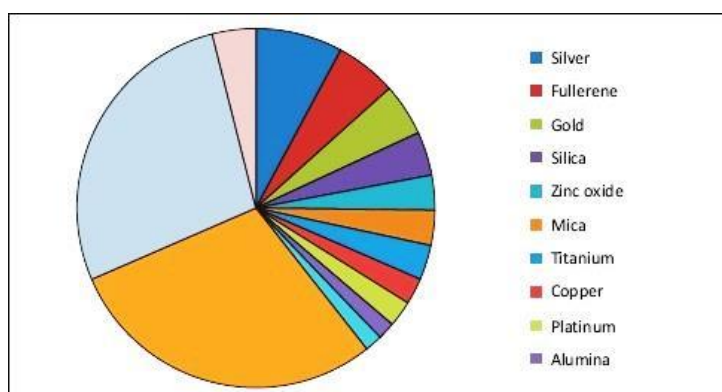


Figure 6 : Principaux nanomatériaux utilisés en cosmétique [7]

a) Exposition aux nanoparticules

Les travailleurs des industries utilisant les nanotechnologies sont les premières personnes exposées aux NMx. Ils peuvent être accidentellement en contact avec ces NMx lors de leur production ou de produits les contenant, ainsi que lors de l'utilisation, de l'élimination ou du recyclage de ces produits. Les personnes qui travaillent dans les unités de recherche sur ces nanotechnologies peuvent être aussi exposées [8]. Cependant, selon l'Agence Européenne pour la sécurité et la santé au travail, il n'y pas de données suffisantes sur le nombre de travailleurs exposés aux NMx sur le lieu de travail ou les effets sur leur état de santé d'une telle exposition. En outre, en vie quotidienne, l'Homme pourrait être exposé aux NMx et précisément aux NPs étant donné qu'elles sont présentes dans de nombreux produits de consommation. Avec l'augmentation de la production et de la consommation des NPs, les utilisateurs ont de plus en plus de risque d'être exposés à ce genre de particules.

Les NPs peuvent se retrouver dans l'air, dans l'eau de consommation, dans l'alimentation, dans les produits d'usage quotidien, bref partout. Elles peuvent être inhalées, ingérées ou encore absorbées par le corps à travers la peau et les muqueuses [9] (Figure7).

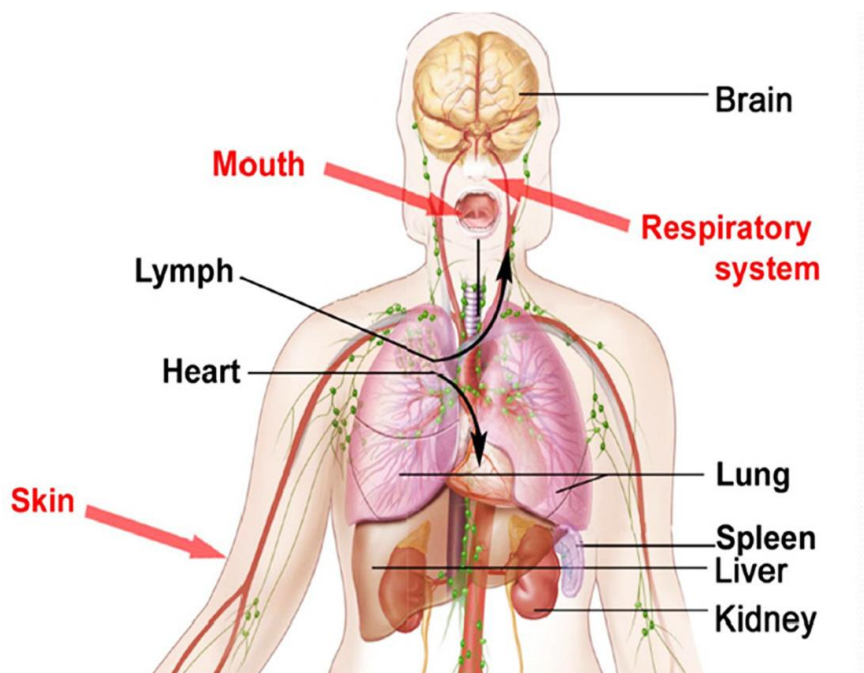


Figure 7 : Voies d'exposition aux NPs [9]

-Inhalation : C'est la voie d'exposition la plus commune des NPs se trouvant dans l'air selon l'Institut national de la santé et de la sécurité au travail Américain (NIOSH – National institute of occupational safety and health). Les travailleurs peuvent inhaler des NPs lors des processus de fabrication, essentiellement en absence d'applications des dispositifs de sécurité spécifiques des nano, tandis que les consommateurs peuvent inhaler des NPs en utilisant les produits quotidiens en contenant, comme les vaporisateurs [10]. Plusieurs études ont montré que certaines NPs inhalées peuvent franchir les différentes barrières de protection des organismes vivants et se déplacer à travers le tractus pulmonaire (Figure 8) [11]. Ainsi, par dissémination systémique sanguine ou lymphatique, elles peuvent s'accumuler dans les différents organes et à certains sites spécifiques. Elles peuvent aussi circuler le long des nerfs olfactifs et pénétrer directement dans le cerveau, tout comme elles réussissent à franchir les barrières cellulaires [11].

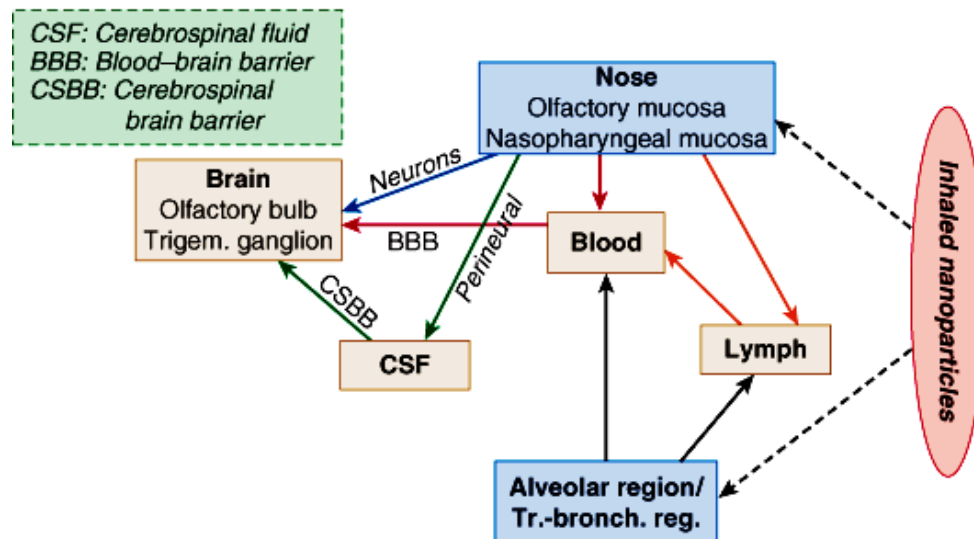


Figure 8 : Voies de translocation potentielles des NPs inhalées [12]

-Ingestion : Le tractus gastro-intestinal représente une voie d'entrée possible pour plusieurs types de NPs. L'ingestion peut se faire directement d'une manière intentionnelle en consommant des aliments contenant des NPs par exemple, ou intentionnellement par transfert des NPs de la main à la bouche ou encore par dissolution de nanoparticules à partir de récipients alimentaires ou par ingestion secondaire de particules inhalées [13,14]. De plus, l'augmentation de l'utilisation des NPs peut entraîner une contamination accrue de l'environnement et une ingestion involontaire par l'intermédiaire de l'eau, des animaux

destinés à l'alimentation ou du poisson. Les NPs ingérées peuvent se disséminer dans le corps et s'accumuler aux niveaux des organes cibles ou être excrétées pour élimination du corps.

-Pénétration de la peau : Lorsque les produits cosmétiques pour les soins de la peau contiennent des NPs, celles-ci peuvent pénétrer la peau. Il a été rapporté que la pénétration dermique des NPs dépend principalement de leur composition chimique (métalliques et non métalliques) et de leur taille [14]. En effet les deux types, métalliques et non métalliques, ont une taille de NPs secondaire qui est donnée après interaction dans les milieux physiologiques, et permet une pénétration dermique taille-dépendante : les NPs de taille inférieure ou égale à 4 nm peuvent pénétrer la peau intacte, les NPs de taille entre 4 et 20 nm peuvent potentiellement pénétrer la peau intacte et endommagée. Les NPs mesurant entre 21 et 45 nm peuvent pénétrer seulement la peau endommagée. Cependant les NPs les plus grosses de taille supérieure à 45nm ne pénètrent aucun type de peau [15]. L'accès des NPs du derme à la circulation se fait par passage des NPs dans le système lymphatique. Ceci mène au dépôt des NPs au niveau des ganglions lymphatiques, éléments essentiels du système immunitaire. Une fois dans le système lymphatique, les NPs peuvent regagner aussi la circulation sanguine. Plusieurs études ont exploré l'absorption des différents types de NPs telles que les Ag-NPs, TiO₂- NPs, Au-NPs par la peau [15–19].

b) Métabolisme, dégradation, accumulation et excrétion

Dans le corps, les NPs absorbées peuvent subir plusieurs réactions de métabolisation, dégradation, accumulation ou excrétion en vue de leur élimination (Tableau 4) [20].

Concernant le métabolisme et la dégradation des NPs, peu d'études ont porté sur ces processus dans les cellules. Ce qui est le plus connu est le métabolisme des éléments, comme les métaux à l'état microparticulaire et non pas à l'état nanoparticulaire. Les NPs sont connues pour résister aux mécanismes de métabolisation et de dégradation. Il a été rapporté que la dégradation d'un type de nanotubes de carbone se fait par une catalyse enzymatique naturelle par la myéloperoxydase, qui est une enzyme abondante des neutrophiles [21]. Un autre mécanisme est celui des NPs de fer. La dégradation par les lysosomes est considérée comme le principal mécanisme métabolique intracellulaire impliqué dans la dégradation des NPs de fer. Le fer libéré est stocké dans les réserves du corps à l'aide de protéines régulatrices du fer, la ferritine et l'hémosidérine. De plus, Arbab *et al.*, ont rapporté que dans l'environnement cellulaire, certains des endosomes contenant le complexe ferumoxyde-agent de transfection

fusionnaient avec les lysosomes, entraînant leur dissolution rapide à faible pH, exposant le noyau de fer aux chélates, libérant ainsi le Fe (III) libre soluble dans le cytoplasme par transport cationique divalent [22]. Cependant, les NPs de fer peuvent subir aussi des biotransformations et peuvent être stockées au niveau des lysosomes intracellulaires [23]. Les propriétés physicochimiques influencent beaucoup le sort des NPs dans le corps. Dans ce cas, il a été démontré que pour les NPs magnétiques d'un diamètre inférieur à 40 nm, la nature de revêtement est très importante pour déterminer leur biodistribution ainsi que la demi-vie dans le sang. Il existe deux voies principales pour l'excrétion et la clairance des NPs: la filtration rénale, avec excrétion dans l'urine, et le processus hépatobiliaire, avec excrétion dans la bile [14]. Les NPs de taille inférieure à 5-6 nm sont éliminées rapidement du corps par excrétion urinaire. L'excrétion des NPs de fer administrées par voie veineuse se fait aussi par l'intermédiaire de la filtration rénale, parce que cette voie implique un catabolisme intracellulaire minimal, réduisant ainsi la toxicité associée. D'autres NMx comme les nanotubes de carbone et les NPs d'or, administrés par voie intraveineuse, sont aussi éliminés par les systèmes rénaux et hépatobiliaires. La rapidité du processus dépend essentiellement de la taille. Certaines cellules jouent aussi un rôle important dans l'excrétion des NPs telles que les cellules de Kuppfer, les macrophages et les neutrophiles. En effet, dans le système réticulo-endothélial, les cellules de Kuppfer hépatiques ont la capacité d'absorber les NPs. Il est connu que le foie est l'un des organes cibles qui accumule le plus les NPs et ainsi il représente une voie d'excrétion importante. Les macrophages et les neutrophiles interviennent aussi dans l'internalisation et la biodistribution des NPs via l'activation de la réponse immunitaire, ainsi cette dernière pourrait affecter significativement la clairance [24]. En effet, une fois absorbées, les NPs peuvent être distribuées, métabolisées et excrétées différemment de leur taille à l'échelle micrométrique (petites molécules).

Tableau 4 : Les différences de propriétés dans l'adsorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion entre les nanoparticules et les petites molécules [20]

	Absorption	Distribution	Métabolisme	Excrétion
	Porte d'entrée	Distribution Interaction avec le plasma Passage à travers les membrane	Médiateur Changement de l'activité biologique Localisation	Voie majeur Efficacité de l'excrétion
Nanoparticules	Orale, respiratoire, cutanée, injection, à travers la membrane alvéolaire, la paroi intestinale...	-Circulation sanguine, - circulation lymphatique, - protéines corona sur la surface des NPs, -endocytose, à travers la membrane par phagocytose...	-Peroxydases, microenvironnement physiologique, diminution de la toxicité, vectorisation ciblée des médicaments, -Principalement dans les endosomes intracellulaires des macrophages dans les organes du système Réticuloendothélial.	-Urine et excréments -Plus difficile
Petites molécules		-Complexe protéine-médicament -Diffusion à travers les pores membranaires et la bicouche lipidique, - endocytose	-Enzymes de la phase I et II, -microenvironnement physiologique, -Augmentation ou diminution de la toxicité -Principalement dans le foie	-Urine et excréments -Plus facile

4. Les nanoparticules d'oxyde de fer

La nature est très riche en fer et ses composés sont facilement synthétisés au laboratoire. Les composés de fer sont présents dans les trois couches de la biosphère : l'hydrosphère, la lithosphère et l'atmosphère. Le fer est un élément biogène, présent dans tous les organismes vivants, mais certains composés de fer peuvent causer des effets nocifs pour les humains, les animaux et l'environnement [25,26]. Dans l'exposition professionnelle, telle que celle des ouvriers de fonderies et les mineurs, le fer et ses oxydes sont connus pour induire une sidérose bénigne (une pneumoconiose causée par l'exposition prolongée à des particules de fer ou d'oxydes de fer FeO ou Fe₂O₃). Mais les oxydes de fer ont été aussi identifiés comme un véhicule pour le transport de fortes concentrations de substances cancérogènes et de dioxyde de soufre profondément dans les poumons, ce qui renforce l'activité de ces polluants [25]. Les oxydes de fer causent également des dommages matériels par coloration. Les analyses des échantillons de l'air urbain ont montré que les sources probables de composés de fer sont l'industrie du fer et de l'acier [25], ainsi que les transports urbains comme les chemins de fer souterrains [27,28].

Il existe trois types de NPs d'oxyde de fer : γ -Fe₂O₃ (maghémite), Fe₃O₄ (magnétite) ou α -Fe₂O₃ (hématite). Les plus étudiés et documentés en littérature sont les NPs de γ -Fe₂O₃ et de Fe₃O₄. Les particules de γ -Fe₂O₃ dont le diamètre est inférieur à 20 nm sont dites superparamagnétiques.

a) Méthodes de synthèse des nanoparticules de fer

Dans les applications macroscopiques du fer, sa réactivité est considérée comme importante, mais celle-ci pose une préoccupation dominante quand le métal est à l'échelle nanométrique. L'extrême réactivité du fer cause une vraie difficulté pour les études et pour les applications. Grâce à ses puissantes propriétés magnétiques et catalytiques, le fer a attiré l'attention des scientifiques pour ce composé [29]. En effet, les NPs d'oxyde de fer peuvent être facilement et rapidement induits en résonance magnétique par auto-échauffement, en appliquant un champ magnétique externe, et également en se déplaçant le long du champ d'attraction. Le comportement des NPs d'oxyde de fer est largement affecté par leur méthode de synthèse, leur taille, la forme, leur cristallisation, et aussi leur qualité. La synthèse de NPs d'oxyde de fer bien cristallisées et de taille bien contrôlée offre de meilleures perspectives pour les applications de ces NPs [30].

Les propriétés des nanomatériaux sont également impactées par leurs formes, y compris la catalyse. Il existe plusieurs types de procédés pour la synthèse des NPs d'oxyde de fer : des procédés mécano-chimiques (décharge par arc d'ablation laser, combustion, électrodéposition et pyrolyse) et chimiques (synthèse sol-gel, méthodes de synthèse assistée, micelle inverse, hydrothermale, coprécipitation, etc.). Ainsi, différentes formes de NPs d'oxydes de fer peuvent être ainsi synthétisées (nanotiges, sphères poreuses, nanocubes, cubes déformés, etc.) en utilisant des protocoles synthétiques plus ou moins identiques, avec un petit changement des sels de fer précurseurs de la synthèse [31,32]. Faciles à mettre en œuvre, économiques et avec un contrôle de la forme de manière continue, sont les principaux avantages de ces protocoles. Outre la synthèse, la modification de surface de l'oxyde de fer est très importante. Afin d'éviter la corrosion chimique induite par l'instabilité, les physiciens ou les chimistes ont tendance à modifier leur surface. Certains considèrent que la modification de surface est l'étape clé de la post-synthèse pour produire des NPs de fer qui sont à la fois biocompatibles et stables [32]. D'autres modifications peuvent également être appliquées et peuvent changer les propriétés chimiques et physiques des NPs d'oxyde de fer. Pour la synthèse des NPs

d'oxyde de fer, les chercheurs doivent utiliser la méthode qui est le plus adaptée à leur attente. Des NPs d'oxyde de fer peuvent être préparées par diverses méthodes (Figure 9), telles que les méthodes chimiques par voie humide, les méthodes physiques ou les méthodes biologiques.

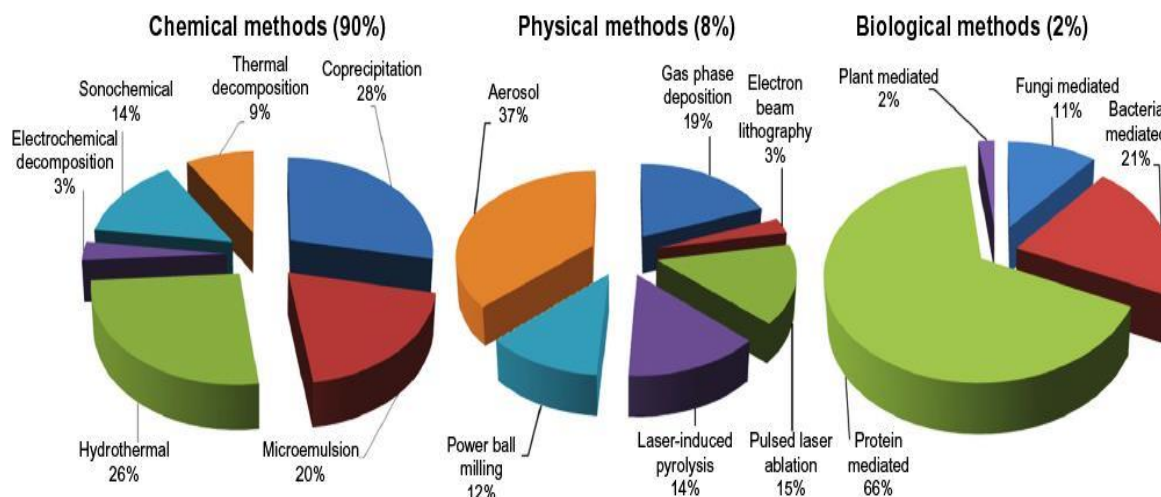


Figure 9 : Les trois méthodes de synthèse des NPs d'oxyde de fer et les techniques utilisées [32]

Les méthodes chimiques par voie humide présentent plusieurs avantages tels que la simplicité et l'efficacité, avec un meilleur contrôle de la taille, la composition et la forme des NPs. Les oxydes de fer peuvent être synthétisés par coprécipitation des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} . Les propriétés des NPs de fer synthétisées par des méthodes chimiques dépendent du type de sel utilisé, du rapport Fe^{2+} et Fe^{3+} , du pH et de la force ionique. Les méthodes physiques sont des procédures élaborées et sont limitées par l'incapacité de contrôler la taille des particules dans la gamme nanométrique. Les méthodes biologiques utilisent des enzymes, de l'ADN, des biomembranes ou encore des microorganismes.

Bien que les méthodes physiques ont l'avantage d'être faciles à réaliser, il est difficile, avec ces méthodes, de contrôler la taille des NPs. Tandis que dans la méthode chimique, la taille de NPs peut être contrôlée avec un simple ajustement des conditions. Les avantages et inconvénients des différentes méthodes sont illustrés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Comparaison des avantages et inconvénients des méthodes de synthèse des NPs d'oxyde de fer [32]

Techniques		Product morphology	Advantages	Disadvantages
Physical	Deposition of gas phase	Spheres and irregular spheres	Easy to execute	Problematic in controlling the size of particle
	Electron beam lithography	Spheres and rods	Well-controlled interparticle spacing	Requires expensive and highly complex machines
Chemical	Sol-gel method	Spheres, irregular spheres, porous and nonporous spheres, or spindles	Aspect ratio, precisely controlled in size, and internal structure	High permeability, weak bonding, low wear resistance
	Oxidation	Irregular elongated and small spheres	Narrow size distribution and uniform size	Ferrite colloids of small size
	Chemical coprecipitation	Spheres	Simple and effective	Inappropriate for the synthesis of high untainted, precise stoichiometric phase
	Hydrothermal	Elongated, compact irregular spheres, and numerous shapes	Particle size and shapes are easily controllable	High pressure and reaction temperature
	Flow injection	Small rods, irregular spheres, sheets, or rhombic shapes	Homogeneity with high mixing with a accurate control of the procedure and good reproducibility	Under a laminar flow regime in a capillary reactor, it requires continuous or segmented mixing of reagents
	Electrochemical	Spherical NPs, nanorods, hexagonal nanocrystals, and facets	Controllable particle size	Inability to reproduce
	Aerosol/vapor phase	Mesoporous single crystals and small particles, octahedral cages	Large-scale products	Requires very high temperatures
	Sonochemical decomposition	Bipyramids, spheres, or truncated rods	Size distribution in narrow particle	Still, mechanism is not well understood
	Supercritical fluid method	Mesoporous single crystals, elongated irregular nanotubes	No organic solvents involved and efficient control of the particle size	Requires high temperatures and critical pressure
	Using nanoreactors	Spheres, hollow and spherical NPs	Likelihood to specifically control the size of NPs	Complicated conditions
Biological	Microbial incubation	Small platelets, spherical or rod-like spheres, irregular spheres	Good reproducibility and scalability, high yield, and low cost	Slow and laborious

Les méthodes chimiques comprennent la méthode sol-gel, la méthode du fluide supercritique, la méthode électrochimique, la coprécipitation chimique, la méthode hydrothermale, la méthode de décomposition par voie sonochimique, la méthode par injection de flux et les nanoréacteurs.

Dans notre travail de thèse, la méthode sol-gel a été choisie par les physiciens (Figure 10). Le mot sol-gel correspond à l'abréviation « solution-gélification ». Cette méthode est basée sur deux phénomènes l'hydroxylation et la condensation des précurseurs moléculaires en solution. Ainsi, le "sol", qui est un colloïdal ou une suspension moléculaire des particules solides dont

la taille varie de 1 nm à 1 micron, est ensuite séché ou "gélifié" soit par élimination du solvant, soit par réaction chimique pour obtenir un réseau d'oxyde métallique tridimensionnel [33]. Le solvant utilisé est l'eau ou l'alcool mais les précurseurs peuvent être hydrolysés en utilisant un acide ou une base. La catalyse basique donne un gel colloïdal, alors que la catalyse acide formule un gel polymère. La réaction s'effectue à température ambiante. Cependant, un traitement thermique à très haute température est nécessaire pour obtenir l'état cristallin final des NPs d'oxyde de fer. Les avantages de la méthode sol-gel sont : le coût, la température technique basse (TA) et la possibilité de contrôler la composition chimique du produit (NPs d'oxyde de fer dans notre cas) [34].

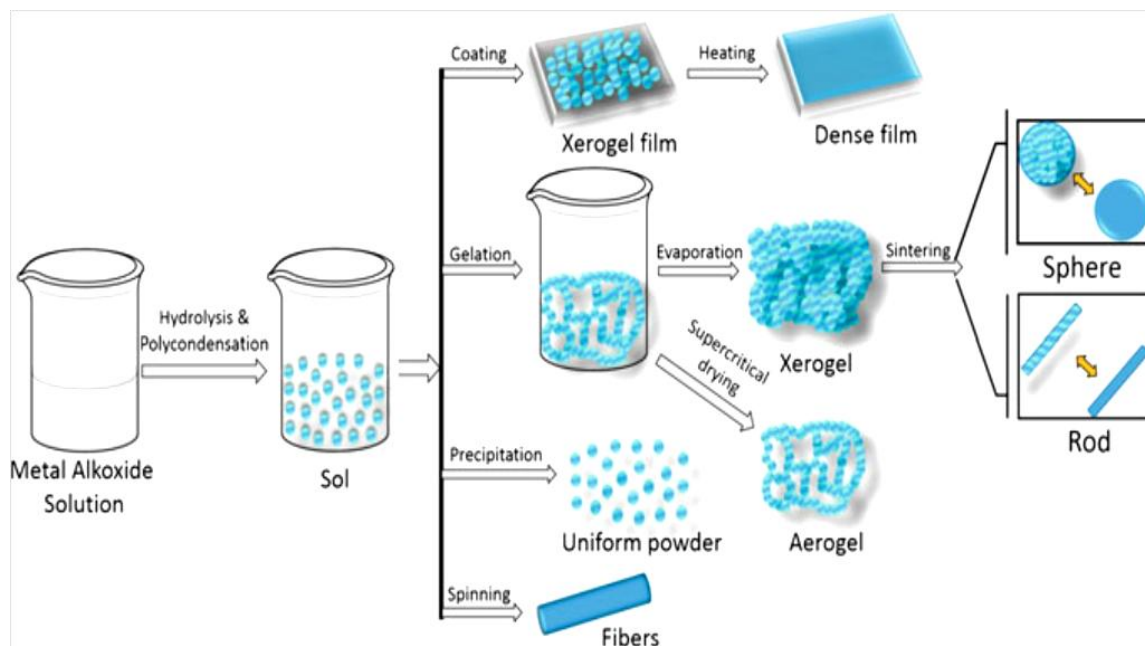


Figure 10 : Représentation schématique de la méthode sol-gel [34]

b) Revêtement de surface des nanoparticules de fer

Les NPs d'oxyde de fer ont tendance à s'agréger en raison de leur grand rapport surface / volume présentant de fortes attractions supraparamagnétiques, des forces de van der Waals et une surface à haute énergie [35]. Pour une meilleure stabilité en milieux biologiques et l'apport de nouvelles fonctionnalités, les surfaces des NPs peuvent être modifiées [36]. Le revêtement peut être fait avec des ligands organiques à longue chaîne ou de polymères de nature organique ou inorganique (Figure 11), qui peuvent être introduits pendant ou après la synthèse, revêtement *in situ* ou post-synthèse, respectivement. Ces ligands peuvent être de nature hydrophobe ou hydrophile, neutre ou chargé, synthétique ou naturel.

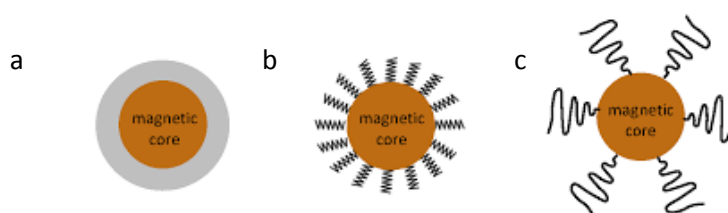


Figure 11 : Différents types de revêtements de surface des nanoparticules: (a) matériaux inorganiques (b) molécules organiques à longue chaîne (c) polymères organiques [36]

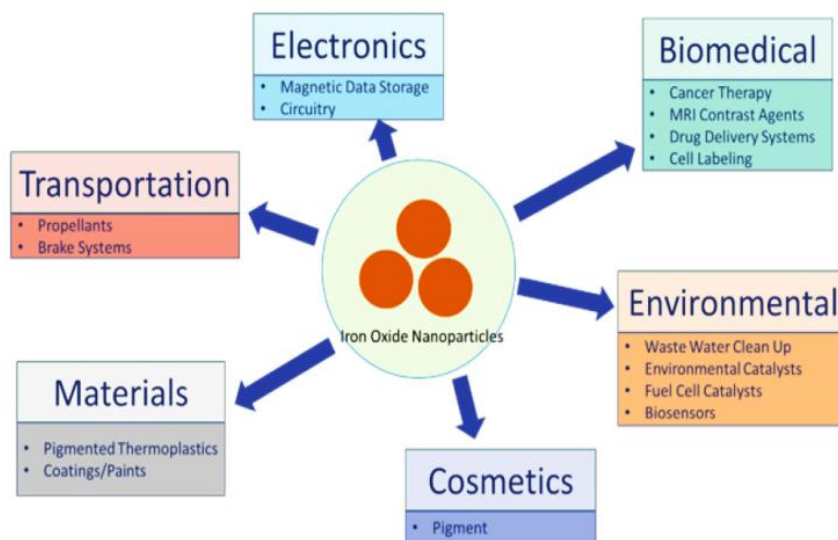
Les revêtements polymères sont les plus utilisés et peuvent être classés en polymères naturels comme le chitosan, le dextran, le rhamnose, ou des polymères synthétiques tels que la polyéthylèneimine (PEI), l'alcool polyvinylique (PVA), le polyéthylèneglycol (PEG), et la polyvinylpyrrolidone (PVP) [36] (Umut 2013). Dans certains cas, d'autres molécules organiques, dont l'acide oléique, la dodécylamine, l'oléylamine et l'oléate de sodium, sont également utilisées. Le tableau 6 illustre quelques polymères, les plus utilisés, pour le revêtement de surface des NPs d'oxydes de fer.

Tableau 6 : Quelques propriétés de différents matériaux organiques de revêtement de surface (avec modification d'après Umut 2013) [36]

Polymers / organic molecules	Properties	Advantages / Disadvantages
Chitosan	Natural, cationic, hydrophilic, linear, biodegradable	Can be used in non-viral gene delivery
Dextran	Natural, branched, hydrophilic, biocompatible	Permits the anchoring of biovectors and drugs when functionalized with amino groups
Polyethyleneimine (PEI)	Synthetic, cationic, linear or branched, nonbiodegradable, toxic	Forms strong covalent bonds with MNP's surface, can be used for DNA and RNA delivery, but exhibit cytotoxicity
Polyvinylealcohol (PVA)	Synthetic, hydrophilic, biocompatible	Irreversibly binds on MNP's surface but can be used in temperature sensitive heating or drug release applications due to its decomposition temperatures (40-50 °C)
Polyethyleneglycol (PEG)	Synthetic, neutral, hydrophilic, linear, biocompatible	Remains stable at high ionic strengths of solutions with varying PH values, enhances blood circulation time (a few hours), permits functionalization
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Synthetic, branched, hydrophilic	Forms covalent bonds with drugs containing nucleophilic functional groups

c) Applications des nanoparticules de fer

Les NPs d'oxyde de fer sont largement utilisées dans plusieurs domaines tels que: la biologie, la médecine et l'environnement comme le résume la figure 12.

**Figure 12 : Applications des NPs d'oxyde de fer dans divers domaines [37]**

Les applications biomédicales s'avèrent être les plus intéressantes des NPs d'oxyde de fer grâce à leurs propriétés uniques. En effet, les NPs d'oxyde de fer magnétiques avec un long

temps de rétention sanguine, une biodégradabilité et une faible toxicité sont considérées comme l'un des principaux nanomatériaux pour les applications biomédicales. Toutefois, la biocompatibilité et la toxicité de ces NPs sont des critères importants à prendre en compte pour leurs applications biomédicales. Ces applications peuvent être réparties en applications *in vivo* et applications *in vitro* [35]. *In vivo*, les applications des NPs d'oxyde de fer peuvent être classées en thérapeutiques et diagnostiques. Les applications thérapeutiques sont de deux types : 1) la vectorisation des médicaments, les NPs sont des vecteurs magnétiques des médicaments à un endroit ciblé et 2) l'hyperthermie, les NPs sont utilisées en tant qu'agents de thermoablation qui sont chauffés sélectivement par l'application d'un champ magnétique à haute fréquence. Les applications diagnostiques se résument dans l'utilisation des NPs de fer en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) en tant qu'agents de contraste. Dans la vectorisation des médicaments, la barrière hémato-encéphalique présente un vrai obstacle pour l'arrivée du médicament au cerveau, précisément dans le traitement des maladies neurodégénératives, notamment l'Alzheimer. Ainsi, l'encapsulation de ces médicaments dans les NPs ou bien leur couplage permettrait de surmonter cet obstacle [38]. Dans une étude, *in vitro*, sur la lignée cellulaire de Raji, Jing *et al.*, (2010) ont montré que la combinaison des NPs magnétiques de Fe_3O_4 avec des médicaments utilisés en chimiothérapie pour le traitement du Lymphome de Burkitt, tels que l'adriamycine et la daunorubicine, favorise l'induction de l'apoptose par stimulation de l'activité de p53 et la diminution de l'activité de NF- κ B sans aucun effet toxique sur les cellules [39]. Ces résultats seraient d'un grand intérêt pour le développement d'une application clinique afin de limiter les résistances à la chimiothérapie. Cependant, cette hypothèse reste encore à vérifier dans des études précliniques. Récemment, Sun *et al.*, (2014) ont montré, sur un modèle *in vitro* d'une lignée cellulaire dérivée du cerveau de souris (bEnd.3), que l'application d'un champ magnétique, stimulant la convection et la diffusion des NPs d'oxyde de fer, augmente la perméabilité de ces NPs à travers la barrière hémato-encéphalique [40]. Cette modification est en faveur d'une utilisation possible des NPs d'oxyde de fer dans la délivrance des médicaments dans le Système Nerveux Central. En clinique, les NPs d'oxyde de fer telles que les Ferumoxides et le Ferucarbotran sont utilisées en IRM comme agents de contraste, en raison de leur biocompatibilité, biodégradabilité et la forte amélioration du contraste [4,41]. Les NPs d'oxyde de fer telles que le ferumoxytol (Feraheme®) sont aussi utilisées pour le traitement de l'anémie ferriprive chez les adultes atteints de maladies rénales chroniques. Ce traitement a été approuvé en 2009 par la "Food and Drug Administration (FDA)" et en 2012 par l'Agence Européenne des Médicaments "European Medicines Agency (EMA)" en tant que traitement à

administrer par voie intraveineuse [4,42]. Cependant, en Mars 2015, la FDA a averti que ce traitement présente des risques de chocs anaphylactiques et est contre-indiqué à toute personne qui présente une allergie à tout produit de remplacement du fer par voie intraveineuse. Le tableau ci-dessous (Tableau 7) résume les NPs d'oxyde de fer utilisées pour des applications cliniques et approuvées par la FDA et/ou la Commission européenne (CE), parmi lesquelles Sinerem a été retirée par Guerbet (partenaire européen d'AMAG Pharma) en 2007. Le Ferumoxide a été abandonné par AMAG Pharma en 2008 et la production de Retrovist a été abandonnée en 2009.

Tableau 7 : Médicaments à base des NPs d'oxyde de fer approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et/ou la Commission européenne (CE). Sinerem a été retirée par Guerbet (partenaire européen d'AMAG Pharma) en 2007. Le Ferumoxide a été abandonné par AMAG Pharma en 2008 et la production de Retrovist a été abandonnée en 2009 (D'après Cortajarena et al. 2014) [4]

Date	Events	indication	Size (nm)	Administration
1996	Lumirem (Gastromark (US)): approved by FDA	Contrast agent for MRI for the gastrointestinal tract	50	Oral
1996	Ferumoxides (Emdorem (EU) or Feridex 1.V.): approved by the FDA	Contrast agent for MRI of liver lesions	120-180	Injectable solution
2001	Ferucarbotran (Resovist or Clivast(EU)): approved for European Market	Contrast-enhanced MRI of the liver	45-60	Injectable solution
2005	Ferumoxtram (Sinerem (EU) or Combidex (US)): AMAG Pharma received an approvable letter from the FDA	Detection and characterization of metastatic lymph nodes in patients with pelvic cancer	10-40	Injectable solution
2006	Sinerem: submitted European Marketing Authorization Application	Detection and characterization of metastatic lymph nodes in patients with pelvic cancer	10-40	Injectable solution
2009	Feraheme (Ferumoxytol): approved by the FDA	Iron replacement therapy for the treatment of iron deficiency anemia in adult patients with chronic kidney disease.	20-50	Intravenous
2012	Feraheme (Ferumoxytol): approved by the EC	Iron replacement therapy for the treatment of iron deficiency anemia in adult patients with chronic kidney disease.	20-50	Intravenous

In vitro, les NPs de fer sont utilisées en diagnostic comme biocapteurs et en bioséparation cellulaire (Figure 13). En tant que biocapteurs, les NPs de fer sont très utiles pour détecter les biomolécules et les cellules avec une sensibilité élevée qui pourrait permettre un diagnostic précoce. La bioséparation est également un type d'application important des NPs de fer, en particulier pour la séparation *in vitro* de plusieurs produits tels que l'ADN, les anticorps, les protéines, l'ADN, les enzymes, les cellules, les virus et les bactéries [43].

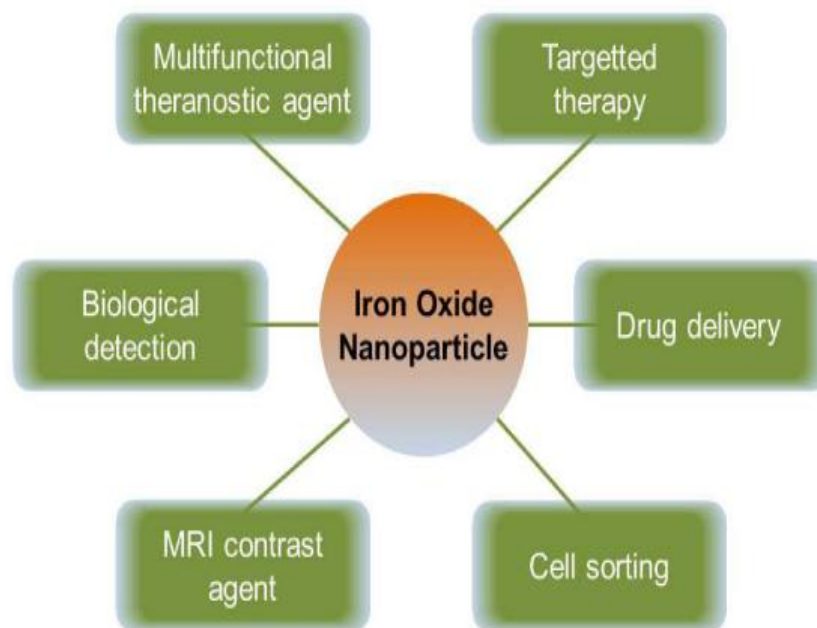


Figure 13 : Applications des NPs d'oxyde de fer en biomédecine [43]

B. Toxicité des nanoparticules

1. Nanotoxicologie : Définition

Les nanotechnologies ont toujours été accompagnées de plusieurs questions comme : sont-elles risquées pour l'Homme et l'environnement ? Dans quelle mesure pouvons-nous les utiliser et dire qu'elles sont sûres ? Pour répondre à ces questions, une branche scientifique de la toxicologie a émergé, la nanotoxicologie, afin d'étudier les effets toxiques potentiels des nanotechnologies. Ainsi, la nanotoxicologie englobe l'investigation des effets toxicologiques reliés aux nanoparticules et ont fait l'objet de plusieurs études [9]. Le nombre de publications scientifiques en nanotoxicologie s'est multiplié lors de ces dernières années. Le graphique ci-dessous (Figure 14) montre l'évolution progressive du nombre de publications répertoriées sur la base de données « Pubmed » en utilisant « nanoparticle toxic ».

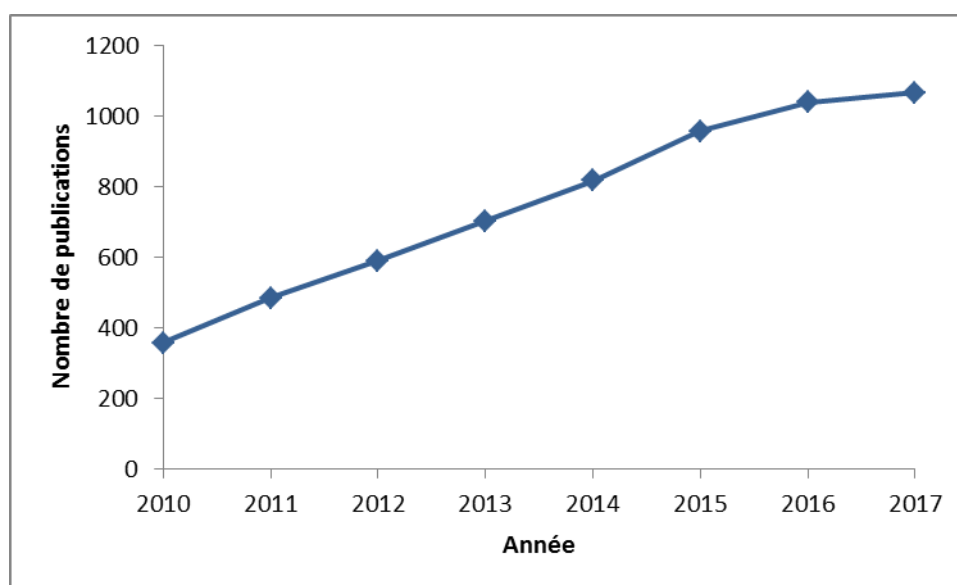


Figure 14 : Evolution du nombre de publications sur "nanoparticle toxic" entre 2010 et 2017

2. Toxicité et caractéristiques des nanoparticules

Les propriétés toxicologiques des nanoparticules relèvent à la fois des caractéristiques de la taille nanométrique, de la surface, de la forme et de l'état d'agrégation et d'agglomération et aussi de la composition chimique de la particule. Quoique celles-ci demeurent fragmentaires

en ce qui concerne les divers aspects toxicologiques et la diversité des nanomatériaux qui ont été évalués, de nombreux effets délétères ont été mesurés, notamment chez l'animal [9,44].

a) Taille

L'Homme est exposé à divers matériaux à l'échelle nanométrique quotidiennement en particulier après le développement des nanotechnologies, ce qui présente une menace pour la vie humaine et l'environnement. En raison de leur petite taille, les NPs ont la capacité de pénétrer facilement dans le corps humain, de traverser les différentes barrières biologiques et d'atteindre les organes les plus sensibles [45]. Des chercheurs ont rapporté que les NPs de taille inférieure à 10 nm agissent comme un gaz et peuvent pénétrer facilement dans les tissus humains et ainsi induire des changements de l'environnement homéostatique cellulaire [24]. En effet, avec la diminution du diamètre, la surface de la particule augmente exponentiellement. Ainsi, même lorsque les particules ont la même composition, la modification de la taille mène à d'autres niveaux de cytotoxicité. De plus, suite à ce type de modification, les chercheurs ont rapporté des différences significatives dans le mécanisme de distribution *in vitro* et *in vivo* [46,47]. Dans le cas d'une exposition aux NPs par inhalation, les nanoparticules pénètrent profondément dans le parenchyme pulmonaire. De plus, celles qui sont de tailles différentes présentent des profils de distribution bien spécifiques au niveau des voies respiratoires. Dans une autre étude explorant les effets des différentes concentrations et tailles de NPs d'argent de 18, 34, 60 et 160 nm chez le rat, les auteurs ont trouvé qu'après 24h, les NPs d'argent mesurant 18 et 34 nm induisent le relargage de la lactate déshydrogénase (LDH) d'une manière dose-dépendante. Cet effet n'a pas été observé avec les NPs de taille 60 et 160 nm. Bien qu'il y ait eu plus de nanoparticules de 60 et 160 nm dans l'ensemble des poumons, plus de nanoparticules de 18 et 34 nm ont été trouvées dans les alvéoles. Ainsi, il est suggéré que la surface accrue des particules nanométriques était le facteur le plus impliqué dans la toxicologie des NPs d'argent [48].

Au niveau cellulaire, le mécanisme d'absorption des NPs et son efficacité sont des facteurs clés influençant la cytotoxicité. Ce mécanisme est également influencé par la taille de ces NPs. L'un des principaux facteurs déterminant l'efficacité de l'absorption cellulaire et le mécanisme est la taille des nanoparticules. Dépendamment de leur la taille et de leurs caractéristiques, les NPs sont internalisées dans la cellule par deux voies principales: la pinocytose et la macropinocytose ainsi que l'endocytose (Figure 15) [49–51]. Les tailles adaptées à l'absorption vont de 10 à 500 nm avec une limite supérieure de 5 µm. Les plus

grosses particules, mesurant quelques micromètres, sont internalisées par phagocytose. Les grosses particules de l'ordre de 1 μm sont plus susceptibles d'être internalisées d'une manière non spécifique par pinocytose et macropinocytose. La taille d'une vésicule internalisée par endocytose clathrine-dépendante est d'environ 120 nm, tandis que les particules internalisées par endocytose cavéole-dépendante est habituellement d'environ 60 à 80 nm. Les particules de taille d'environ 90 nm sont internalisées par endocytose clathrine/cavéole dépendante. La figure 15 illustre plusieurs voies d'internalisation dépendantes de la taille [49].

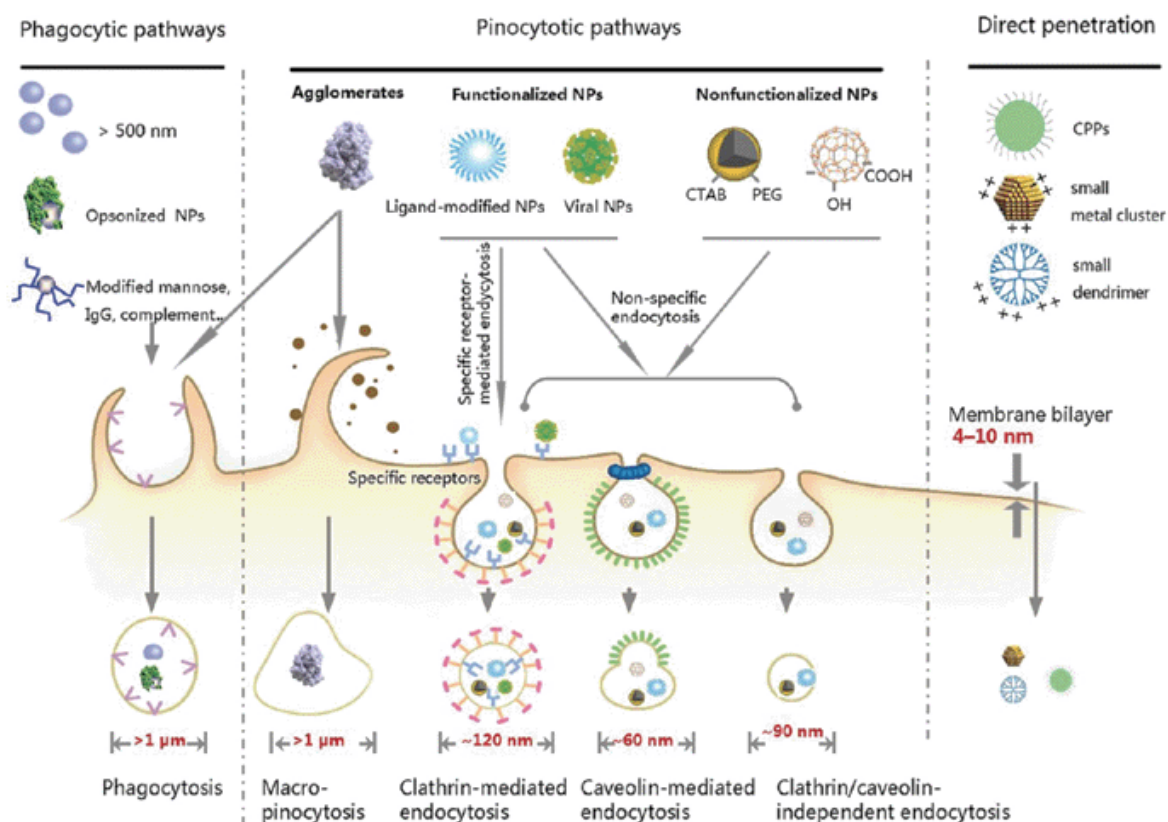


Figure 15 : Voies d'internalisation des nanoparticules selon la taille [49]

b) Surface et charge

La surface joue un rôle important dans la toxicité des NPs. Lorsque la surface d'échange est grande, ceci peut provoquer une réactivité plus élevée avec les particules et cellules voisines de l'environnement, ce qui peut entraîner des effets nocifs. En effet, en diminuant la taille des particules, l'activité biologique augmente. Si la surface est grande, les plus petites particules occupent moins de volume, de telle manière que le plus grand nombre de particules peut occuper une surface unitaire, entraînant par la suite des mécanismes de toxicité physiopathologique accrue, tels que le stress oxydatif et la perturbation mitochondriale, etc.

Les caractéristiques externes de l'état électronique de la surface sont essentielles pour évaluer l'absorption cellulaire et peuvent également jouer un rôle dans la cytotoxicité [45].

Les changements dans la charge de surface entraînent des différences considérables dans l'internalisation *in vitro* et dans la biodistribution *in vivo* des NPs [3]. Les particules présentent différents degrés de toxicité en fonction de leurs charges de surface. Les nanoparticules avec une surface chargée positivement sont connues pour avoir une toxicité beaucoup plus élevée. Dans le cas des NPs de type métallique, la charge de surface est impliquée dans leur capacité de se dissoudre pour libérer les ions du métal correspondant [52]. La charge de surface des NPs peut être déterminée par la mesure du potentiel *zeta* (mV). Le potentiel *zeta* est la mesure de l'intensité des interactions électrostatiques (répulsion / attraction) ou électriques entre les particules qui se trouvent en suspension ou en solution (Figure 16). C'est l'un des paramètres les plus utilisés pour évaluer la stabilité de la NP. La mesure apporte des renseignements détaillés des causes de dispersion, d'agrégation ou encore d'agglomération et peut être considérée pour résoudre les problèmes de dispersion et ainsi améliorer la formulation [53].

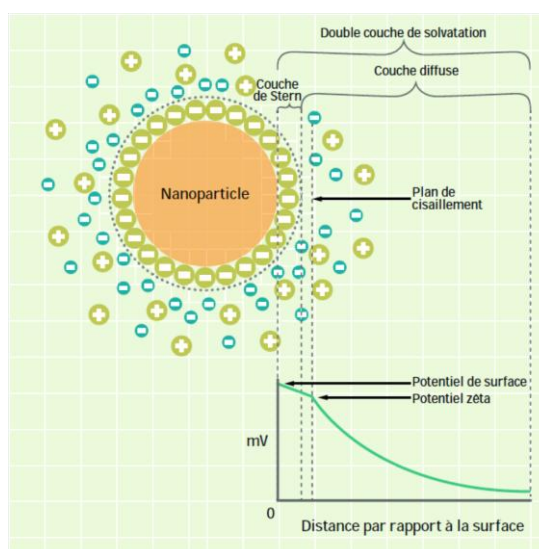


Figure 16 : Charges de surface et potentiel zeta (D'après SDTech Nano)

www.nano.sd-tech.com/files/fr/pdf/publication/2017/Zeta.pdf

c) Morphologie

La morphologie pose également un gros problème en nanotoxicologie. D'après la littérature, il a été démontré que certaines NPs de forme sphérique sont plus internalisées que les mêmes types de nanomatériaux qui sont sous forme de nanotubes de diamètre équivalent. Des études

faites sur différentes formes des NPs métalliques, telles que le TiO_2 et le ZnO , ont montré que les nanotubes sont plus toxiques que les nanosphères [45].

d) Agglomération et agrégation

L'agglomération et l'agrégation sont liées à la taille et à la surface des NPs. Plus la réactivité de la surface des particules est importante, plus cela facilite l'agglomération et l'agrégation ce qui peut jouer un rôle important dans la cytotoxicité. Dans le cas de l'agglomération, les particules dispersées se rejoignent lâchement ensemble par de faibles interactions physiques conduisant à une séparation de phase par la formation de précipités de taille supérieure à la taille colloïdale [37] (Figure 17). Ces liaisons se cassent facilement en utilisant des forces mécaniques telles que la sonication, de ce fait l'agglomération est un processus réversible. Cependant, l'agrégation est définie comme étant l'état des particules colloïdales fortement liées et le processus de regroupement est irréversible [54].

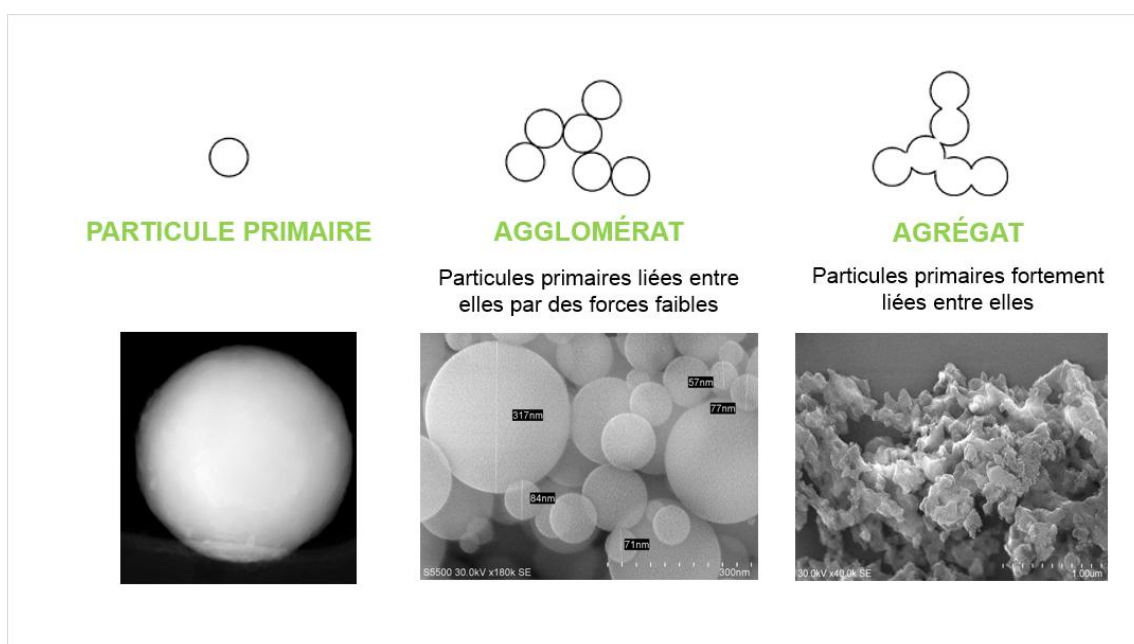


Figure 17 : Agglomération et Agrégation des nanoparticules

(D'après <http://www.nanosafety-platform.com>)

e) Composition chimique

La composition chimique influence aussi la toxicité des NPs. Dans la littérature, les NPs les plus documentés sont les NPs de type métallique. Il a été rapporté que les NPs métalliques sont plus toxiques que d'autres non métalliques mais aussi au sein du même groupe une différence du degré de toxicité selon le métal lui-même. Les NPs les plus toxiques sont de

type ZnO, puis NiO, CuO, TiO₂ et finalement les NPs de Fe₂O₃ les moins toxiques. Cependant le degré de toxicité des NPs de CuO, TiO₂ et ZnO est inversé dans d'autres études [55].

3. Caractérisation physicochimique des nanoparticules

Avant toute utilisation des nanoparticules, les différents paramètres physicochimiques doivent être caractérisés pour une optimisation de leurs effets. Le degré d'importance de chaque paramètre est très dépendant des applications envisagées de ces NPs. Parmi ces paramètres les plus exigés sont la taille de la nanoparticule en tant que poudre et aussi en suspension et les caractéristiques de la surface.

a) Mesure des paramètres en poudre et en suspension

La taille des NPs est un critère de base qui influence leur toxicité ou biocompatibilité. Pour la mesure de taille des NPs se fait généralement par des techniques conventionnelles en physique/ Chimie [3]. Les plus utilisées sont :

-La Microscopie Electronique à Transmission ou à Balayage : Ces techniques permettent de visualiser les NPs élémentaires, agglomérées ou encore agrégées. Les données fournies par ces méthodes sont la forme, la taille, la distribution en taille avec le degré d'agglomération/agrégation.

- La spectroscopie X à dispersion d'énergie EDXS (En Anglais *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) est une technique utilisée avec un couplage à des techniques d'imagerie comme la microscopie électronique par balayage (MEB), la microscopie électronique en transmission (MET ou TEM en Anglais) et la microscopie électronique en transmission par balayage (STEM) pour caractériser les NPs. Elle fournit des données sur la composition chimique ainsi que la teneur massique de nanomatériaux dans des produits. Combinée à ces outils, l'EDXS peut donner l'analyse élémentaire sur des surfaces aussi petites que la taille du nanomètre en diamètre. L'impact du faisceau d'électrons sur l'échantillon produit des rayons X qui sont caractéristiques des éléments présents dans l'échantillon, permettant dans ce cas d'évaluer la pureté de l'échantillon.

-La Diffraction des rayons X (DRX ou *X-Ray Diffraction* en Anglais) est une technique utilisée pour caractériser la structure cristalline de ces produits quand ils sont en poudre. Elle est très utilisée grâce à sa simplicité et à sa rapidité.

- La diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*), permet de caractériser les NPs en suspension. Cette technique, utilisée depuis 1981 et est également appelée spectroscopie par corrélation de photons ou diffusion quasi-élastique de la lumière [56]. Elle permet une mesure de la taille des particules, aussi bien à l'échelle micrométrique que nanométrique ; permettant ainsi l'évaluation du degré d'agglomération/ agrégation et de la stabilité des NPs.

- La spectroscopie UV-Visible est aussi utilisée comme outil pour caractériser les propriétés des nanoparticules métalliques pures (comme les NPs d'argent ou d'or), en particulier la taille et la forme et leurs propriétés de surface quand les NPs sont en suspension. De plus, la spectroscopie UV-Visible permet de mesurer la quantité d'ions métalliques précurseurs utilisés lors de la formation des nanoparticules métalliques.

-L'analyse des particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (SP-ICP-MS pour *Single Particle-Induced Coupled Plasma-Mass Spectroscopy*) est une autre méthode prometteuse pour la caractérisation de NPs. Grâce à l'analyse directe d'une solution correctement diluée contenant des NPs, les NPs peuvent être quantifiées. Si les NPs sont pures, la hauteur du pic, qui est proportionnelle à la taille de la nanoparticule, peut être utilisée pour déterminer sa taille.

b) Caractéristiques de surface

La chimie de surface des particules en suspension est l'un des facteurs les plus importants pour l'absorption cellulaire ou encore la toxicité de ces NPs [3]. Les caractéristiques de surface des NPs sont généralement étudiées par la détermination du *potentiel-zeta* des NPs en solution. Ce paramètre mesure la charge de la surface et donne une idée sur les interactions des NPs dans leur environnement biologique. En effet, toute modification de surface en vue de leur stabilisation peut induire des modifications de leur comportement et ainsi de leur toxicité [45]. La présence de ce genre de couplage (ligands ou polymères) est détectée par des méthodes physiques, telles que la spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS pour *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) ou la fluorescence par rayons X (XRF pour *X-ray fluorescence*).

4. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer

Pour étudier la toxicité des NPs en général, un paramètre de l'étude doit être prédéfini : le temps d'exposition. C'est-à-dire chercher une toxicité aiguë, subaiguë, ou chronique. La définition de ces trois termes est très variable entre les études nanotoxicologiques en particulier entre les termes subaiguë et chronique. Pour la toxicité aiguë, l'effet est recherché 24h après l'administration des NPs. Cependant, pour la toxicité subaiguë, l'exposition est de 2-14 voire même 28 jours, durée jugée parfois correspondre à un effet chronique qui est généralement supérieur à 30 jours [57–59].

Certaines NPs peuvent induire une toxicité qui devrait être connue et étudiée pour bien comprendre le mode d'action de ces NPs dans l'organisme. Ainsi, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été menées dans ce cadre, en utilisant plusieurs modèles cellulaires et différentes voies d'exposition chez les rats. Les résultats obtenus dépendent notamment de la taille des NPs, la nature de la voie d'administration, la dose, et le temps de l'exposition. Les NPs sont connues pour causer différentes réponses biologiques, y compris la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [60], la modification de la signalisation cellulaire, ainsi que la stimulation de l'expression accrue de cytokines pro-inflammatoires sans provoquer de cytotoxicité [61]. Dans une étude de Khan *et al.*, (2012) [62], les NPs de fer ont été démontrées pour l'induction de la nécrose à travers la production des ROS sur une lignée d'adénocarcinome du poulmon A549 et sur des fibroblastes normaux. En 2014, Alarifi *et al.*, [63] ont montré, sur une lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7, que les NPs de Fe₂O₃ sont cytotoxiques et génotoxiques par l'induction de dommages oxydatifs de l'ADN et une activation de l'apoptose. Wang *et al.*, (2010) [64] ont montré lors d'une étude sur les effets toxiques de l'inhalation des NPs de Fe₂O₃ chez les rats Wistar, que ces NPs de fer causent des dommages importants dans le foie et les poulmons. Dans le protocole, l'équipe a utilisé une dose de 8.5 mg/kg pendant 3 jours et a analysé des paramètres sériques et histologiques 12 h et 36 h après l'arrêt du traitement. Ils ont aussi trouvé que les taux sériques des enzymes hépatiques à savoir l'alanine aminotransférase ALT, l'aspartate aminotransférase AST, la lactate déshydrogénase LDH et la phosphatase alcaline ALP, ont diminué sans modification de leurs activités enzymatiques. L'analyse histopathologique a montré que ces NPs causent des dommages au niveau du foie et des poulmons [64]. Shirband *et al.*, (2014) [65] ont utilisé la méthode de gavage pour administrer aux rats des doses journalières de 20, 50 et 150 µg/kg pendant 15 jours. Leur étude a montré que la dose de 150 µg/kg est toxique pour le foie et la thyroïde. En effet, elle induit une augmentation significative des taux des enzymes hépatiques

(AST, ALT et ALP) et de l'hormone thyroïdienne T4. Ceci indique une destruction des cellules hépatiques et l'obstruction des canaux biliaires. Cependant, les taux sériques de TSH et de T3 sont diminués. Le désordre dans l'augmentation et la diminution des T3, T4 et TSH peut être expliqué par la destruction des cellules thyroïdiennes. Récemment, Sadeghi *et al.*,(2015) [66] ont montré que l'accumulation des NPs de fer entraîne une toxicité histopathologique au niveau du foie et des poumons. De même, le stress oxydatif était étudié dans ce travail, l'équipe a montré une augmentation de la production des ROS dose-dépendante, avec une diminution de taux de glutathion (GSH) qui représente l'une des plus importantes barrières contre ce stress. Ceci prouve la faiblesse de la barrière antioxydante contre ces NPs de fer. Pour les études de biodistribution, les NPs sont généralement administrées par voie intraveineuse. Après l'administration, les animaux sont sacrifiés à un point de temps spécifique, ou de préférence en plusieurs points dans le temps. Le cerveau est prélevé, ainsi que certains des principaux organes où les particules sont susceptibles de se retrouver, y compris le foie et la rate [38]. Néanmoins, les mécanismes de toxicité des nanoparticules de fer ne sont pas bien élucidés et d'autres études sont nécessaires pour mieux les mettre en évidence.

C. Modèles d'études toxicologiques

Pour étudier les effets toxiques des produits et/ou des composés, différents modèles peuvent être utilisés : cellulaire ou animal. Le choix du modèle dépend essentiellement de l'objectif de l'étude et du résultat attendu. Plusieurs types de cellules sont utilisés pour étudier les effets des nanoparticules. Une autre plage d'étude de la nanotoxicité consiste à étudier l'impact de l'exposition aux nanoparticules sur des organismes vivants intacts. Rat, souris et poisson zèbre sont les modèles animaux les plus utilisés pour l'étude toxicologique des nanoparticules [67–69].

1. Modèles cellulaires

Les études de toxicité *in vitro* se sont multipliées ces dernières années en raison d'un développement croissant des méthodes alternatives à l'utilisation des animaux en expérimentation. Le choix du modèle cellulaire dépend essentiellement du but de l'étude. En effet, deux catégories de cellules sont utilisées pour les tests *in vitro* : les cellules primaires et les cellules tumorales, transformées ou lignées cellulaires [55,70]. Plusieurs types de cellules sont utilisés, y compris les cellules sanguines phagocytaires, globules rouges, neurales, hépatiques, épithéliales, endothéliales et diverses lignées cellulaires cancéreuses [71].

a) Cellules primaires

Parmi les cellules primaires, les macrophages sont reconnus comme un type cellulaire spécialisé qui va piéger les bactéries ou les virus ainsi que tout type de matériau particulaire, notamment les nanoparticules en vue de leur clairance ou de leur accumulation. En effet, si l'absorption de particules par les macrophages est corrélée à la performance *in vivo* des nanomatériaux, alors la compréhension de la reconnaissance des macrophages par des corps étrangers circulants peut aider à comprendre comment les nanomatériaux sont éliminés ou provoquent une toxicité [70]. Les macrophages se sont avérés être des acteurs clés dans la toxicité des fibres d'amiante et des nanoparticules de silice, et donc dans l'étiologie de l'asbestose et de la silicose, grâce à leur réponse au stress de la phagocytose de ces particules. Le développement de corrélations entre les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules et les mécanismes de leur absorption, de leur traitement/métabolisme et de leur clairance dans les macrophages fournirait une base pour surmonter les difficultés rencontrées dans la livraison et le ciblage systémique de ces particules. Comme exemples, les macrophages de type macrophages primaires murins ont été utilisés pour étudier les effets des

nanoparticules de TiO₂, CuO et Zn [72], les macrophages de type RAW264.7 ont été utilisés pour étudier les effets des nanoparticules de CuO. D'autres types sont aussi utilisés J774A.1, IC-21, THP-1, Jurkat, Mono Mac-6, U937 et NR8383 [70,71].

b) Lignées cellulaires

La lignée cellulaire Caco-2, dérivée du carcinome colorectal humain, et a la capacité de se différencier spontanément en culture pour former des monocouches confluentes très proche morphologiquement et biochimiquement de l'épithélium de l'intestin grêle. Ces cellules sont utilisées comme une alternative aux modèles animaux pour étudier l'absorption intestinale de certains agents thérapeutiques, y compris les nanoparticules, qui pourraient fournir des prédictions utiles concernant le potentiel d'absorption orale [73]. La limite de l'absorption directe de nanoparticules par les cellules Caco-2 suggère que l'amélioration de la biodisponibilité orale en réduisant la taille des particules passe par une augmentation de vitesse de dissolution plutôt qu'une absorption directe. Récemment, les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ont été un modèle alternatif aux cellules Caco-2 pour étudier la perméabilité cellulaire aux NPs. De manière similaire aux cellules Caco-2, les cellules MDCK se différencient en épithélium cylindrique et forment des jonctions serrées lorsqu'elles sont cultivées sur des membranes semi-perméables. Dans une récente comparaison complète de nombreux modèles *in vitro*, les cellules MDCK, ressemblant aux barrières hémato-encéphaliques (BHE), ont été considérées comme offrant le meilleur modèle en termes de prédiction de la capacité de pénétrer les BHE sur la base des données de microdialyse [74].

Les tissus épithéliaux pulmonaires présentent des cibles potentielles des nanomatériaux *in vivo* après inhalation. Ainsi, les chercheurs ont utilisé la lignée cellulaire de cellules épithéliales pulmonaires A549, connues comme modèle d'étude du carcinome pulmonaire humain. Ces cellules ont été utilisées pour étudier les effets de plusieurs types de nanoparticules se trouvant essentiellement dans l'air ambiant telles que les nanoparticules Ag-NPs, Ni-NPs, ZnO-NPs, TiO₂-NPs, CuO-NPs et Fe-NPs [75–80].

Les lignées cellulaires de neuroblastome IMR 32 et SH-SY5Y présentent un modèle d'étude de référence du système nerveux et aussi des maladies neurodégénératives principalement de la Maladie d'Alzheimer et de la Maladie de Parkinson. Les cellules SH-SY5Y ont été utilisées dans l'étude des effets de plusieurs types de nanoparticules telles que : les Ag-NPs, ZnO-NPs, CuO-NPs et Fe-NPs [81–83].

Selon le modèle cellulaire, le processus d'internalisation, de métabolisation et d'effet des NMx se diffère. En effet, une étude réalisée par Wang *et al.*, en 2011 sur les nanotiges d'Or (Au-NRs) a montré que l'internalisation de ces NRs se fait par les trois types de voies endocytiques (Figure 18). Cependant, dans les cellules cancéreuses de type A549, un grand nombre de Au-NRs intracellulaires passent des lysosomes aux mitochondries et ne peuvent être libérés. La localisation intracellulaire, et non la voie d'absorption, détermine le devenir final de ces NRs dans les cellules. En effet, l'augmentation de la perméabilité de la membrane lysosomale une fois les NRs sont absorbées favorise leur libération dans le cytoplasme des cellules tumorales A549 et leur transfert des endosomes/lysosomes aux mitochondries. A ce niveau, les Au-NRs induisent une réduction du potentiel mitochondrial, une augmentation du stress oxydatif et enfin une diminution de la viabilité cellulaire. Par contre, dans les cellules normales et souches, les Au-NRs ne sont pas toxiques car leurs membranes lysosomales restent plus intacte et les NRs sont localisés dans les lysosomes [84].

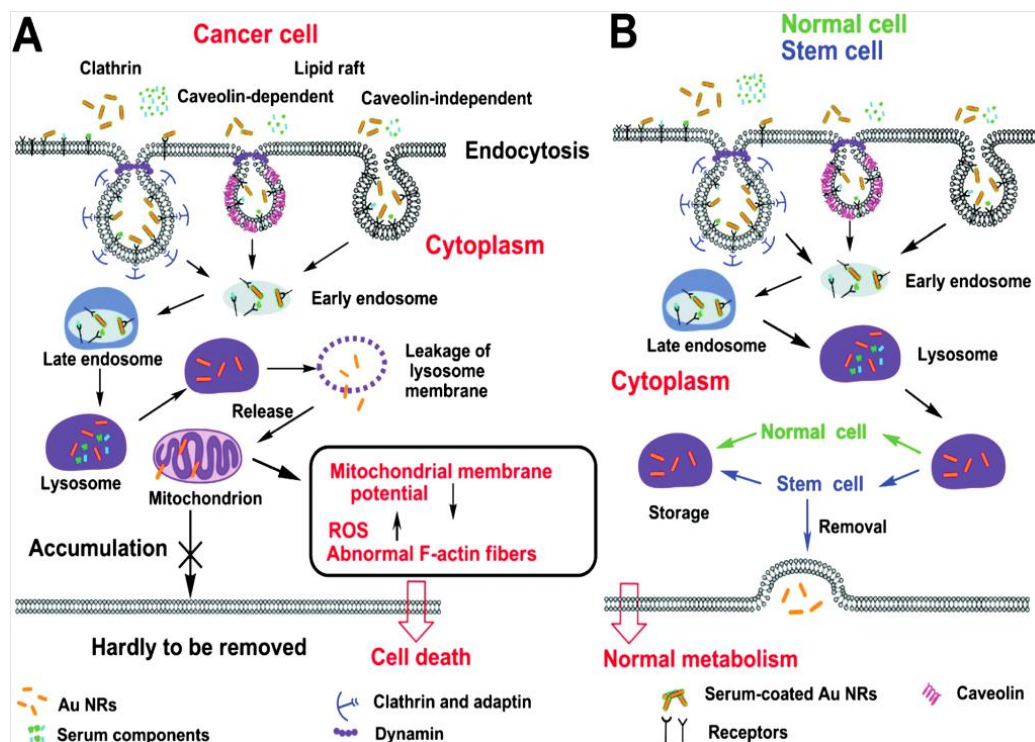


Figure 18 : Différents destins et effets des nanotiges d'or (Au NRs) dans les cellules cancéreuses (A), les cellules normales et les cellules souches (B) en raison des voies distinctes pour le trafic cellulaire [84]

2. Modèles animaux

Le rat et la souris présentent des modèles animaux murins couramment utilisés pour l'évaluation toxicologique [20]. La similitude génomique avec l'Homme ainsi que la courte durée de génération et la grande taille des portées chez les mammifères sont les raisons majeures de leur large utilisation. Cependant, un nouveau modèle d'étude *in vivo*, le poisson zèbre, est de plus en plus utilisé en toxicologie et en recherche biomédicale tant aux stades adultes qu'aux stades embryonnaires [69]. L'acceptation scientifique du poisson zèbre en tant que modèle animal expérimental récent et moderne augmente progressivement. La raison de cette reconnaissance du poisson zèbre en tant que modèle animal populaire est due à certaines caractéristiques qu'il possède telles que leur petite taille, leur reproductibilité très élevée, leur développement rapide, la transparence de l'embryon. Grâce à l'homologie de leurs parts de génome avec le génome humain, il est possible d'étudier diverses fonctions physiologiques et processus biologiques, tels que l'angiogenèse, la malformation fœtale et le stress oxydatif causé par des substances étrangères à l'organisme [85]. Côté reproduction, environ 200-300 œufs peuvent être produits à partir d'un seul accouplement tous les 5-7 jours, fournissant ainsi un nombre important d'organismes et un temps expérimental raccourci par rapport aux modèles murins. Par exemple, chez la souris, la période de gestation est d'environ 20 jours, et la taille de leur portée est beaucoup moins importante que celle du poisson-zèbre. Ainsi, ces avantages font du poisson zèbre un modèle alternatif aux modèles murins moins cher et garantissent un gain de temps [69,85].

En expérimentation, les nanoparticules peuvent être administrées aux animaux selon plusieurs critères tels que : le modèle animal, l'effet recherché et les propriétés des nanoparticules.

Chez le rat ou la souris, les nanoparticules sont administrées par différentes voies : intraveineuse, intranasale, orale, intratrachéale, intracérébrale, et sous-cutanée [20]. Les nanoparticules sont ajoutées dans la nourriture pour le poisson zèbre. La toxicité des ZnO-NPs, Al-NPs, Au-NPs et Fe-NPs suite à une exposition intraveineuse a été évaluée par plusieurs études *in vivo* chez le rat ou la souris. ZnO-NPs, TiO₂-NPs et Fe-NPs ont été administrées aussi par voie intrapéritonéale pour étudier l'effet sur le rat. Le choix de la voie d'administration dépend du type des NPs. En effet, quand les NPs sont utilisées dans les produits alimentaires, les chercheurs ont plus tendance à évaluer leurs effets par voie orale ou intrapéritonéale. Cependant, si les NPs sont dans les produits injectables ou les médicaments, leurs effets sont plutôt recherchés suite à une exposition intraveineuse. De même, pour les études de biodistribution, les NPs sont généralement administrées par voie intraveineuse.

Après l'administration, les animaux sont sacrifiés à un point de temps spécifique, ou de préférence en plusieurs points dans le temps. Le cerveau est prélevé, ainsi que certains des principaux organes où les particules sont susceptibles de se retrouver, y compris le foie et la rate [38].

D. Méthodes d'études et d'exploration des effets des nanoparticules

L'effet des nanoparticules est recherché par plusieurs méthodes sur des modèles cellulaires par des études *in vitro* ou bien des modèles animaux par des études dites *in vivo*. Le schéma ci-dessous (Figure 19) illustre un grand nombre de tests, certains d'entre eux seront détaillés par la suite.

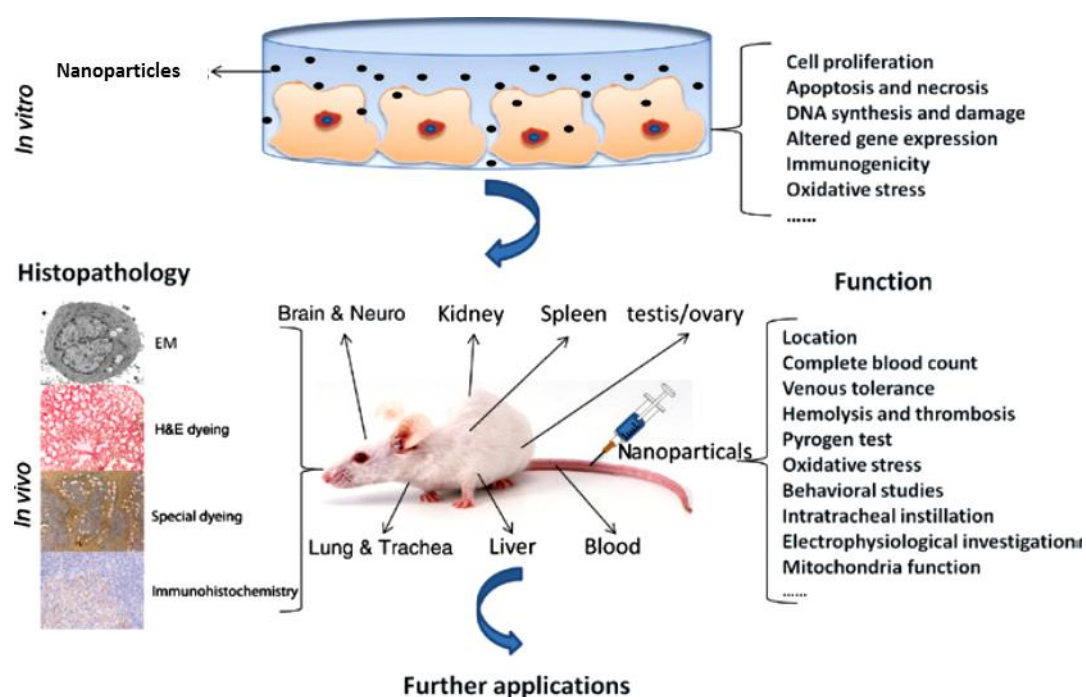


Figure 19 : Principaux paramètres étudiés par des études *in vitro* et *in vivo* [86]

1. Evaluation de la toxicité *in vitro*

a) Etude de la cytotoxicité

En contact avec les cellules, les nanoparticules peuvent induire des effets sur leur viabilité, sur leur intégrité membranaire ou encore sur leur prolifération. Ainsi, les toxicologues ont pour objectif principal d'identifier des tests *in vitro* qui reflètent d'une manière précise la capacité des NPs à induire des effets toxiques chez les humains.

Il existe une grande variété d'essais qui sont utilisés pour évaluer la toxicité ou la viabilité cellulaire. Le plus populaire est le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) ou les dérivés de ce test (par exemple MTS, XTT, WST-1, etc.). Ces tests déterminent principalement la viabilité cellulaire par la détermination de la fonction mitochondriale en mesurant l'activité des enzymes mitochondriales telles que la succinate déshydrogénase [87]. Ils se basent sur la réduction cellulaire des sels de tétrazolium qui mène à la production des colorants formazan. En présence de cellules vivantes, le sel qui est de couleur jaune MTT est converti par l'activité des réductases mitochondriales en colorant de couleur pourpre MTT-formazan (Figure 20), qui doit être solubilisé avant la mesure et qui peut être quantifié facilement en utilisant un spectrophotomètre. Cette réaction est monitorée par l'absorbance en tant que mesure du métabolisme cellulaire. La valeur d'absorbance générée est représentative à la fois du nombre de cellules et de la viabilité fonctionnelle de ces cellules. De tels tests peuvent donc détecter la prolifération ainsi que la cytotoxicité [88].

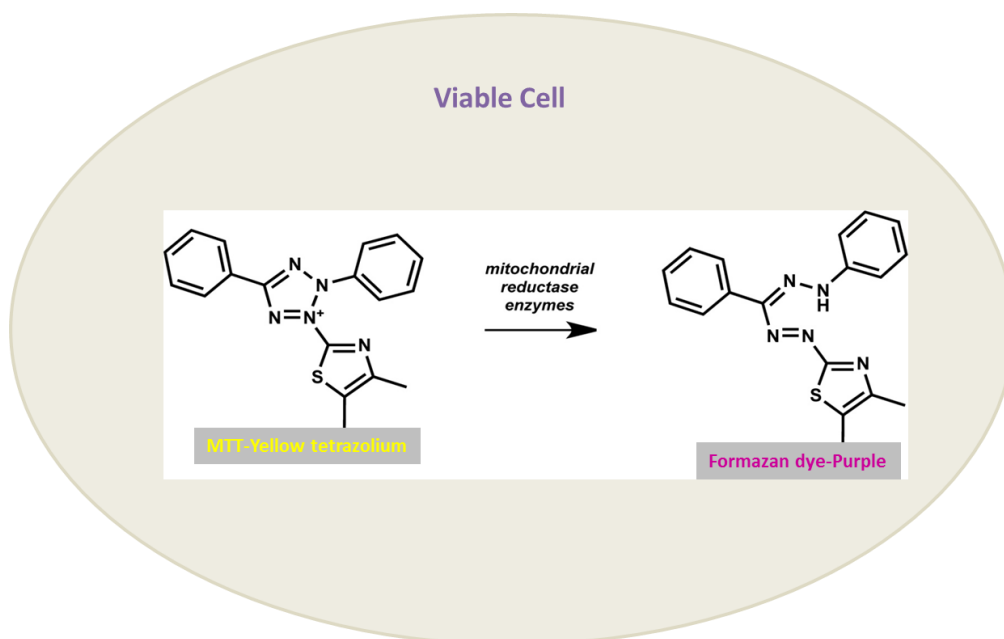


Figure 20 : Principe du test MTT

Le test MTT présente de nombreux avantages par rapport à d'autres tests de toxicité utilisés, car il est facile à mettre en œuvre, peut être appliqué sur un grand nombre de cellules, a des rendements plus rapides, et des résultats reproductibles nécessitant une simple acquisition de densité optique [67]. Cependant, il existe un certain nombre d'expériences de contrôle supplémentaires qui devraient être menées avant d'utiliser le test MTT (ou ses dérivés) pour l'évaluation des effets des NPs. Tout d'abord, quelques NPs peuvent générer une absorbance à la même longueur d'onde que celle utilisée pour quantifier le produit coloré, conduisant à une surestimation de la viabilité cellulaire. Cette interférence peut être surmontée par la soustraction de l'absorbance de fond des cellules en présence des NPs, mais sans les réactifs de dosage. De plus, les propriétés de surface des NPs peuvent résulter en une capacité d'adsorption élevée qui permet aux NPs d'extraire efficacement le produit coloré de l'extrait cellulaire, conduisant à une sous-estimation de la viabilité cellulaire. Pour ce type d'interférence, il est conseillé d'utiliser un test alternatif. En outre, l'enrobage des NPs peut aider à réduire l'interférence par adsorption, et doit être pris en compte lors de l'interprétation des données de toxicité. Un autre paramètre à ne pas négliger est l'oxydation. En effet, les NPs peuvent présenter des propriétés de surface oxydantes, et la production de la coloration se produit *via* une réaction oxydative. Il est donc nécessaire d'évaluer si les NPs, en l'absence de cellules, peuvent déclencher une augmentation de l'absorbance. Ainsi, le MTT et les tests dérivés peuvent être utilisés avec succès pour traiter la toxicité induite par les nanoparticules [87].

Une autre mesure également commune de la cytotoxicité est le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). La LDH est une enzyme cytosolique, indicatrice de toxicité cellulaire [89]. En fait, la réduction de la viabilité cellulaire conduit à une augmentation de la fuite de la membrane plasmique et donc à la libération/relargage de l'enzyme LDH dans le milieu de culture cellulaire. La quantification de la présence de LDH extracellulaire se fait à l'aide d'une réaction enzymatique en deux étapes : Dans la première étape, la LDH produit du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) lorsqu'elle catalyse l'oxydation du lactate en pyruvate. Dans la seconde étape, un sel de tétrazolium est converti en un produit de formazan coloré en utilisant du NADH nouvellement synthétisé en présence d'un accepteur d'électrons. Ainsi, le dosage est idéal pour un screening à haut débit et fournit une alternative aux dosages de cytotoxicité radioactifs. Néanmoins, l'importance de la surface des NPs peut être à l'origine d'interférences dues à l'adsorption de la protéine LDH sur la surface de ces particules. Dans ce cas, une étape de centrifugation du surnageant cellulaire est nécessaire

pour éliminer tous les particules et débris cellulaires contaminants, ce qui permet l'élimination de la protéine adsorbée par les particules du surnageant.

L'intégrité membranaire est une autre caractéristique cellulaire couramment utilisée pour déterminer la cytotoxicité au cours des expériences *in vitro* en nanotoxicologie [67].

Le test d'exclusion au bleu de trypan est l'un des tests utilisés pour évaluer la cytotoxicité, notamment l'intégrité membranaire et la prolifération cellulaire [90]. Ce produit, appelé aussi bleu diamine ou bleu de Niagara est un colorant vital dérivé de la ditoluidine ($C_{14}H_{16}N_2$), non toxique pour la cellule, et a tendance à entrer dans la cellule. Il pénètre dans le cytoplasme des cellules mortes ou en train de mourir dont la membrane plasmique est devenue perméable. Ainsi, il est possible, par simple observation au microscope de déterminer dans un échantillon cellulaire la proportion de cellules vivantes et mortes. Cette méthode est avantageuse car elle transmet le nombre réel de cellules viables et augmente (prolifération cellulaire) ou diminue (cytotoxicité) par rapport aux cellules témoins non traitées [91]. Le taux d'exclusion du bleu de trypan est une méthode efficace d'évaluer les dommages induits par les toxiques organiques ou autres et donc d'en déduire leurs effets sur la viabilité cellulaire. De même, les interactions entre les nanomatériaux et les produits des tests peuvent être surmontées par l'utilisation des tests cologéniques, dans lesquels les colonies de cellules qui prolifèrent très bien par rapport aux autres sont comptées directement visuellement après l'exposition aux nanomatériaux [90]. Bien que ce test présente les avantages d'être rapide et utile pour déterminer la viabilité des cellules, il n'est pas suffisamment sensible ou fiable pour les tests de toxicité *in vitro* et non approprié pour les tests de haut débit principalement en raison de l'exigence de comptage manuel des cellules.

Une autre alternative est la mesure de l'internalisation du rouge neutre. Le principe de ce test est l'inverse du test de bleu de trypan. Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par diffusion passive, et s'accumule au niveau intracellulaire principalement dans les lysosomes. Ce colorant est exclu des cellules mortes. Après contact avec les NPs, la quantité de rouge neutre incorporée dans les cellules est mesurée par spectrophotométrie. Le rouge neutre est non chargé au pH physiologique et est capable d'entrer à la fois les cellules vivantes et mortes [67,87].

L'Iodure de Propidium (IP) est un colorant fluorescent et fonctionne de la même manière que le bleu Trypan, il colore l'ADN ou les noyaux des cellules mortes en raison de la perméabilité accrue de la membrane plasmique. Lorsque l'IP pénètre dans une cellule, il s'intercale dans l'ADN et l'ARN double brin où il fluoresce à 617 nm. Cette coloration est utilisée comme indicateur de mort cellulaire par nécrose. D'ailleurs, il est relativement commun de combiner la coloration IP avec l'annexine V-FITC (isothiocyanate de fluorescéine). L'annexine V peut être utilisée pour la détection et la quantification des cellules à un stade précoce de l'apoptose en se liant à la phosphatidylsérine à la surface des cellules apoptotiques. Les techniques de mesure sont l'immunofluorescence *in situ* ou la cytométrie en flux [67,92]. Lorsqu'étiquetée avec un fluorescent tag, tel que la FITC, cette liaison peut être utilisée pour étiqueter par fluorescence les membranes de l'apoptose précoce et tardive dans les cellules. La fragmentation de l'ADN intranucléaire est une identification spécifique de l'apoptose de sorte que la fragmentation de l'ADN est souvent considérée comme une évaluation de l'apoptose [93]. Cette dernière peut être aussi étudiée par le dosage de l'activité enzymatique des caspases telle que le dosage de l'activité catalytique de la caspase-3. Ce test sert à mettre en évidence la présence de cellules apoptotiques. Il permet de connaître le pourcentage des cellules qui sont entrées en apoptose [94]. Le dosage de l'activité d'autres caspases telles que la caspase 8 ou 9 permet de raffiner l'étude par la précisant des voies apoptotiques activées : intrinsèques ou extrinsèques. L'étude de l'activation de caspases peut être aussi effectuée par une analyse Western Blot, qui permet de visualiser le clivage activateur de ces enzymes ou par la mesure de l'activité enzymatique des caspases à l'aide des molécules fluorescentes.

b) Etude de la génotoxicité

La génotoxicité est définie comme étant l'effet de toute substance génotoxique ou mutagène. Celle-ci peut être de nature chimique ou physique, qui peut provoquer des dommages à l'ADN et peut donc entraîner une modification ou une mutation génétique, une altération chromosomique et dommage à l'ADN. La génotoxicité présente un facteur de risque d'une haute importance pour les effets toxiques à long terme tels que la carcinogenèse.

En nanotoxicologie, les dommages de l'ADN peuvent être sous la forme de simple et/ou double-bris non réparés et survenus suite à une exposition aux nanoparticules par les changements de l'environnement oxydatif, l'apoptose, ou par des interactions entre l'ADN et les nanoparticules si les nanoparticules transloquent dans le noyau, résultant en ce qu'on appelle la nanogénotoxicité [95]. L'échelle ou échelonnement de l'ADN, est la plus ancienne technique de dosage des dommages de l'ADN, cette fragmentation est caractérisée par

l'isolement et le marquage par fluorescence de l'ADN des cellules exposées à un toxique potentiel en culture notamment les nanomatériaux. Les dommages de l'ADN sont ensuite détectés par électrophorèse sur un gel. Depuis ces dernières années, les dommages de l'ADN sont plutôt déterminés par l'utilisation du test des Comètes (ou *single cell gel electrophoresis* SCGE). Au cours du test des Comètes, qui est à l'origine décrit par Singh *et al.*, (1988) [96] les cellules sont enrobées dans du gel d'agarose, sont lysées et l'ADN dénaturé, qui est ensuite soumis à un marquage au bromure d'éthidium (pour la quantification) et à une électrophorèse (pour la séparation). La quantité de dommages de l'ADN est indiquée par la quantité de résidus, ou des fragments d'ADN de la queue après l'électrophorèse. De nombreuses études ont utilisé le test de comète pour déterminer les dommages à l'ADN lors de l'exposition aux NPs [67]. Par exemple, Barnes *et al.* a montré qu'après exposition des cellules aux NPs de TiO₂ à des concentrations testées de 4 et 40 mg/mL, il n'y a pas d'effet génotoxique de ces nanoparticules [97].

Un autre test de dommages de l'ADN est aussi réalisé, le test TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling). Ce test repose sur la rupture de l'ADN double brin, comme les dommages nécessaires à la fragmentation de l'ADN au cours de l'apoptose. La méthode la plus populaire pour ce test utilise l'ADN polymérase I exogène pour réparer l'ADN nucléaire fragmenté et isolé. La polymérase est additionnée avec le 5-bromo-2 désoxyuridine (BrdU), qui est un analogue synthétique de la désoxythymidine. Le BrdU dans est incorporé dans les ruptures doubles brin réparées dans les cellules apoptotiques. Par la suite, un anticorps anti-BrdU conjugué à la FITC est utilisé pour marquer l'ADN qui a incorporé le BrdU pour déterminer les cassures double brin dans l'ADN nucléaire. Un autre test qui est largement utilisé dans les études de génotoxicité, le test d'Ames. Ce test mesure la formation de colonies de révertants bactériens; il a été nommé en l'honneur de Bruce Ames, qui a identifié et signalé pour la première fois l'utilité de ce test dans la détection de mutations en 1975 [98,99]. Ce test dépend de la capacité des produits chimiques mutagènes entre autres les NMx (utilisés récemment) à provoquer des mutations inverses dans les souches de *Salmonella typhimurium* qui ont des mutations dans le gène de l'histidine lié à la croissance. Dans le test d'Ames, les bactéries auxotrophes qui nécessitent l'acide aminé histidine pour la croissance sont traitées avec un produit chimique d'essai ou un véhicule ou un témoin positif ou encore les NPs ou NMx sur une plaque de gélose constituée de milieux de croissance dépourvus d'histidine. Par conséquent, seules les bactéries qui sont revenues au locus d'histidine de type sauvage sont maintenant capables de se développer et de

former des colonies. Le test d'AMES est très utilisé pour évaluer les effets des NMx tels que les NPs d'argent et de titane [100–102].

c) Etude du stress oxydatif

Les nanomatériaux ont la capacité d'oxyder les constituants de leur environnement tels que les tissus, les cellules ou bien les milieux de culture cellulaires. Cette capacité est appelée potentiel oxydatif des nanomatériaux et engendre un stress oxydatif défini comme étant le déséquilibre entre les entités pro et anti-oxydantes (Figure 21) [103]. A travers les réactions physico-chimiques, le stress oxydatif résulte à la formation anormalement élevée des espèces réactives de l'oxygène intracellulaire (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) telles que l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), les radicaux libres, radical hydroxyle ($\text{OH}^\cdot$), radical peroxy ($\text{ROO}^\cdot$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et des composées plus stables comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; ou espèces réactives de l'azote (RNS pour *Reactive Nitrogen Species*) telles que l'oxyde nitrique ($\text{NO}^\cdot$), l'anion peroxynitrite (ONOO^-), l'acide peroxynitrique (ONOOH) et l'anion nitrosoperoxydicarbonate (ONOOOCO_2^-) [103]. Le stress oxydatif est impliqué dans l'activation des voies de transduction du signal cellulaire conduisant à la sur-régulation des systèmes de défense antioxydants, des réponses inflammatoires, la prolifération cellulaire ou la mort cellulaire, en fonction de la niveau et la durée de son induction [103,104].

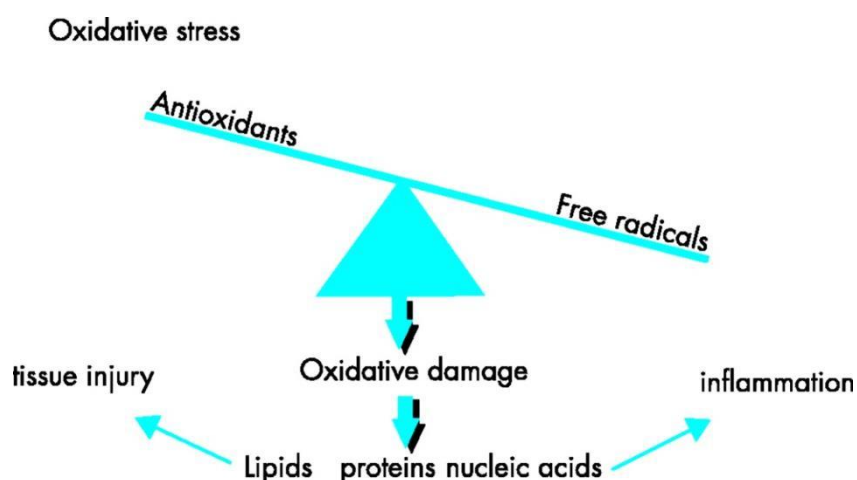


Figure 21 : Causes et effets du stress oxydatif [104]

En outre, un déséquilibre plus prononcé de la capacité antioxydante du système biologique et la production de ROS est connu pour avoir de nombreuses implications toxicologiques et

conduire directement à des dommages oxydatifs irréversibles aux molécules y compris les protéines, les lipides et l'ADN. Le nombre des études nanotoxicologiques sur les effets des nanoparticules sur l'équilibre oxydatif est sans cesse croissant et ouvrant les portes à des larges discussions. En effet, ce concept est né de multiples recherches effectuées sur plusieurs années antérieures avec des poussières minérales comme la silice cristalline, la poussière de charbon et les fibres d'amiante. Les investigations avec ce type de poussières toxiques, bien connues, ont démontré que la génération de ROS et le stress oxydatif sont causalement impliqués dans les effets pathogènes de particules. Parallèlement à ces gains de connaissances, des avancées intéressantes ont été faites dans le développement de tests qui déterminent la génération de ROS et/ou les réponses au stress oxydatif induit par de telles particules [67]. Avec l'émergence identification des effets aigus et à long terme sur la santé des particules de l'air ambiant et l'identification du stress oxydatif en tant qu'acteur majeur, des mesures de ROS et du stress oxydatif ont également été introduites pour l'évaluation toxicologique de ces mélanges particuliers de pollution de l'air. Ainsi, ces avancées de recherche ont conduit à considérer les mesures du potentiel oxydatif de ces particules et des NPs comme un outil puissant pour l'évaluation de la toxicité des NPs. Diverses méthodes et tests existent aujourd'hui [103].

Les mesures du stress oxydatif pourraient se faire dans deux conditions acellulaires et cellulaires. Les dosages cellulaires peuvent être plus pertinents et prédictifs car ils reflètent les propriétés oxydantes générées par les NPs dans un microenvironnement biologique. A l'inverse des dosages hors cellules, les mesures à base de cellules sont souvent plus faciles à réaliser et reflètent le résultat de la capacité intrinsèque des NPs à produire des ROS et à perturber les mécanismes de la cellule et son subcellulaire microenvironnement.

Ces tests peuvent être grossièrement divisés en ceux qui permettent d'identifier et de quantifier les ROS, tels que la résonance paramagnétique électronique (RPE) ou des dosages avec des sondes fluorescentes innovantes, alors que d'autres dosages ont moins de spécificité et sont sensibles à plusieurs espèces. En RPE, la sonde 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine (TEMP) réagit avec O^2 pour former un radical stable (TEMPO) qui peut être détecté directement. Cependant, cette technique est généralement évitée en raison du coût relativement élevé de l'instrumentation EPR [103]. Les sondes fluorescentes réactives aux ROS sont largement utilisées pour évaluer la production de ROS *in vitro*. Cependant, l'interprétation mécanistique des résultats de ces tests peut être trompeuse à cause de non spécificité des sondes. Parmi les sondes les plus utilisées en nanotoxicologie il y a la 2',7'diacétate de dichlorofluorescéine

(DCFDA). La DCFDA est un produit chimique qui permet la détection de ROS induites par les NPs par spectroscopie de fluorescence dans des essais acellulaires ainsi que dans des essais cellulaires. Le produit chimique non fluorescent DCFDA est converti en présence de ROS en dichlorofluorescéine (DCF) fluorescent. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de ROS. Cette approche est fréquemment utilisée pour détecter la totalité de ROS intracellulaires induites. Elle présente des avantages tels que sa haute sensibilité et que l'information de l'induction de ROS pourrait également fournir des liens directs avec d'autres effets toxicologiques. Cependant, la méthodologie est également connue pour montrer des interférences, par exemple avec les NPs elles-mêmes ou le milieu cellulaire ainsi qu'avec des substances intracellulaires [105]. Un avantage majeur de cette technique est l'utilisation d'un lecteur de plaque de fluorescence facilement disponible pour l'analyse du potentiel oxydatif des NPs ainsi que la capacité de localiser la production intra- et intercellulaire des ROS d'une manière spécifique par imagerie.

2. Evaluation de la toxicité *in vivo*

a) Etude de la biodistribution et la clairance

Les études de biodistribution et de clairance ont généralement pour but d'examiner le processus global de localisation des nanoparticules dans les tissus ou les organes et de suivre le passage des nanoparticules dans l'organisme au cours du temps. Plusieurs revues décrivent l'impact des propriétés des nanoparticules, telles que la composition des particules, leur taille, leur composition ainsi que leur propriété de surface, sur les taux de distribution et de clairance. Les nanoparticules sont détectées chez des animaux entiers vivants ou récemment sacrifiés et dans les tissus en utilisant la fluorescence (native ou marquée) ou la scintillation (*via* les radiomarqueurs), l'ICP-MS ou l'ICP-AES (en utilisant les homogénats des échantillons de tissus) [106–108]. En outre, il peut y avoir un examen brut des changements morphologiques pour des organes entiers. Un autre sous-ensemble d'études de biodistribution examine l'efficacité des nanoparticules ciblées sur les tumeurs *in vivo*. Les études de clairance sont effectuées à long terme de l'étude du métabolisme et de l'excrétion des nanoparticules à divers moments après l'exposition. Ceci est en grande partie fait par l'examen des échantillons de sang ou des animaux sacrifiés lors de l'étude pour déterminer la quantité de nanoparticules présents. La méthode de quantification des NPs, utilisant ICP-MS, radiomarquage et la fluorescence, dépend du type ou des propriétés des nanoparticules en cours d'étude [109].

La biodistribution des nanoparticules et les études de clairance fournissent un aperçu de la localisation de ces NPs, de leur rétention et de leur passage dans l'organisme de l'animal. Cependant, comme beaucoup de techniques de quantification largement utilisées nécessitant l'ajout d'une étiquette radiologique ou fluorescente, la présence de ces étiquettes peut modifier la biodistribution et la clairance de ces nanoparticules. Il reste un grand besoin de méthodes analytiques rapides pour la détection et la localisation de nanoparticules *in vivo*.

b) Etude des paramètres hématologiques et biochimiques

L'un des tests de toxicité *in vivo* les plus courants consiste à examiner la composition sanguine. Cet examen se fait à la fois sur le type cellulaire et sur la biochimie sérique, pour évaluer les changements qui se produisent après l'exposition aux nanoparticules. Dans ce genre d'investigation, l'instabilité des paramètres sanguins est utilisée comme un indice de la toxicité, où tout écart, soit augmentation ou diminution des constituants sanguins, par rapport à la normale est indicateur de toxicité. En hématologie, la population cellulaire, telles que les globules rouges et blancs ou encore les lymphocytes T et les macrophages, et la distribution sont considérées au cours de ces études. Les investigations de l'hématologie et de la biochimie sérique sont généralement réalisées sur des analyseurs automatisés, après la collecte du sang total de l'animal. Les populations cellulaires sont généralement distinguées en utilisant des seuils de volume à indiquer le type cellulaire, comme les plaquettes ou les globules rouges, qui sont triés après la classification du volume et comptés, mesurés comme changements de résistivité à travers une ouverture, similaire au comptage et dimensionnement effectué en cytométrie de flux. L'échantillon de sang prélevé provient d'animaux vivants après exposition, ou d'animaux récemment sacrifiés [67].

Nos collègues du laboratoire à la Faculté des Sciences de Bizerte ont largement étudié les effets des NPs sur la formule sanguine des rats [110–112]. Rihane *et al.*, en administrant des TiO₂-NPs, ont rapporté que la concentration d'hémoglobine, l'hématocrite et le pourcentage de globules rouges et de globules blancs sont demeurés inchangés, mais la numération plaquettaire a augmenté de façon significative chez les rats traités. L'étude de Ben-Slama *et al.*, (2015) a montré que l'exposition subaiguë aux ZnO-NPs module légèrement le nombre de globules rouges, de globules blancs, d'hématocrite, d'hémoglobine et de plaquettes. Les indicateurs biochimiques sériques typiques examinés sont : l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST), la phosphatase alcaline, la bilirubine totale, l'albumine, la créatinine, l'hémoglobine, l'urée, et les protéines totales. Les études de Rihane *et al.*, et de

Ben-Slama *et al.*, réalisées en 2015 ont rapporté toutes les deux une augmentation significative de l'ALT et de l'AST suite à des injections intrapéritonéales des TiO₂-NPs ou à des administrations orales des ZnO-NPs respectivement, avec stabilité des autres paramètres biochimiques notamment le taux de glucose, de la créatinine et de l'acide urique. Dans une autre étude, Huang *et al.*, ont étudié l'impact des nanoparticules Au-Au₂S sur les niveaux sériques, la mesure de neuf indicateurs biochimiques différents, entre 3 et 14 jours après l'exposition [113]. L'étude et la mesure de ces paramètres biochimiques et hématologiques ont pour objectifs d'apporter les informations nécessaires liées aux fonctions rénale, hépatique et médullaire en cas d'atteinte de ces organes suite à l'exposition aux NPs.

c) Etude histologique

Un autre test *in vivo* largement utilisé est l'examen de changements histologiques pour des cellules, tissus ou organes prélevés après exposition aux nanoparticules. L'examen histologique est effectué sur les tissus qui ont été fixés après le sacrifice de l'animal exposé ou non aux nanoparticules, ainsi les changements dans la morphologie des tissus et des cellules sont évalués en utilisant la microscopie optique. La procédure standard pour la préparation histologique est de fixer le tissu ou l'organe avec du formol ou du formaldéhyde, qui est ensuite intégré dans paraffine et sectionné par microtome en fines sections généralement de l'ordre de 4-7 µm [67]. Les sections fines obtenues peuvent ensuite être colorées avec des colorants, le plus souvent la coloration H & E ou l'hématoxyline (colore le noyau ou les acides nucléiques en bleu) et l'éosine (colore le cytoplasme en rose). Bien que cette technique ait été largement utilisée depuis le 19^{ème} siècle, elle a des limites, la plus importante étant la possibilité d'artefacts induits par le processus de fixation, d'encastrement, de sectionnement ou de coloration.

Les tissus typiques examinés après l'exposition aux nanoparticules comprennent : le cerveau, les yeux, les poumons, le foie, les reins, la rate et le cœur. Dans un exemple, Lin *et al.*, ont examiné l'histopathologie et la biodistribution de la « Quantum Dot » disponible dans le commerce, QD705, pour développer un modèle théorique pour prédire la distribution des tissus et la rétention chez la souris. Ils ont examiné la localisation QD, la distribution tissulaire et le métabolisme/excrétion pour une durée de plus de 6 mois après une exposition par voie intraveineuse. Les chercheurs ont trouvé que même s'il y avait peu de preuves de toxicité, observée en microscopie optique, il y avait des dommages aux tissus lorsqu'ils sont examinés par MET [114]. Les études plus récentes de Rihane *et al.*, (2015) [111] et Ben Slama *et al.*, (2015) [112] ont rapporté l'existence d'un syndrome inflammatoire au niveau des organes

cibles tels que le foie, le poumon et le cerveau des rats suite à l'exposition aux NPs de TiO_2 et de ZnO respectivement. Les études histopathologiques mettent en évidence les changements morphologiques, ce qui suppose que la toxicité est corrélée avec les changements morphologiques des tissus et des cellules à une échelle qui peut être visualisée par microscopie optique.

Spécifiquement pour la détection du fer, il existe une coloration appelée « Perl's » qui permet de mettre en évidence le fer insoluble sous forme de grains bleu-vert dans le cytoplasme des cellules ou le fer qui est en réserve dans les macrophages (Figure 22). La lecture au microscope, après coloration de Perls, est délicate car les grains de couleur bleu sont souvent peu visibles et leur dénombrement est relatif et dépend en partie de l'opérateur [115].

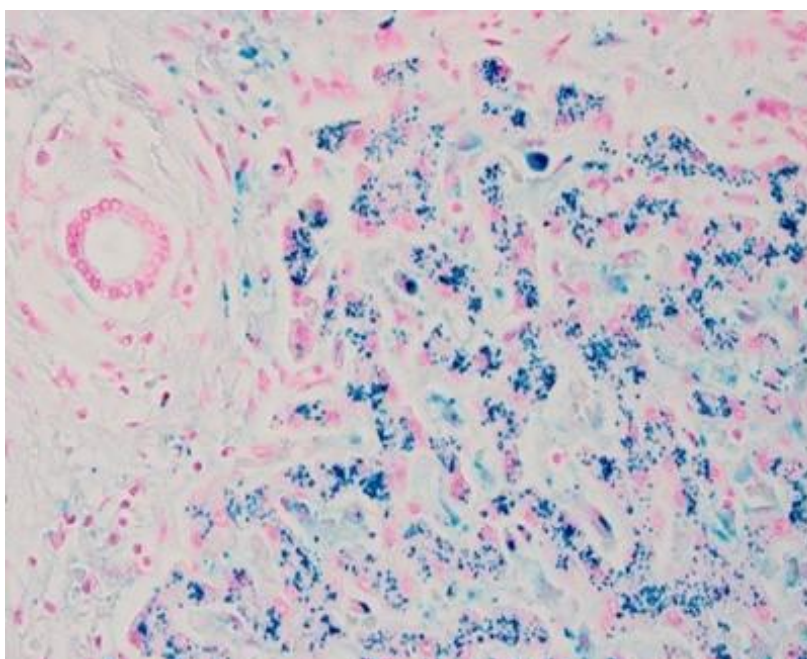


Figure 22 : Accumulation cytoplasmique du fer après coloration de Perl's

www.urmc.rochester.edu

d) Etude comportementale

Les études du comportement suite à une exposition aux nanoparticules ont pour objectif d'évaluer les effets de ces NPs sur l'émotion, la dépression, la locomotion, l'apprentissage ou bien la mémoire chez les animaux.

Ces tests sont bien définis pour les animaux murins, rat et souris, et le poisson zèbre. Les tests de comportement les plus utilisés pour les modèles murins sont le labyrinthe en croix surélevé pour les études sur le comportement à risque et le comportement anxieux, l'« open field » pour les études de l'activité locomotrice générale et du comportement à risque et/ou anxieux, et le test de la piscine de Morris qui est un test d'apprentissage spatial et de mémoire dans

l'eau. Pour l'étude du comportement chez le poisson zèbre, le test de préférence de place conditionné est un excellent exemple d'un test comportemental du poisson zèbre qui est l'analogue du labyrinthe en croix surélevé pour les rongeurs et a les mêmes objectifs. Le test de réponse de plongée est spécifique au poisson zèbre. Cependant, il se compare très bien à l'« open field » lorsqu'il est utilisé comme un test d'anxiété. D'autres tests existent aussi notamment le « Rotating Drum Concealment Assay », le « T-Maze », « Tap-Elicited Startle Reflex » et le « Three-Chamber Maze ».

Différentes études ont été menées, dans ce cadre, telles que celles de Amara *et al.*, 2014 et 2015 [110,116] et de De Souza JM *et al.*, 2018 [117] sur les effets cognitifs des ZnO-NPs, de Rihane *et al.*, 2015 [111] sur la toxicité des TiO₂-NPs, de Li *et al.* 2017 [118] sur les effets des SiO₂-NPs chez le poisson zèbre, Mrad *et al.*, 2018 [119] sur l'étude de la toxicité des Al-NPs, et celle de Sheida *et al.*, 2017 [120] sur la toxicité des Fe-NPs. Les résultats de ces études principalement sur les ZnO-NPs présentent des contradictions. En effet, d'après les études d'Amara *et al.*, en 2013 et 2014 suite à l'injection unique d'une dose de 25 mg/kg par voie intraveineuse ou intrapéritonéale respectivement, ce type de NPs n'a aucun effet sur les performances cognitives des rats. En 2015, Ben-Slama *et al.*, ont rapporté le même résultat suite au traitement des rats avec des ZnO-NPs à la dose de 10 mg/kg de poids corporel par gavage oral pendant 5 jours consécutifs [112]. Cependant, l'étude récente de De Souza JM *et al.*, en 2018 a démontré que les ZnO-NPs sont responsables de l'anxiété des souris traitées testée par le test « Open-field ». Les souris ont été exposées à des concentrations de ZnO-NPs ($5,625 \times 10^{-5}$ mg/kg) à un niveau toxique (300 mg/kg) par injection intrapéritonéale journalière pendant cinq jours. Les résultats obtenus montrent que l'exposition aux ZnO-NPs induit un comportement anxiogène suite à l'accumulation du zinc au niveau du cerveau. Les tests du labyrinthe en croix surélevé et de la nage forcée étaient négatifs [117]. Rihane *et al.*, 2015 et Sheida *et al.*, 2017 ont rapporté l'effet anxiogène des TiO₂-NPs et des Fe-NPs respectivement par le test du labyrinthe en croix surélevé [111,120].

3. Etude de l'internalisation et la localisation intracellulaire des nanoparticules

Plusieurs méthodes sont disponibles pour détecter et/ou quantifier l'absorption de nanoparticules. La cytométrie de flux FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) représente une méthode robuste et rapide qui permet de mesurer l'internalisation des nanoparticules marquées par fluorescence dans des milliers de cellules individuelles [121–123].

La Spectrométrie de masse à plasma induit ICP-MS ou ICP-OES (*Optical Emission Spectrometry*) permet aussi d'évaluer l'internalisation et la biodistribution des NPs par leur comptage en milieu biologique, à l'intérieur des cellules [67,124]. Cependant, ces techniques ont des limites en ce qui concerne la différenciation des particules internalisées et des particules adhérentes à la surface. Les tentatives pour résoudre ce problème comprennent la destruction des particules suivie de l'élimination par lavage, la mesure de la fluorescence en présence et en l'absence de désactivateurs de fluorescence, la détection de particules liées à la surface avec des réactifs secondaires non pénétrants ou l'utilisation de fluorochromes aux acides nucléiques. Néanmoins, ces méthodes sont spécifiques de certaines particules et / ou certains fluorochromes, rendant les comparaisons de données difficiles entre différents types de nanoparticules. La mesure parallèle à différentes températures, 4 °C et 37 °C et la soustraction des valeurs de 4 °C de celles obtenues à 37 °C est une autre technique fréquemment utilisée. La limite de cette technique est que les NPs ont la possibilité de pénétrer même à basse température par des mécanismes indépendants de l'énergie.

La microscopie électronique à transmission est largement utilisée pour étudier l'internalisation et la localisation des NPs [109,125]. Cette technique permet d'identifier les voies d'absorption cellulaire et l'emplacement final des particules internalisées. La microscopie confocale à balayage laser a été largement utilisée aussi pour vérifier l'internalisation, mais est généralement considérée comme une technique qualitative et non pas quantitative. Une technique récemment introduite dans ce genre d'analyse est la cytométrie en flux d'imagerie qui fournit à la fois des données FACS et des images microscopiques de cellules.

4. Les approches omiques

Au cours des dernières années, les principes, la méthodologie et les techniques utilisés en toxicologie ont changé et ces développements ont également influencé la Nanotoxicologie et les tests de toxicité sur les nanoparticules. Ce changement est résumé dans l'introduction de l'analyse quantitative des changements moléculaires et fonctionnels dans plusieurs niveaux d'organisation biologique. La nouvelle stratégie, appelée toxicologie des systèmes « Systems Toxicology », a modifié l'approche actuelle qui s'appuie presque exclusivement sur les réponses phénotypiques à forte dose chez les animaux. Les technologies de base en toxicologie des systèmes sont les techniques « omiques ». Ces technologies omiques ont également été utilisées pour les études nanotoxicologiques *in vitro* et *in vivo* [126,127]. En effet, les approches omiques permettent une meilleure compréhension des processus et

événements cellulaires en utilisant des données à grande échelle. En particulier, les technologies omiques à haut débit ont permis l'utilisation de données à grande échelle pour générer de nouvelles découvertes liées à la toxicité des NPs et leurs mécanismes d'action. L'avantage de ces nouvelles technologies pourrait être l'identification de nouvelles cibles et biomarqueurs suite à l'exposition aux NPs. De tels marqueurs seraient très utiles comme l'exposition aux NPs se produit à des faibles niveaux. En effet, en cas d'utilisation de niveaux d'exposition réalistes dans les tests *in vitro* conventionnels, il est possible qu'aucun changement phénotypique ne se produise à cause de la courte durée de l'exposition. D'autre part, l'application de doses plus élevées peut conduire à une réponse cellulaire différente influencée par l'agglomération des nanoparticules et la stabilité de la dispersion qui dépendent beaucoup de la densité des particules.

Le suffixe « omique » signifie « la complétude et la plénitude ». L'épigénomique, la génomique, la transcriptomique, la métabolomique et la protéomique constituent les « omiques » (Figure 23).

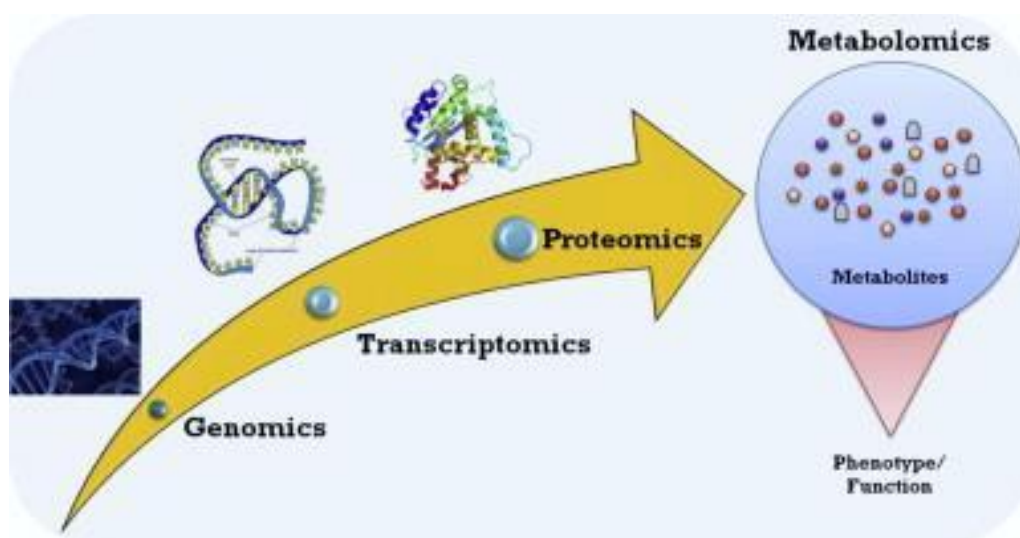


Figure 23 : Schéma représentatif des « omiques » [128]

Ces études diffèrent de l'observation classique des phénotypes dans la mesure où elles peuvent fournir principalement des informations mécanistiques et identifier les voies et les mécanismes de la toxicité. Ainsi, ces technologies offrent la possibilité d'identifier des réponses adaptatives à des faibles doses de toxiques qui ne provoquent pas encore de toxicité mais soumettent les cellules ou les organismes à un stress qui reflète la situation d'exposition

aux particules. L'identification du stress cellulaire est importante et précoce car la toxicité se produit lorsque le système de compensation est épuisé.

a) La génomique

La génomique est une discipline scientifique qui étudie les séquences du génome d'un organisme ou d'un organe dans une condition bien définie. Le génome qui est défini comme étant l'ensemble des gènes est étudié de façon globale en ce qui concerne l'organisation, la stabilité du matériel génétique, la réplication et la réparation de l'ADN, ainsi que la régulation de l'expression et de l'évolution de génome et enfin la génomique des populations. La régulation par les miARN fait partie de l'étude des effets épigénétiques, qui sont des modifications héréditaires du phénotype ou de l'expression génique non provoquées par des modifications de la séquence de l'ADN. Les miARN sont des indicateurs précoces des dommages cellulaires et peuvent être détectés dans le sang périphérique. Avec seulement environ 2000 miARN, miRNomics pourrait être une meilleure base pour les études de toxicité que l'analyse de l'expression du génome entier. Cette technologie est utilisée pour investiguer l'hépatotoxicité, la cardiotoxicité et la néphrotoxicité. Le profil qPCR du miARN a également identifié des effets systémiques après l'inhalation de particules d'échappement diesel [129]. Cependant, jusqu'à l'heure actuelle, la contribution du miARN dans la régulation des effets toxicologiques n'est pas complètement maîtrisée [130]. En outre la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles d'histones et le remodelage de la chromatine font partie de l'épigénome. La méthylation de l'ADN est le principal mécanisme de régulation négative de la transcription génique en empêchant la transcription. Les changements épigénétiques jouent un rôle important dans la transformation et la mutation des cellules et, par conséquent, peuvent servir d'indicateur de la génotoxicité. Néanmoins, la pertinence biologique d'un épigénome altéré n'est pas encore bien élucidé car l'hypométhylation de l'ADN peut provoquer le cancer mais peut aussi être une conséquence de l'état transformé induit par des voies de signalisation cellulaire altérées. Par conséquent, l'épigénétique n'est pas encore considérée comme technique d'évaluation pré-clinique de routine des médicaments [131].

b) La transcriptomique

Le transcriptome représente l'ensemble des transcrits ou des ARNm présents dans une cellule ou un organisme et est étudié par la transcriptomique en utilisant un panel de techniques de biologie moléculaire comme l'analyse des puces à ADN et le séquençage de nouvelle

génération (Next Generation Sequencing), appelé ARN-Seq. La transcriptomique est largement utilisée pour cribler la toxicité des molécules d'ARN associées et pour élucider les mécanismes de toxicité. Suite à des expositions toxiques environnementales, industrielles et médicamenteuses, plusieurs analytes biologiques ont été analysés par transcriptomique [132–135]. De plus, la transcriptomique contribue à l'étude complète des réponses cellulaires induites par les NPs à l'aide d'un logiciel bioinformatique [136]. Cependant, la transcriptomique présente certaines limites. En effet, bien qu'elle fournisse des données en grande quantité provenant de cellules traitées ou exposées à des NPs, ces données sont qualitatives et n'établissent pas de relation directe avec la pathologie ou la toxicité des NPs. Les chercheurs en nanotoxicologie tentent de surmonter ces lacunes de la transcriptomique en utilisant d'autres méthodes omiques telles que la métabolomique et la protéomique. De plus, la métabolomique facilite l'identification d'un phénotype basé sur la réponse cellulaire et fournit des données quantitatives pour compenser les limites de la transcriptomique [137].

c) La protéomique

La protéomique décrit l'analyse de protéines sur les plans fonctionnel, structural et anatomique. Cette méthode fournit beaucoup plus d'informations claires sur les réponses cellulaires que la régulation génique. En effet, les réponses cellulaires protectrices sont souvent gérées par des modifications rapides ou des changements dans la localisation cellulaire des protéines [126]. Plusieurs groupes de recherche exerçant dans le domaine de la toxicologie ont utilisé des approches protéomiques quantitatives et qualitatives. Les études toxicoprotéomiques se basent sur l'application de l'approche protéomique en toxicologie mécaniste avec nombreuses classes de substances toxiques, allant des médicaments et produits naturels aux métaux, ou des produits chimiques industriels aux nanoparticules et aux nanofibres [138]. Ainsi, la toxicoprotéomique utilise les résultats prospectifs de la protéomique dans la recherche toxicologique en mesurant l'altération des protéines globales présentes dans les cellules, les tissus ainsi que les différents biofluides, ceux qui sont exposés à des substances toxiques telles que les NPs. La toxicité médiée par les NPs implique un système cellulaire altéré comprenant la morphologie cellulaire, la différenciation cellulaire, le métabolisme cellulaire, la mobilité cellulaire, l'immunité cellulaire, qui est induit par les effets secondaires de la formulation/taille nano et conduisant à l'apoptose et à la nécrose [139]. La protéomique en tant que technique sophistiquée couplée à une analyse bioinformatique avancée a permis l'identification des protéines altérées en raison de l'exposition aux nanomatériaux qui pourraient fournir une nouvelle voie à la découverte de biomarqueurs

[126]. L'expression des protéines spécifiques dues à la toxicité des nanomatériaux pourrait être évaluée par une approche appelée «nanotoxicoprotéomique» [138]. En utilisant cette technique, des protéomes entiers pourraient être examinés potentiellement pour visualiser les réponses imprévues aux NPs. Pour clarifier les mécanismes des effets toxiques potentiels des NPs, différentes études nanotoxicoprotéomiques ont été réalisées *in vitro* et *in vivo*. Les NMx étudiés étaient les Au-NPs, Ag-NPs, CuO-NPs, SiO₂-NPs, TiO₂-NPs, ZnO-NPs et Fe-NPs [139].

d) La métabolomique

La métabolomique est l'analyse complète des processus chimiques, impliquant des métabolites, qui dirigent diverses fonctions cellulaires, tels que le contrôle homéostatique, le métabolisme énergétique, les cascades de signalisation cellulaire et les dommages cellulaires [140]. Plus précisément, le métabolome est défini comme étant l'ensemble de petites molécules chimiques présentes dans les fluides biologiques, les cellules, les tissus, les organismes et les échantillons biologiques. De plus, la métabolomique identifie tous les changements phénotypiques survenus en présence de la substance toxique en mesurant les changements dans les modèles d'hydrates de carbone, de lipides et d'acides aminés. En comparant la métabolomique aux autres méthodes omiques, elle se distingue par un grand potentiel pour l'analyse et la compréhension des mécanismes biologiques cellulaires affectés par les NPs.

Afin d'évaluer la toxicité potentielle des NPs en métabolomique, deux techniques peuvent être utilisées, soit la résonance magnétique nucléaire (RMN), soit la spectrométrie de masse (SM) [127]. La RMN est un outil efficace pour la détermination de la structure des composés organiques et l'analyse quantitative d'une large gamme de molécules (telles que les empreintes métaboliques) dans un extrait brut [141]. Cependant, la RMN a une sensibilité et une résolution relativement faibles et ne peut pas détecter les molécules inactives. Ainsi, il y a des limites à l'analyse complète des constituants individuels au sein d'un échantillon analysé. La SM ionise les composés chimiques et sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge. C'est l'une des méthodes les plus utilisées pour la détection ultrasensible et simultanée des métabolites par couplage avec la chromatographie en phase gazeuse ou liquide. Malgré la sensibilité de détection élevée de différents types de SM, le processus de préparation des échantillons est fastidieux et la sélectivité de différentes classes de métabolites est encore discutable par rapport à des avantages et des inconvénients [126,142].

E. Etude protéomique

1. Introduction de la protéomique

Afin d'étudier l'expression des protéines, plusieurs approches classiques ont été utilisées telles que l'analyse électrophorétique Western Blot, le dosage immuno-enzymatique (ELISA) ou l'immunohistochimie. Avant l'apparition de la protéomique quantitative, l'électrophorèse bidimensionnelle (2DGE) était la méthode de choix pour étudier le protéome entier [143]. Cependant, cette technique présente plusieurs limites telles que le manque de contexte cellulaire qui est primordial pour la compréhension des processus biologiques et des interactions protéiques.

C'est qu'en 1994, que la science a connu le mot « PROTEOMIQUE » qui a apporté avec elle des nouvelles approches et techniques pour mieux résoudre les problèmes biologiques. En effet en cette année, Marc Wilkins a défini le terme « protéome » comme l'ensemble des protéines exprimées par le génome [144,145]. Récemment, la protéomique est plutôt définie comme l'analyse à grande échelle de l'ensemble des protéines exprimées dans un système biologique particulier à un temps donné et selon un ensemble de conditions connues [146]. La protéomique en tant que discipline scientifique comprend non seulement l'identification et la quantification des protéines exprimées, mais aussi la détermination de leur localisation, de leurs modifications, de leurs interactions, de leurs activités et aussi, de leurs fonctions, créant ainsi un réseau multidimensionnel des protéines de tel organisme [147]. Grâce à son dynamisme, le protéome est directement lié à l'environnement dans lequel il est étudié. Ainsi, toute perturbation interne ou externe peut impacter ce protéome et induire des modifications des protéines. Par conséquent, l'étude du protéome doit être bien établie dans un contexte bien défini. Deux approches complémentaires en protéomique peuvent être utilisées pour analyser les protéines : l'approche descendante « Top-down » qui consiste à analyser les protéines entières et les fragmenter pour avoir une information de séquence et l'approche ascendante « Bottom-up » ou « Shotgun », par laquelle les protéines sont identifiées par analyse des peptides issus de la digestion enzymatique [148]. La découverte des biomarqueurs est habituellement effectuée par la protéomique « Shotgun » non ciblée, en utilisant des méthodes de quantification relative pour déterminer les changements d'expression protéique corrélés avec la maladie ou le traitement appliqué (le résultat est exprimé en changement comme «régulation ascendante ou descendante») [149]. Généralement l'enzyme utilisée est la trypsine

car elle présente une bonne spécificité et génère des peptides de taille relativement homogène. L'approche « Bottom-up » représente l'approche la plus répandue pour caractériser des protéomes complexes tels que ceux des lysats cellulaires ou des tissus. Ainsi, elle reste de loin la plus utilisée dans les laboratoires de protéomique, et a été choisie au cours de ce travail de recherche (Figure 24).

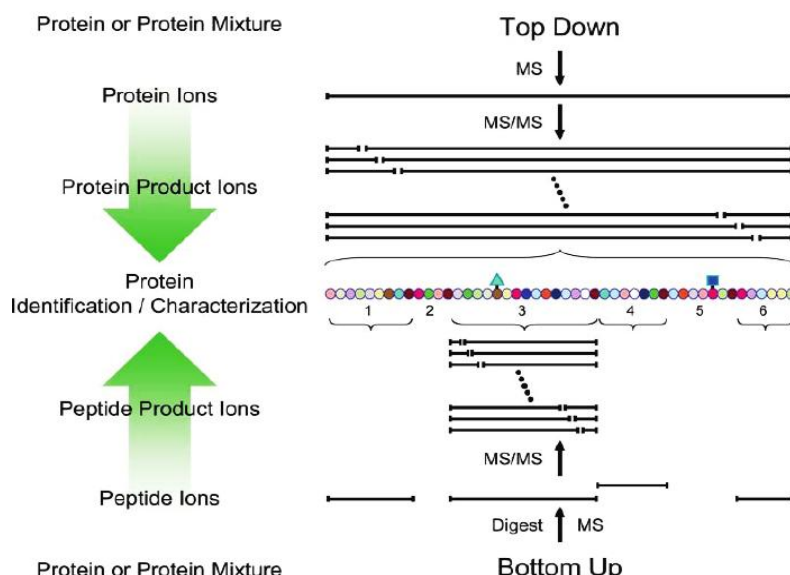


Figure 24 : les approches protéomiques “Top-down” et “Bottom-up” [148]

2. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM ou MS pour Mass Spectrometry en anglais) est une technique d'analyse chimique qui sépare des molécules individuelles chargées (ions) en utilisant leur rapport masse-sur-charge (m/z) permettant ainsi l'identification structurale et la quantification par spectromètres de masse [150]. La caractérisation de la structure chimique de la molécule est faite suite à sa fragmentation. La spectrométrie de masse est pratiquement utilisée dans tous les domaines scientifiques tels que : Chimie organique, chimie analytique, physique, astrophysique, biophysique, biologie, médecine, etc.

En protéomique, la spectrométrie de masse présente un intérêt majeur grâce à l'identification et à la quantification des protéines, et à la caractérisation de toutes les modifications qui peuvent être ou apparaître. De plus, les techniques d'ionisation MALDI (MALDI pour Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) et ESI (ESI pour ElectroSpray Ionisation) couplées aux

analyseurs sensibles et résolutifs permettent d'analyser des quantités minuscules d'échantillons de l'ordre du femtomoles.

Un spectromètre de masse permet de mesurer le rapport m/z des ions formés à partir de l'échantillon analysé. Il comprend toujours une source d'ionisation, un système d'analyse de masse (analyseur), un détecteur et un système d'enregistrement et de traitement de données. Le principe sous-jacent à la SM est la génération d'ions moléculaires qui sont séparés en fonction de leur rapport m/z et qui sont détectés par la suite de manière qualitative et quantitative par leur m/z respectif et leur abondance [150].

En générale, l'analyse protéomique basée sur la SM peut être divisée en quatre étapes de base: la préparation de l'échantillon, le fractionnement de l'échantillon, l'analyse par Spectrométrie de Masse, et l'analyse et l'interprétation des données par la bioinformatique.

3. Préparation de l'échantillon

La préparation des échantillons comprend souvent le fractionnement subcellulaire, l'enrichissement de protéines sélectionnées, l'élimination de protéines très abondantes et la dépendance aux outils de marquage de masse qui nous permettent d'effectuer la quantification des protéines dans des échantillons complexes. Les échantillons protéiques sont extraits des tissus animaux ou des lysats cellulaires. Une préparation d'échantillon efficace et reproductible est nécessaire pour obtenir une bonne couverture protéique dans toute analyse protéomique « Bottom-up ». Ainsi, la préparation de l'échantillon constitue une étape primordiale. Les solvants et détergents utilisés doivent être compatibles avec les étapes d'analyse suivantes telles que le marquage et la spectrométrie de masse. En général, les tissus et les lysats cellulaires sont soniqués dans un tampon de lyse puis centrifugés et les protéines sont récupérées avant de les doser. Une compatibilité entre l'échantillon à préparer avec la suite des étapes doit être vérifiée avant de commencer l'analyse protéomique. Pour cette raison, plusieurs nouvelles méthodes de préparation ont été introduites au cours des dernières années. Parmi celles-ci, la préparation d'échantillons assistée par un filtre (FASP) [151], le FASP amélioré [152], la préparation d'échantillons monophasée en phase solide (SP3) [153] et l'étape-stage (iST) [154] sont des méthodes de plus en plus utilisées. La méthode FASP a été particulièrement la plus utilisée, grâce à sa faisabilité dans diverses analyses protéomiques approfondies basées sur la SM [155].

4. Séparation des peptides

Lorsque les mélanges sont complexes, la séparation ou le fractionnement des peptides avant l'analyse spectrométrique a pour but de rendre l'échantillon à analyser moins complexe, en recourant à des techniques de séparation robustes. En effet, la combinaison des techniques de séparation et de détection est une approche couramment utilisée pour résoudre ce problème [156]. Les techniques chromatographiques telles que la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP ou HPLC pour High Performance Liquid Chromatography) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS) mais aussi la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS) sont largement utilisées. Parmi lesquelles, la technique de séparation la plus utilisée est la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) au cours de laquelle, les peptides sont séparés selon leur hydrophobicité. D'autres types de fractionnements supplémentaires par chromatographie de type échangeuse de cations (SCX pour Strong Cation Exchange), par électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide (SDS-PAGE) ou par isoélectrofocalisation OFF-GEL sont couramment utilisés. L'OFF-GEL est une méthode électrophorétique qui permet de séparer des protéines ou des peptides selon leur point isoélectrique en milieu liquide [157] (Figure 25).

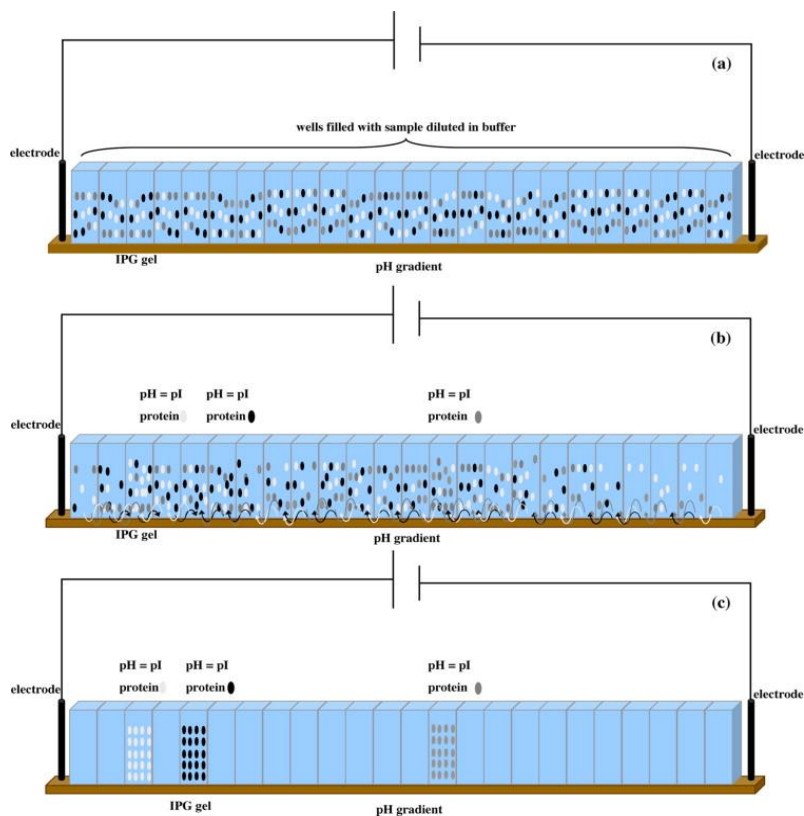


Figure 25 : L' isoélectrofocalisation OFF-GEL [157]

Cette technique a l'avantage de donner la possibilité de récupérer les échantillons fractionnés liquides et de les faire séparer encore une fois par la CLHP en phase inverse selon leur hydrophobicité afin d'améliorer le degré de simplicité de l'échantillon avant l'analyse en SM. De plus, les méthodes de séparation sont souvent combinées afin d'améliorer la couverture du protéome et le rapport signal/bruit « noise » (S/N) et réduire l'interférence entre les peptides en protéomique quantitative [156]. D'autre part, l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est connue d'être une stratégie efficace pour identifier les protéines dans des échantillons de mélanges complexes en raison de sa meilleure sensibilité. En effet, pour des caractéristiques de fragmentation des échantillons, la spectrométrie de masse MS/MS combine deux analyseurs permettant ainsi une mesure de masse complétée par des informations sur la structure et une réalisation de séquençage du peptide d'intérêt. Le principe de la MS/MS est présenté dans la figure ci-dessous (Figure 26).

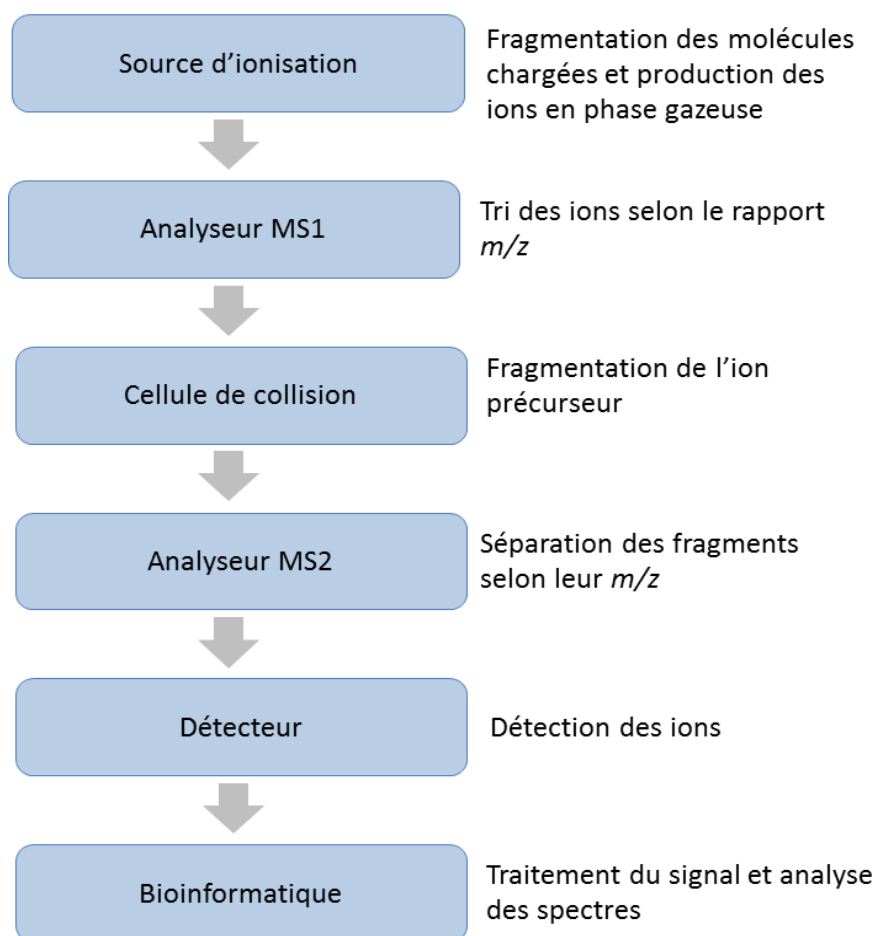


Figure 26 : Principe général de la MS/MS

Après formation de molécules chargées (ions) celles-ci vont être analysées par le premier analyseur. Ensuite parmi elles, un ion précurseur sera sélectionné et fragmenté d'une manière spécifique dans une cellule de collision qui constituée des molécules sous forme gazeuse. Finalement, les ions fragmentés issus de la fragmentation de l'ion précurseur sont analysés par le deuxième analyseur. Sur le logiciel, on obtient un spectre en MS et un spectre MS/MS après la fragmentation (Figure 27).

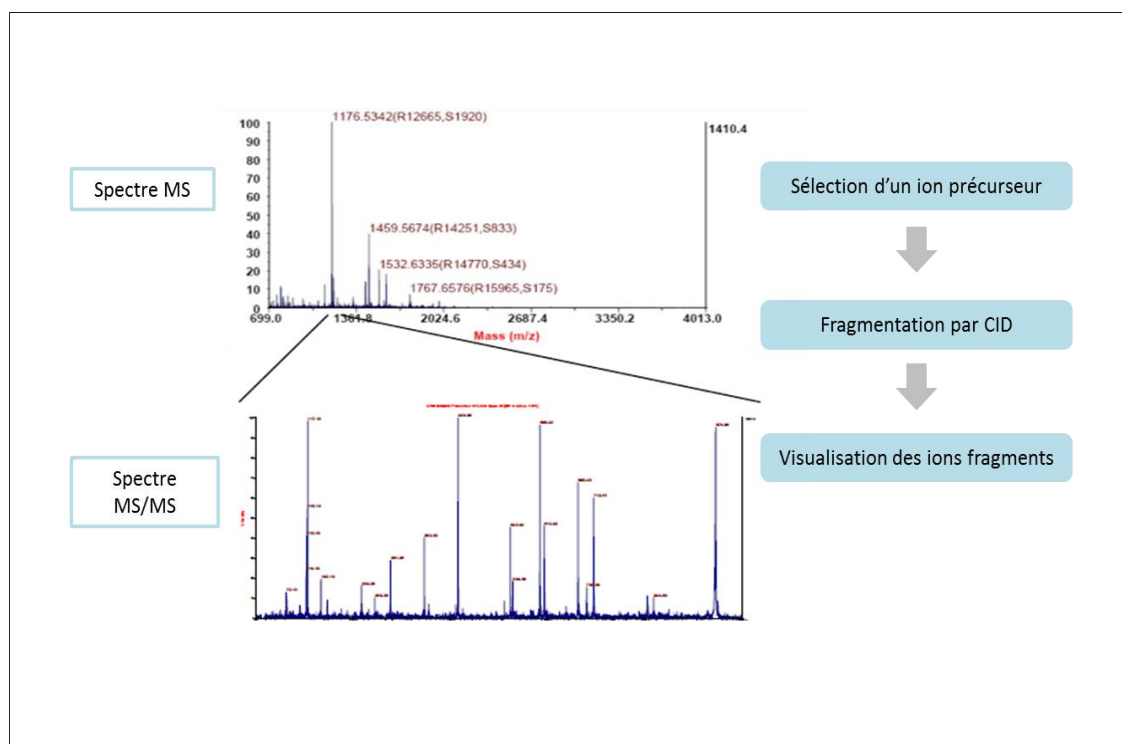


Figure 27 : Spectre MS et MS/MS obtenus

Le couplage LC-MS peut être classé en deux types : couplage *on-line* et couplage *off-line*. Dans le premier, la CLHP est directement couplée à un spectromètre de type ionisation électrospray ESI. Au cours de leur séparation les peptides arrivent à fur et à mesure à la source ESI où ils sont directement ionisés, ensuite analysés par le spectromètre de masse. En ce qui concerne le deuxième type, qui est le couplage *off-line*, la CLHP est couplée indirectement au spectromètre de masse et les différentes fractions peptidiques sont collectées à chaque élution sur des plaques spéciales pour les spectromètres de masse à source MALDI. Les deux sources d'ionisation ESI et MALDI sont des technologies d'ionisation efficaces. En effet, elles permettent une ionisation douce et une vaporisation de protéines et de peptides intacts. L'efficacité de ces méthodes et leur combinaison avec une instrumentation SM de

plus en plus sophistiquée et sensible ont permis des nouveaux avancements et découvertes pour la protéomique. En spectrométrie de masse, des propriétés telles que la puissance de résolution de masse, la résolution de masse, la précision de masse, la précision de masse et la sensibilité sont utilisées pour caractériser les performances des spectromètres de masse. Les autres propriétés de performance sont la vitesse d'analyse, la transmission d'ions et la plage dynamique. Les analyseurs de SM les plus utilisés sont les pièges à ions linéaires, Orbitrap, les analyseurs de masse à temps de vol (TOF pour Time Of Flight) et les instruments hybrides tels que le temps de vol quadripolaire (QqTOF) et le piège ionique linéaire ou Q-Orbitrap (LTQ-Orbitrap ou Q Exactive). Au laboratoire, nous avons utilisé le MALDI TOF/TOF 4800 de la société Applied Biosystems pour réaliser nos expériences. Celui-ci peut être utilisé selon trois modes différents : mode linéaire, mode réflectron et mode MS/MS.

5. Quantification des protéines par spectrométrie de masse

Plusieurs méthodes ont été développées ces dernières années pour quantifier les variations de l'expression protéique entre deux ou plusieurs conditions différentes, en comparant les peptides spécifiques à une protéine donnée entre eux. Les approches protéomiques quantitatives peuvent être absolues ou relatives. La quantification absolue est la détermination de la concentration exacte d'une protéine dans un échantillon spécifique. Au fait, grâce à l'ajout d'une quantité connue d'étalon interne au mélange étudié, il est possible de faire de la quantification absolue par spectrométrie de masse. En revanche, la quantification relative compare les niveaux d'une protéine spécifique dans différents échantillons ou conditions (par exemple, cellules traitées vs non traitées, échantillons normales par rapport aux échantillons de malades) et est généralement exprimée en tant que changement « fold change ». Pour la quantification des protéines, il y a deux approches principales, la première consiste à utiliser un marquage isotopique stable chimique/enzymatique ou métabolique (quantification basée sur un marqueur) pour générer une différence de masse entre les échantillons et le second est sans marquage.

Le principe de la protéomique quantitative basée sur le marquage repose sur l'incorporation d'isotopes stables au niveau des protéines ou des peptides. L'addition de l'étiquette isotopique telle que les portions d'isotopes lourds ^2H , ^{13}C , ou ^{15}N entraîne une différence de masse prévisible entre un peptide marqué et un peptide non marqué, permettant à l'analyseur de masse de discriminer entre les deux formes et de quantifier les intensités des signaux [158]. Les peptides marqués gardent les mêmes propriétés physico-chimiques à l'exception de leur

masse. Ces marqueurs isotopiques peuvent être introduits par approches chimiques (iTRAQ : *isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*, ICAT : *Isotope-Coded Affinity Tag*, TMT *Tandem Mass Tag*, ICPL : *Isotope-Coded Protein Label*), enzymatique (marquage H_2^{16}O / H_2^{18}O) ou au niveau des cellules vivantes *via* une incorporation métabolique (SILAC : *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*) [159]. Le niveau du marquage est plus ou moins précoce selon la méthode utilisée. Pour la quantification relative en analyse protéomique « Shotgun », il existe de nombreux types de réactifs isobariques tels que carbonyl, amine, et sulfhydryle [160].

Dans la méthode de marquage isotopique chimique iTRAQ, les peptides de chaque échantillon sont marqués au niveau des amines primaires avec un réactif spécifique après la digestion enzymatique. Pour cela, les réactifs contenant des amines primaires telles que les tampons Tris ou le bicarbonate d'ammonium doivent être évités à cause de leur incompatibilité avec la méthode iTRAQ. Après marquage individuel, les peptides des différents échantillons sont mélangés ensemble avant l'analyse en spectrométrie de masse. Chaque condition est différenciée grâce à l'ion rapporteur après fragmentation MS/MS [161]. La méthode iTRAQ est une méthode bien connue qui utilise le marquage isotopique et permet à la fois l'identification et la quantification des protéines de chaque échantillon, mettant ainsi en évidence les protéines différentiellement exprimées dans un mélange d'échantillons.

Ce marquage a été développé en 2004 par Ross *et al.*, [162] et est actuellement commercialisé par la société Applied Biosystems. Cette méthode permet une analyse multiplexe et ainsi de comparer jusqu'à huit conditions simultanément. Ainsi, les approches protéomiques quantitatives basées sur iTRAQ présentent un outil puissant pour la recherche de biomarqueurs protéiques suite à l'exposition à des produits chimiques tels que les nanoparticules et la découverte de cibles médicamenteuses spécifiques à une maladie. Les échantillons sont marqués au niveau du peptide en utilisant des réactifs iTRAQ (étiquettes isobares) et la méthode repose sur la fragmentation MS/MS des peptides avant qu'ils puissent être quantifiés. Les réactifs iTRAQ ont une valeur m/z connue et sont composés d'un groupe réactif spécifique à l'aminé et d'une combinaison de groupements «rapporteur» et «balance» [163] (Figure 28).

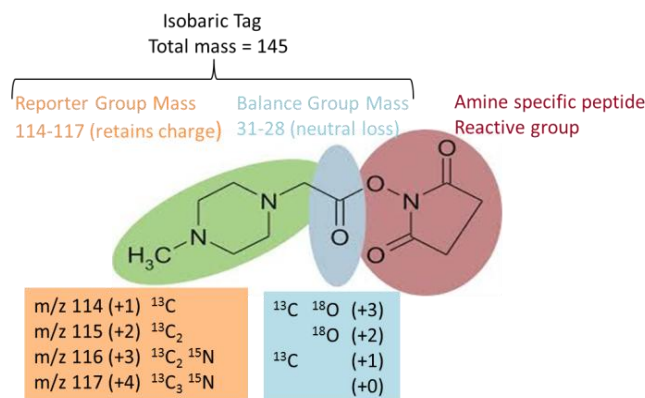


Figure 28 : Structure schématique du tag iTRAQ 4-plex

Le groupement réactif spécifique des fonctions amines est capable de se lier aux fonctions amines N-terminales des peptides et/ou aux chaînes latérales des lysines via le fragment N-hydroxy-succinimide ester. Le groupement « balance » ou « perte neutre » non chargé de 28-31 Da permet de contrebalancer les masses du groupement rapporteur et de garder la masse des groupements combinés de chaque réactif iTRAQ toujours la même (145 Da pour 4 plex et 304 Da pour 8 plex), mais après la fragmentation MS / MS du mélange de peptides marqués, le groupement rapporteur apparaît à quatre ou huit masses différentes (m/z 114-117 ou m/z 113-119) selon le marquage isotopique respectif [164] (Figure 29).

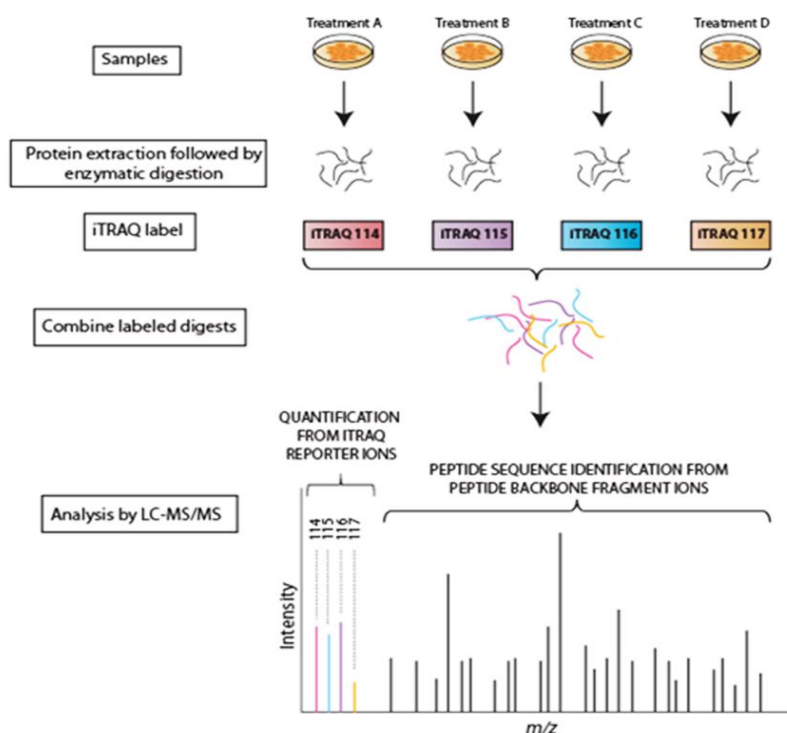


Figure 29 : Aperçu global de la méthode de marquage iTRAQ

En protéomique, le marquage isotopique est la référence standard pour la quantification. Cependant, il nécessite une ou plusieurs étapes de préparation additionnelles et peut s'avérer couteux pour les chercheurs [159]. Ainsi, la quantification sans marquage, dite *label-free*, a été exploitée de plus en plus ces dernières années. Contrairement aux méthodes de quantification basées sur le marquage isotopique, en *label-free* les échantillons à comparer sont analysés séparément [165]. Les méthodes *label-Free* fournissent donc un résultat de quantification moins précis que les méthodes basées sur le marquage isotopique mais elles permettent de comparer un nombre infini d'échantillons quelle que soit leur nature (tissu, cellule) et constituent donc une alternative très intéressante [165,166]. Néanmoins, pour que cette méthode soit la plus représentative possible, il est exigé que chaque étape de l'analyse soit contrôlée pour limiter les différents biais dus à la manipulation des échantillons. Donc, il est recommandé de limiter le nombre d'étapes de préparation des échantillons et si possible de les préparer en parallèle. L'analyse des échantillons se fait ensuite chacun à part ce qui réduit la complexité intrinsèque du mélange analysé par rapport aux échantillons mélangés après marquage différentiel.

6. Analyse Bioinformatique

Les outils bioinformatiques appliquées en protéomique couvrent aujourd'hui un large panel d'utilisations allant des outils simples pour comparer les compositions d'acides aminés des protéines aux logiciels sophistiqués pour la détermination de la structure des protéines, de leurs fonctions et de leurs interactions à grande échelle [167]. Le développement de technologies à haut débit, telles que le séquençage d'ADN, de génomes, ou de métagénomes, est à l'origine d'un grand accroissement de la quantité d'informations stockées dans les bases de données célèbres GenBank et UniProt (UniProtKB). Dans le cas d'UniProtKB / Swiss-Prot, la publication du rapport 2018-03 (du 28 Mars 2018 en ligne) contient 199 714 119 acides aminés correspondant à 557 012 entrées. Parallèlement, UniProtKB / TrEMBL (du 28 Mars 2018 en ligne) contient 37 571 599 425 acides aminés correspondant à 111 425 245 entrées. La protéomique a apporté beaucoup d'informations sur les protéines qui sont exprimées par les cellules à un certain moment du cycle cellulaire. Elle a également permis d'identifier des molécules impliquées dans les complexes multi-protéiques et un nombre croissant de modifications post-traductionnelles (PTM) présentes dans les protéines [159].

Il existe plusieurs bases de données d'interactions protéine-protéine, gratuitement disponibles sur internet, qui peuvent être utilisées pour déterminer les fonctions putatives d'une protéine sur la base de ses interactions directes ou indirectes. Les réseaux et cartes d'interactions protéine-protéine dans ces bases de données sont, en général, basées sur les informations publiées par les études de recherche scientifiques, principalement dans PubMed. Les bases de données les plus importantes et les plus utilisées par les chercheurs sont STRING, MINT, IntAct, HPRD, BioGRID, PIP, MPIDB et TAIR. En outre, des outils d'analyse plus poussés tels que Gene Ontology, DAVID, IPA, TargetMine, KEGG et PANTHER (Figure 30) ont été développés pour faciliter la cartographie des données dans ces bases de données. Tous ces outils permettent d'identifier les peptides, les protéines et leurs modifications, d'annoter les données avec les connaissances biologiques existantes. Pour le partage des données sur internet, les bases de données d'identifications protéomiques (PRIDE, www.ebi.ac.uk/pride) et ProteomeXchange (www.proteomexchange.org) sont les référentiels de choix pour les données d'identification des protéines [168]. Le système de classification PANTHER est un exemple d'outils qui couvre plusieurs axes. Il utilise les termes ontologiques afin de décrire la fonction des protéines dans les processus biologiques ou les fonctions moléculaires.

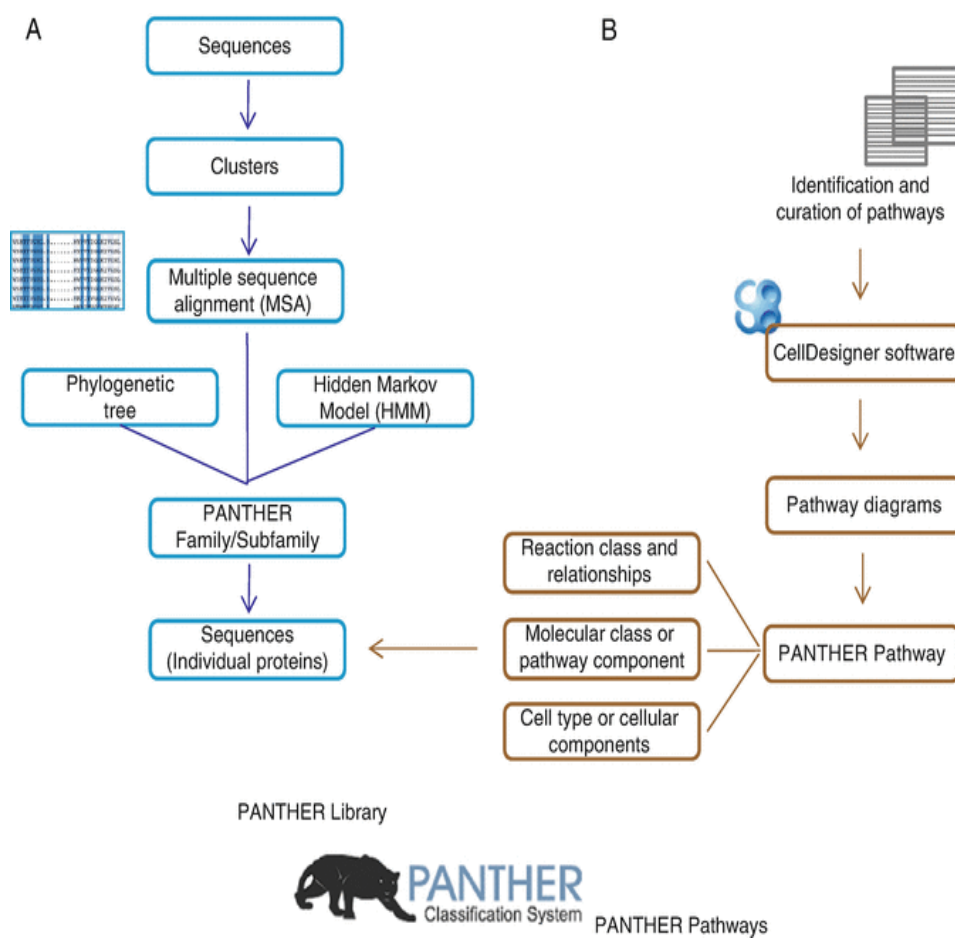


Figure 30 : Aperçu des données PANTHER [168]

OBJECTIFS DU TRAVAIL ET CHOIX METHODOLOGIQUES

III. OBJECTIFS DU TRAVAIL ET CHOIX METHODOLOGIQUES

Le sujet de la présente thèse porte sur l'étude de la biodistribution et de la toxicité des nanoparticules du fer en utilisant un modèle d'étude animal, le rat, et des modèles cellulaires tels que les cellules de neuroblastome SH-SY5Y. L'objectif de mes travaux de recherche est de développer des tests *in vitro* et *in vivo* pour évaluer la toxicité des nanoparticules de fer γ -Fe₂O₃. L'étude de la toxicité des nanoparticules implique plusieurs disciplines, la physique, la chimie et la biologie. La préparation des nanoparticules de γ -Fe₂O₃ qui sont utilisées au cours de ce projet a été réalisée par l'équipe du Laboratoire de Physique des Matériaux et des Nanomatériaux appliquée à l'Environnement à la Faculté des Sciences de Gabès sous la direction de Monsieur Lassaad El Mir. Les expériences *in vivo* ont été réalisées à l'unité de recherche de physiologie intégrée en Tunisie et les expériences *in vitro* ont été menées au sein de la plateforme de protéomique Prométhée en France.

Expériences *in vitro* : Les effets des NPs de γ -Fe₂O₃ ont été recherchés sur un modèle de cellules neuronales tel que la lignée SH-SY5Y issue de neuroblastome humain. Des études de la viabilité cellulaire et de génotoxicité ont été réalisées sur des cellules exposées aux NPs au moyen de différents types de tests complémentaires : le test MTT, le test du bleu de trypan, le test des Comètes qui permet de détecter les lésions primaires de l'ADN et la 8-oxo-7,8-dihydroguanine. De plus, nous avons utilisé le chlorure de fer FeCl₃ pour comparer les effets du fer à l'état ionique et du fer à l'état nanométrique.

Expériences *in vivo* : Le but est d'administrer par voie intraveineuse ou intranasale ou orale des doses déterminées des NPs de fer γ -Fe₂O₃ à des rats et d'étudier les effets de ces NPs sur différents paramètres hématologiques et biochimiques sériques. Une analyse histopathologique des tissus cibles (cerveau, foie et poumons) ainsi qu'une étude de la biodistribution de ces NPs a été réalisée. Le passage éventuel des NPs dans le cerveau nous a conduits à évaluer leurs effets sur l'apprentissage, la mémoire et la cognition en plus du dosage de certains neurotransmetteurs afin de conclure sur les conséquences d'une telle exposition sur le système nerveux.

En effet, il a été démontré que grâce à leurs propriétés, les nanoparticules peuvent migrer et se transloquer à travers la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le cerveau et peuvent être utilisées comme vecteurs pour délivrer des médicaments dans le cerveau et traiter des maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer. De même, notre équipe a montré que les NPs de TiO₂ provoquent des modifications du comportement émotionnel du rat d'où vient l'importance d'étudier cet effet aussi suite à l'administration des NPs de fer.

Par la suite, nous avons étudié les effets des NPs sur l'expression des protéines cellulaires dans des échantillons protéiques issus des deux études, *in vivo* et *in vitro*. L'étude protéomique permettra l'identification et la quantification des différentes protéines. A cette étape, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux protéines impliquées dans le stress oxydant, l'apoptose, l'autophagie, l'inflammation et le métabolisme pour mieux évaluer la toxicité des nanoparticules de γ -Fe₂O₃ dans les différents modèles utilisés au cours de la thèse. Cette étude a été faite par fractionnement peptidique (OFFGEL/ Nano-HPLC) après digestion trypsique des échantillons et analyse par spectrométrie de masse (MS et MS/MS). La comparaison des protéomes entre différentes conditions d'exposition, c'est à dire le contrôle et les groupes traités par les NPs de fer, a été réalisée par une méthode de protéomique différentielle (iTRAQ). Les principales voies de signalisations et les protéines dérégulées ont été validées et également étudiées par une méthodes classique complémentaire telle que le Western blot.

MATERIEL ET METHODES

IV. MATERIEL ET METHODES

A. Les nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules de Fer utilisées dans les travaux de thèse ont été fournies par le Professeur Lassaad El Mir et son équipe du laboratoire de Physique des Matériaux et des Nanomatériaux appliquée à l'Environnement de la Faculté des Sciences de Gabès- Tunisie.

1. Préparation des nanoparticules d'oxyde de fer

Les échantillons de NPs de Fe_2O_3 ont été préparés par la méthode sol-gel modifiée [169] dans des conditions supercritiques de l'alcool éthylique (EtOH), dans lesquelles, l'hydrolyse se fait lentement pour libérer l'eau par une réaction d'estérification afin de contrôler la taille des nanoparticules formées. En effet, 6 g de fer (III) acétylacétonate [$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FeO}_6$] utilisé en tant que précurseur de la synthèse sont dissous dans un 36 ml de méthanol. Après une agitation magnétique, la solution a été placée dans un autoclave et a été séchée sous des conditions supercritiques d'EtOH. Ces conditions étaient $T_c = 243\text{ }^\circ\text{C}$ et $P_c = 63,3\text{ bar}$. Le chauffage de l'autoclave a été fourni par un four commandé par un programmeur de température. La taille de particules a été réglée par un ajustement de temps d'agitation magnétique. Trois agitations successives de 15 min, 24 h et 48 h ont été utilisées pour produire des nanoparticules avec des diamètres moyens de 14 nm, 22 nm et 30 nm, respectivement.

2. Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer

Après leur synthèse, les NPs de fer ont été caractérisées à l'état de poudre par deux techniques: La microscopie électronique à transmission (MET) et la Diffraction aux rayons X (DRX).

La DRX permet de voir la taille et la structure cristallisée de ces NPs. Cette technique a été réalisée en utilisant le diffractomètre PANalytical XpertPro avec radiation Cu k ($k = 1.54178 \text{ \AA}$) dans la gamme de $2\theta = 20\text{--}70^\circ$ au degré 0.02° . La taille moyenne des cristallites est calculée à partir de la formule Scherrer $D = K \lambda / B \cos\theta$, où $k = 1,54178 \text{ \AA}$, K est une constante dont la valeur est d'environ 0,9, et B est la largeur du pic à mi-hauteur maximale (LMH) exprimée en radians. La taille et la forme des NPs ont été déterminées par un microscope électronique à transmission FEI TECNAI G2 EDAX fonctionnant à 200 keV.

En suspension, les NPs ont été caractérisées par Dynamic Light Scattering (DLS) en utilisant Malvern Zetasizer Nano ZS et DTS Nano Software. Cette technique mesure le mouvement brownien des particules et le relie à la taille des particules.

B. Etude sur modèle cellulaire

1. Mise en solution des nanoparticules d'oxyde de fer

Une solution mère de 5 mg/mL des NPs de fer a été préparée et a servi pour faire une gamme de concentrations. Cette solution a été diluée au 1:100 afin de caractériser les NPs de fer en solution par la technique de Dynamic Light Scattering (DLS). Cette technique permet de mesurer le diamètre hydrodynamique des NPs en solution et d'étudier leur état de dispersion. Dans la suspension, les NPs de fer ont été soniquées par le sonicateur pendant 60 min avec 1 min ON et 1 min OFF, puis ultrasoniquées dans un bain à ultrasons pendant 60 min vu que les NPs de fer ont tendance à s'agréger.

2. Culture cellulaire des cellules SH-SY5Y

Les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y ont été fournies par Dr Walid Rachidi du CEA de Grenoble_France. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture complet contenant du HamF12-EMEM, 0.5% pénicilline-streptomycine, 1% acides aminés non essentiels (NEAA) et 10% sérum de veau fœtal dans une étuve à 37°C sous 5% CO₂. La culture a été faite dans des flasks 75 cm² pour faire les passages nécessaires avant d'ensemencer les cellules sur des plaques 96 puits et faire le traitement par les NPs de fer.

3. Traitement des cellules par les nanoparticules de fer

Les cellules SH-SY5Y ont étéensemencées sur une plaque 96 puits à une densité de 20.10^3 cellules/puit pendant 24 heures avant le traitement. Le jour du traitement, les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes de NPs de fer : 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 µg/mL. Les cellules non traitées ont été utilisées en tant que contrôle.

4. Etude de la viabilité cellulaire par le test MTT

La viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant le test MTT, qui se base sur la réduction du colorant MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) en cristaux de formazan, un produit bleu intracellulaire insoluble, par des déshydrogénases cellulaires. La quantité de produit formé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et aussi à leurs activités métaboliques. Les cellules ont étéensemencées sur des plaques à 96 puits à une densité de 20.10^3 cellules par puits dans 200 µL pendant 24 heures. Ensuite, les cellules ont été traitées par des doses croissantes de NPs de fer ou de FeCl₃ (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 µg/mL) pour une période supplémentaire de 24 heures. Les cellules cultivées dans un milieu

de culture sans NPs de fer ont été utilisées comme témoin dans chaque expérience. A la fin de l'exposition, les cellules ont été lavées au PBS puis 200 μ L de MTT (0.5 mg/mL) ont été ajoutées à chaque puits. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures à 37°C. Ensuite, le milieu a été retiré avec précaution, les cellules sont lavées, 150 μ L de DMSO sont ajoutés et la plaque est mise sur un agitateur minimum pendant 30 min jusqu'à ce que les cristaux de formazan soient complètement dissous. La lecture a été faite à l'aide d'un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 570nm. La viabilité cellulaire a été exprimée en ratio des cellules traitées sur les cellules contrôles.

5. Etude de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion au bleu de trypan

Le bleu de trypan est un colorant soluble dans l'eau, utilisé pour le test d'exclusion afin d'évaluer la viabilité cellulaire. Quand il entre dans la cellule, ce produit entraîne un mécanisme d'exclusion pour l'éjecter à l'extérieur. La cellule vivante disposant de l'ATP peut l'éjecter, contrairement à la cellule morte. Ainsi, une cellule vivante expulsera le bleu de trypan et restera blanche au microscope, par contre une cellule morte restera bleue.

Pour se faire, 2.10^5 cellules de SH-SY5Y ont étéensemencées sur des plaques à 12 puits dans un volume de 1 mL pendant 24 heures. Ensuite, les cellules ont été traitées par des doses croissantes de NPs de fer ou de FeCl_3 (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 μ g/mL) pour une période supplémentaire de 24 heures. Les cellules cultivées dans un milieu de culture sans NPs de fer ont été utilisées comme témoin. A la fin de l'exposition, les cellules en suspension et les cellules adhérentes ont été récoltées pour le comptage des cellules vivantes et mortes. La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de nombre de cellules vivantes/ le nombre de cellules vivantes et mortes.

6. Etude du cycle cellulaire, de la taille et de la granularité des cellules par cytométrie en flux

L'étude du cycle cellulaire permet de voir si la toxicité des NPS de fer est dépendante du cycle cellulaire ou pas en quantifiant la quantité de l'ADN au cours du cycle. La mesure du cycle cellulaire par cytométrie en flux permet de distinguer trois phases : G0/G1, phase d'activation des cellules, S, phase de synthèse de l'ADN, et G2/M phase de mitose. Au cours de l'apoptose, l'analyse du cycle cellulaire permet de mettre en évidence un pic Sub-G1 (qui est localisé juste avant le pic G0/G1). Ce pic permet de déterminer la proportion de cellules en

apoptose. Pour la mesure du cycle, 7.10^5 cellules ont été cultivées dans un flask 25 cm² pendant 24h. Ensuite les cellules ont été traitées par des doses croissantes de NPs de fer (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 µg/mL) pour une période supplémentaire de 24 heures. Les cellules cultivées dans un milieu de culture sans NPs de fer ont été utilisées comme témoin. Les cellules ont été récoltées, fixées et perméabilisées avec de l'éthanol froid 70% pendant une nuit à -20°C. Puis les cellules ont été lavées et resuspendues dans 0.5 mL de PBS contenant IP (1 mg/mL) et RNases (0.5 mg/mL) et incubées pendant 30 min minimum à +4°C et à l'obscurité. Le contenu en ADN a été quantifié par la cytométrie en flux.

En cytométrie en flux, les différentes populations fonctionnant dans un cytomètre de flux peuvent être distinguées par la lumière diffusée vers l'avant (FSC), qui est un indicateur de la taille des cellules, de la forme et de l'indice de réfraction. Un autre paramètre, la lumière diffusée latérale (SSC) est liée à la complexité interne des cellules (granularité cellulaire ou inclusions cellulaires). Dans notre étude, des cellules SH-SY5Y ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits à une densité de 580.10^3 cellules / puits pendant 24 heures avant le traitement. Le jour du traitement, les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes d'IONPs : 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 µg / mL pendant 24 et 48 heures. Les cellules non traitées ont été utilisées comme témoin. Des analyses cytométriques en flux ont été réalisées sur un cytomètre en flux BD FACSCanto™ II (BD Biosciences). Dix mille cellules ont été acquises pour chaque échantillon. Les données ont été analysées avec le logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences).

7. Test de génotoxicité Comète

Pour évaluer les effets génotoxiques potentiels des NPs de fer, nous avons utilisé le test des comètes et l'enzyme spécifique à la réparation, la formamido pyrimidine glycosylase (Fpg). Des cellules SH-SY5Y ont étéensemencées sur des plaques à 12 puits dans un volume de 1 ml pendant 24 heures à une densité de 20.10^4 cellules / puits. Par la suite, les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de NPs de fer et de FeCl₃ (50 et 200 µg / ml) pendant 24 heures supplémentaires. Les cellules cultivées uniquement dans le milieu de culture ont été utilisées comme témoins. A la fin de l'exposition, les cellules en suspension et les cellules adhérentes ont été récoltées, comptées et congelées dans une solution de congélation contenant du SVF + 10% de DMSO jusqu'au jour de l'essai. Des pastilles congelées de SH-SY5Y traitées ou non avec le FeCl₃ ou les NPs de fer ont été incorporées dans de l'agarose à bas point de fusion (réf A-9414, Sigma) à 37 ° C et étalées sur des lames de microscope

recouvertes d'une couche séchée de 1% d'agarose normal (réf. A-9539, Sigma) dans du PBS. Après gélification sur de la glace, les lames ont été immergées dans un tampon de lyse (NaCl 2,5 M, Tris 10 mM, EDTA 0,1 M, DMSO 10% et Triton X-100 1%, pH 10, Sigma) à TA dans l'obscurité. Les lames ont été neutralisées avec trois lavages successifs de 5 min chacun dans du Tris-HCl 0,4 M (Sigma), pH 7,4. Pour la détection des purines oxydées, nous avons fait une digestion avec FPG (réf 4040-100-EB, Trevigen,). Un volume de 100 µl par lame (0,05 U / pl de FPG) a été ajouté pendant 45 minutes à 37 ° C. Les échantillons sans Fpg ont été traités avec le tampon de digestion FPG seul. Après digestion, les lames ont été transférées dans un réservoir d'électrophorèse rempli de tampon d'électrophorèse (NaOH 0,3 M et EDTA 1 mM) pendant 30 minutes à température ambiante. L'électrophorèse a été réalisée pendant 30 min à 21 V. Après migration, les lames ont été rincées dans un tampon de neutralisation (3x5 min, température ambiante). Finalement, les lames ont été colorées avec du gel rouge. Un microscope à fluorescence (Carl Zeiss, Allemagne) connecté à une caméra CCD et un système d'analyse informatique (logiciel Comet assay IV, Perceptive Instruments Ltd) ont été utilisés pour déterminer l'étendue des dommages à l'ADN après électrophorèse de l'ADN fragments dans le gel d'agarose. L'étendue de l'endommagement a été évaluée comme la moyenne des valeurs en triple de l'intensité de l'ADN de la queue (% d'ADN dans la queue de la comète) à partir de l'analyse de 50 comètes de chaque lame d'une expérience en triple.

8. Microscopie à Fluorescence : étude du MMP, la teneur en Ca 2+, l'intégrité de la membrane et l'induction ROS

Pour les essais de fluorescence, les cellules ont étéensemencées sur des plaques à 96 puits à une densité de 13.10^3 cellules par puits dans 200 µl pendant 24 heures. Par la suite, les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de NPs de fer et de FeCl₃ (12,5 ; 50 et 200 µg / mL) pendant 24 heures supplémentaires. Les cellules cultivées dans un milieu de culture sans IONP ont été utilisées comme témoins négatifs dans chaque expérience. Les cellules traitées avec 1 mM H₂O₂ ont été utilisées comme témoins positifs. Le potentiel transmembranaire mitochondrial (MMP) a été évalué par l'iodure de 5,5', 6,6'-tétrachloro-1,1', 3,3'-tétraéthylbenzamidazolylcarbocyanine (JC-1 (5,5', 6,6' -TETRACHLORO-1,1', réf 11570776, flacon de 5 mg)). Après 24 heures d'incubation, les milieux cellulaires ont été éliminés, les cellules ont été lavées avec du milieu DMEM sans Phénol, puis réincubées pendant 30 minutes dans 100 µL de DMEM sans Phénol contenant des concentrations finales de Hoechst 2 µM (Hoechst 33342 Solution (20 mM) ; 62249) et 1,5 pM (1 pg / ml) de JC-1.

Hoechst est utilisé pour colorer les noyaux. A la fin de l'exposition, les cellules ont été lavées avec du milieu DMEM sans Phénol puis observées au microscope.

La teneur intracellulaire en Ca^{2+} et l'intégrité de la membrane ont été évaluées en utilisant un mélange de coloration contenant le Fluo 4AM (FLUO-4, AM CELL PERMEANT, Réf 11504786, Molecular Probes F14201 Invitrogen de Thermo Fisher Scientific), Hoechst (Hoechst 33342 Solution (20 mM), réf 62249) et de l'iodure de propidium (PI : P4864-10 ml Sigma ; FW : 668,39 g / mol) dans du milieu sans Phénol. Les cellules ont étéensemencées et traitées dans les mêmes conditions que dans le premier essai. Le mélange de coloration contient des concentrations finales de 5 μM Fluo4AM, 2 μM de Hoechst et 20 μM de PI. A la fin de l'exposition, les cellules ont été lavées avec du milieu sans Phénol puis observé sous le microscope. L'induction de ROS a été évaluée en utilisant la sonde ROS CM-H2DCFDA (5-(AND-6) -CHLOROMETHYL-2 'Ref C6827 Invitrogen de Thermo Fisher Scientific). Le mélange contient une sonde CM-H2DCFDA à une concentration finale de 5 μM et Hoechst à une concentration finale de 2 μM dans du milieu DMEM sans Phénol. Les cellules ont été incubées avec le mélange pendant 20 minutes à 37 ° C. A la fin de l'exposition, les cellules ont été lavées avec du milieu DMEM sans Phénol puis observées au microscope. Les émissions de fluorescence rouge et verte ont été analysées par microscope à fluorescence (ZEISS Axio Vert.A1) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et des longueurs d'onde d'observation de 530 nm pour la fluorescence verte et de 585 nm pour la fluorescence rouge. Pour le bleu, la longueur d'onde d'excitation était de 361 nm et la longueur d'onde d'observation de 497 nm.

9. Microscopie en Darkfield

La microscopie en Darkfield a été réalisée pour étudier l'internalisation des NPs dans les cellules SH-SY5Y. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à une densité de $14 \cdot 10^4$ cellules / puits pendant 24 heures, puis traitées à deux concentrations d'IONP, 5 et 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$, pendant une incubation supplémentaire de 24 heures. Après traitement, les cellules ont été lavées avec du milieu DMEM sans phénol et réincubées avec 100 μl de Hoechst (2 μM) à 37 ° C pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 20 minutes à température ambiante. Elles ont été lavées à nouveau après fixation avec du PBS et montées sur une lame de verre avec un réactif anti-évanouissement pour l'imagerie microscopique (ZEISS Axio Vert.A1).

C. Etudes sur modèle animal

Dans nos études, nous avons choisi de travailler sur des rats Wistar mâles pour écarter toute perturbation hormonale qui pourrait influencer les résultats de nos expériences. Ainsi, des rats mâles Wistar fournies par SIPHAT (Ben Arous, Tunisie) ont été divisés aléatoirement en 2 groupes (n=6) : un contrôle et un traité selon l'expérience à réaliser (ou bien trois groupes lors de l'expérience de gavage avec n=8). Les animaux ont été logés dans des conditions convenables de température (25°C) et de lumière (12:12 lumière/obscurité). Tous les rats ont reçu de l'eau et de la nourriture ad libitum. Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par la Comité d'éthique de la Faculté et de l'Institut Pasteur de Tunis.

Selon l'expérience, les animaux traités ont reçu des injections intraveineuses de NPs de fer à une dose de 10 mg/mL, des instillations intranasales à la même dose et pendant 7 jours pareil ou bien un seul gavage avec deux doses de NPs de fer différentes pour l'exposition orale aux NPs de fer. Les groupes témoins ont reçu une solution de 9 % de chlorure de sodium pendant l'administration intranasale et intraveineuse, et de l'eau distillée lors de l'administration orale. Les animaux ont été sacrifiés 7 jours après l'administration orale et 7 jours après la dernière instillation/injection. Les différents organes : foie, reins, rate, poumons, testicules, cœur et cerveau ont été prélevés et un rapport poids relatif de l'organe/poids corporel (mg/g) pour chacun a été calculé.

1. Mesures biochimiques et hématologiques

Les rats ont été anesthésiés, puis sacrifiés par une décapitation rapide. Ensuite, le sang a été recueilli dans les tubes EDTA pour l'analyse hématologique et des tubes héparine pour l'analyse biochimique. Les paramètres hématologiques ont été mesurés à l'aide du compteur de cellules HORIBA ABX Pentra XL80. Pour la biochimie, les paramètres liés au métabolisme hépatique, rénal, lipidique et protéique ont été mesurés à l'aide de COBAS Integra 400 plus ROCHE®.

2. Dosage des éléments traces

Le fer, le manganèse, le cuivre et le zinc ont été déterminés à l'aide d'une série ICP-MS Thermo X quadrupolaire II (Thermo Electron, Bremen, Allemagne) équipée d'une chambre de pulvérisation à perle de quartz et d'un nébuliseur concentrique. Les options de l'interface Xt et

de la technologie des cellules de collision (CCT) ont été utilisées. Les organes foie, poumon et cerveau ont été minéralisés dans du HNO₃ puis dilués à 1: 100 dans l'eau avant l'analyse. Des solutions étalons ont été préparées dans de l'acide nitrique à 1% (v/v). Les isotopes de ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu, ⁶⁵Cu, ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn ont été mesurés et le ⁷¹Ga à 650 nmol/L a été utilisé comme étalon interne. Les limites de détection et de quantification étaient de 0,96 nmol/L pour Mn, 10,2 nmol/L pour Fe, 32,7 nmol/L pour Cu et 15,5 nmol/L pour Zn.

3. Dosage des neurotransmetteurs

Les rats ont été sacrifiés et les cerveaux ont été prélevés et lavés rapidement avec du NaCl à 0,9%, puis immédiatement conservés à -80 °C. Le contenu de l'échantillon en neurotransmetteurs (dopamine, épinéphrine et norépinéphrine) a été mesuré comme décrit précédemment par Amara *et al.*, 2014, et Enkel *et al.*, 2014 [110,170] avec quelques modifications. Brièvement, des échantillons de cerveau ont été pesés et homogénéisés (1/10, poids / volume) dans une solution d'extraction (tampon HEPES 20 mM, pH 7,2, contenant 1 mM d'EDTA et 0,1 M d'acide perchlorique) en utilisant un sonicateur avec mèche (Sonics®). Les solutions d'homogénat ont été centrifugées à 15 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. L'analyse de neurotransmetteurs a été faite par HPLC avec un détecteur à matrice d'électrodes coulométriques (CoulArray® de l'ESA) en utilisant le kit complet HPLC ClinRep®. La limite de détection était de 15 ng/L pour la dopamine et de 8 ng/L pour l'épinéphrine et la norépinéphrine. Trente-cinq microlitres de l'échantillon ont été injectés et la température appliquée sur le système était de 28 °C. Les concentrations tissulaires ont été déterminées en normalisant les quantités quantifiées de neurotransmetteurs respectifs au poids correspondant de l'échantillon de tissu individuel.

4. Tests de comportement

Trois tests de comportement ont été réalisés pour évaluer l'état émotionnel, l'activité motrice, l'apprentissage et la mémoire chez le rat :

a) Labyrinthe en croix surélevé

Le test du labyrinthe en croix surélevé a été utilisé comme préalablement [171,172]. Le labyrinthe est formé de quatre bras faisant 50 cm de long et 10 cm de largeur, opposés deux à deux, et reliés par une plateforme centrale. Le dispositif a été élevé à une hauteur de 60 cm.

Les bras fermés étaient entourés d'une paroi de 50 cm, tandis que les bords des bras ouverts étaient de 0,5 cm afin de favoriser les entrées dans les bras ouverts [173] (Figure 31). La durée du test était de 5 min et au départ le rat est placé au centre du labyrinthe, face à un bras ouvert. Le rat explore librement le dispositif. Ainsi, le nombre d'entrées et le temps passé dans les différentes parties du labyrinthe (les bras ouverts, bras fermés et partie centrale) ont été enregistrés à l'aide d'une caméra vidéo placée au-dessus du dispositif. L'activité totale dans le labyrinthe a été évaluée par le nombre total d'entrées dans les bras et la partie centrale. Un pourcentage reflétant l'état anxieux nommé « indice d'anxiété » a été aussi calculé par la formule (temps passé dans les bras fermés x 100/temps passé dans les bras ouverts et fermés) [171]. Le dispositif a été nettoyé avec de l'alcool à 10% entre chaque rat.

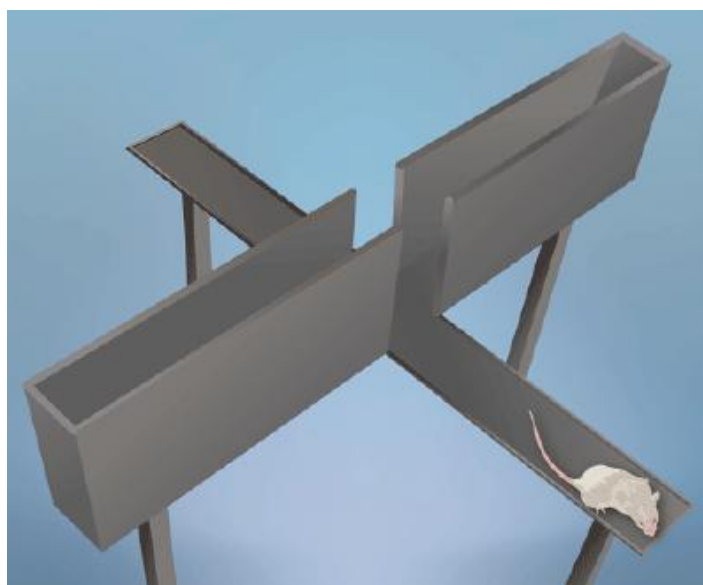


Figure 31 : Le labyrinthe en croix surélevé

(D'après <http://www.e-phy-science.com>)

b) Open Field

Le comportement exploratoire, l'activité motrice et l'anxiété ont été évalués par le test de l'Open Field. Les rats témoins et les rats traités par les NPs de fer ont été testés pour une session quotidienne d'observation de 5 min pendant trois jours consécutifs avec un intervalle de 24 heures. Le dispositif est une enceinte de couleur gris métallique et de forme circulaire faisant 100 cm de diamètre et 60 cm de hauteur. Il est divisé en sept secteurs : un secteur central et six secteurs périphériques qui sont tous de superficie égale ($0,135 \text{ m}^2$) (Figure 32). Trois objets identiques (longueur 15 cm ; largeur 10cm ; hauteur 5cm) ont été placés dans la

même position dans la partie périphérique durant les 3 jours. Au début de l'essai, le rat a été placé dans une partie périphérique. Différents paramètres comportementaux ont été mesurés tels que le nombre de secteurs traversés et le temps passé dans la partie périphérique et la partie centrale, le temps d'immobilité totale, le nombre du contact avec un objet. Le dispositif et les objets ont été nettoyés avec de l'alcool à 10% entre chaque rat.



Figure 32 : Un rat dans le dispositif de l'« Open field » (D'après Open Science)

c) Piscine de Morris

Le test de la piscine de Morris a été réalisé pour évaluer la mémoire de référence spatiale chez le rat [174]. Le dispositif expérimental du test est un bassin circulaire de 150 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur (Figure 33). La piscine est remplie jusqu'à une profondeur de 30 cm avec de l'eau ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) qui a été rendue opaque par l'addition de 2 kg de poudre de craie blanche [175]. Une plateforme en polystyrène (diamètre 10 cm) est placée au centre du quadrant Nord-Est à l'intérieur du dispositif. Le labyrinthe a été placé dans une salle avec divers indices visuels supplémentaires tels que les figures géométriques en couleurs différentes fixés sur la partie extérieure de la piscine, qui permettent à l'animal de se repérer dans l'espace. Le trajet effectué par l'animal dans la piscine est enregistré à l'aide d'une caméra vidéo placée au-dessus. L'expérimentateur se met derrière un rideau près du labyrinthe dans la salle d'expérience pour contrôler l'enregistrement de la vidéo. L'expérience s'est déroulée pendant 4 jours consécutifs, chaque rat a subi une séance quotidienne de quatre

essais (maximum 60s/ essai) par un délai de 10 min entre les essais durant lequel le rat est séché et est replacé dans sa cage. Le premier jour, la plateforme reste légèrement visible au-dessus de la surface de l'eau puis immergée 1 cm sous la surface les 3 jours suivants. Chaque jour, quatre points de départ sont possibles (Nord-Est, Sud-Est, du Nord-Ouest ou Sud-Ouest). Leur séquence varie d'un essai à l'autre et d'un jour à l'autre. Au début de chaque essai, un rat a été doucement introduit dans la piscine face à la paroi dans l'une des quatre positions de départ (N, S, E, O). Une fois dans l'eau, le rat va nager jusqu'à atteindre la plateforme et monter au-dessus et il est gardé 10s avant de retourner à sa cage [176]. Si l'animal n'a pas trouvé la plateforme pendant 60s, il a été guidé vers elle par l'expérimentateur et il y est laissé pendant 20 secondes. Ensuite, le rat a été sorti de l'eau avant d'être déplacé vers un nouveau point de départ [176]. Le cinquième jour, un test de rétention de 60s appelé « probe test » a été réalisé. En fait, la plateforme a été enlevée de la piscine et le temps passé par le rat de quadrant NE contenant la plateforme pendant les 4 jours précédents est calculé.

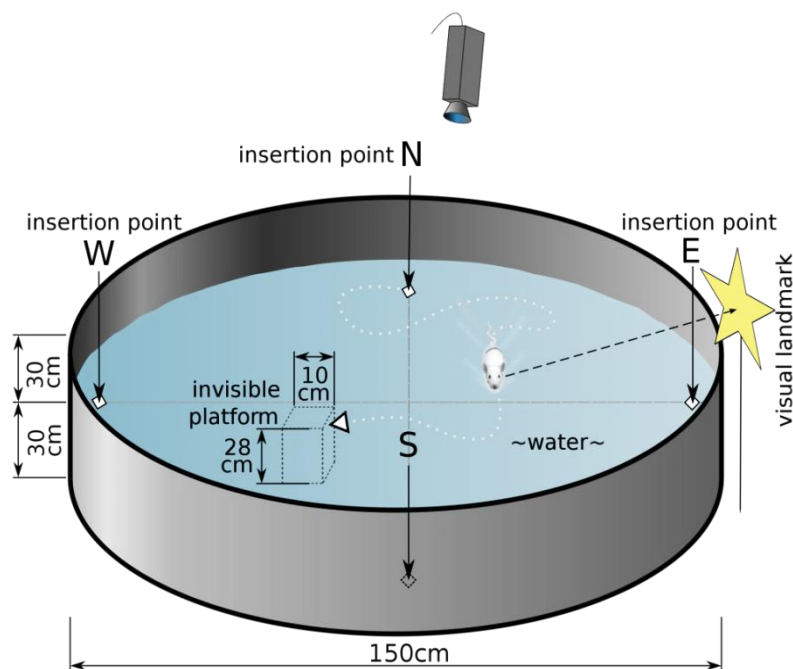


Figure 33 : La piscine de Morris (D'après <https://de.wikipedia.org>)

5. Anatomo-pathologie

Immédiatement après le sacrifice, les organes foie, poumons, et cerveau ont été prélevés et pesés. Les fragments de tissus ont été lavés d'abord avec une solution de 9 ‰ de chlorure de sodium. Ils ont été fixés dans une solution tamponnée de formol à 10% puis inclus dans la paraffine pour l'analyse histopathologique. Les sections ont été coupées d'environ 5µm d'épaisseur, déparaffinées, hydratées, et colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E).

D. Etude protéomique

1. Extraction des protéines

Pour l'étude protéomique, les cellules SH-SY5Y ont été traitées par les doses létales 10 des FeCl_3 , et de la fraction de NPs Fer F3 pendant 24h, puis comptées au bleu de trypan avant d'être récoltées et lavées au PBS. Les cellules non traitées sont utilisées comme témoin. Le culot cellulaire a été lysé à raison de 1 million de cellules dans 100 μL de tampon de lyse. Les cellules ont été vortexées et ont été incubées 5 min à 95°C avant d'être lysées pendant 20 secondes avec 1 sec OFF 1 sec ON à 20% d'amplitude à l'aide du sonicateur Sonics Vibracell®. Le tampon de lyse est à base de SDS et formé par 4% SDS-0.1M DTT dans 0.1M Tris-HCl, pH7.6. Ensuite, le lysat a été centrifugé 10 min, à 14 000 g, à 4°C pour se débarrasser des débris cellulaires. Finalement, le surnageant est récupéré dans un nouveau tube.

A l'issue de l'étude *in vivo*, nous avons étudié les protéomes du foie, poumon et cerveau. De chaque organe des 6 rats, 100 mg ont été broyés dans un tampon de lyse à l'aide du Tissue Lyser II à une fréquence de 25 Hz pendant une période de 25 minutes. Puis 30 minutes à l'aide du sonicateur Sonics Vibracell® pour mieux lyser les tissus. Le tampon de lyse était le même que pour la lyse des cellules et le lysat a été centrifugé dans les mêmes conditions.

2. Dosage des protéines par la méthode BCA

Après extraction, les protéines ont été dosées par la méthode BCA selon les instructions du kit « Pierce™ BCA Protein Assay Kit ». Le dosage des protéines par la méthode BCA est utilisé pour la quantification des protéines totales dans un échantillon. Le principe de cette méthode est que les protéines peuvent réduire Cu^{2+} en Cu^+ dans une solution alcaline et entraîner une formation de couleur pourpre par l'acide bicinchoninique. La détermination des concentrations des protéines est faite grâce à l'établissement d'une gamme d'étalonnage à partir de la BSA à 2 mg/mL. La lecture est faite à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

3. Digestion des protéines par la méthode FASP (Filter Aided Sample Preparation)

Un total de 1 mg d'extrait de protéines de chaque échantillon a été mis dans un dispositif de filtration centricon Microcon YM-30 (Millipore Cat N° 42410) pour réaliser la digestion. Le tampon de lavage utilisé est à base d'urée et formé par 8M urée – 0.1M Tris-HCl, pH8.5. Les

résidus cystéine ont été bloqués avec du 12 mM de MMTS (méthyl méthaneethiosulfonate) pendant 30 min à Température ambiante. Tous les réactifs proviennent du kit d'applications iTRAQ Reagents 8 plex (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Ensuite, les protéines ont été digérées dans du TEAB 0,5M, pH8.5 en ajoutant de la trypsine / Lys-C Mix (Promega, USA) à un rapport enzyme/protéine est de 1:50 pendant une nuit à 37 ° C.

4. Dessalage et Dosage des peptides par la méthode BCA peptides

A l'issue de la digestion, les peptides ont été dessalés par une méthode C18 spin column 30 µg (89873 – ThermoScientific) puis dosés par la méthode BCA peptides. Le dessalage a été fait selon les instructions du protocole fournit dans le kit et en utilisant les différentes solutions détaillées dans le tableau suivant (Tableau 8) :

Tableau 8: Solutions pour dessalage C18 spin column 30 µg (89873 – ThermoScientific)

Solutions	Préparation	Composition finale
Solution d'activation	2.5 mL ACN 100 %	50% ACN
	2.5 mL H ₂ O - HPLC	50 % H ₂ O
Solution d'équilibration/lavage	100 µL ACN 100 %	1 % ACN
	10 µL TFA 100 %	0.1 % TFA
	9890 µL H ₂ O - HPLC	98.9 % H ₂ O
Solution d'élution	7000 µL ACN 100 %	70 % ACN
	10 µL TFA 100 %	0.1 % TFA
	2990 µL H ₂ O - HPLC	29.9 % H ₂ O

Le dosage des peptides a été fait selon le kit du fournisseur « The Thermo Scientific™ Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay ». La lecture a été faite à 480 nm.

5. Marquage isobarique par la méthode iTRAQ

Un kit iTRAQ 8plex a été utilisé pour les 4 groupes en duplicata. Les peptides (50µg selon le dosage) ont été remis en suspension dans 20 µL de tampon de dissolution, puis marqués à TA pendant 1 heure avec un réactif iTRAQ du Kit iTRAQ 8 plex (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Enfin, des échantillons de la même teneur en peptides et marqués avec différents réactifs iTRAQ ont été poolés et le marquage a été arrêté par évaporation dans un concentrateur sous vide jusqu'à l'obtention d'une pastille brune. Les peptides marqués résultants ont été nettoyés et dessalés avec C18 ZipTips (Millipore Corp, MA, USA) selon les

instructions du fabricant. Pour une meilleure détection des peptides en faible abondance, les échantillons marqués ont été poolés et ont été fractionnés en deux dimensions : OFFGEL (système d'isoélectro-focalisation) et nanoHPLC avant l'analyse par spectrométrie de masse.

6. Fractionnement OFFGEL

Le fractionnement OFFGEL selon pI a été réalisé sur le Fractionneur OFFGEL 3100 en utilisant le kit OFFGEL pH linéaire 3-10 (Agilent Technologies) avec une configuration de 24 puits selon le protocole de l'utilisateur. En bref, 53 µg des peptides marqués par iTRAQ ont été séchés par concentré sous vide et mis en suspension dans 3,6 ml de tampon OFFGEL focalisé. La bande de gel d'IPG a été réhydratée et 150 µL d'échantillon ont été chargés dans chaque puits. Les peptides ont été concentrés jusqu'à ce que 50 kVh soient accumulées avec une tension maximale de 8000 V, 50 µA et 200 W. Après fractionnement, les 24 fractions OFFGEL ont été dessalées en utilisant les C18 ZipTips (Milipore Corp, MA, USA). Les fractions résultantes ont été recueillies, séchées en utilisant un concentrateur sous vide et maintenues à -20 °C avant l'analyse nano-LC-MS/MS.

7. Fractionnement en phase inverse par HPLC

Les peptides ont été séparés en utilisant un système de Chromatographie en phase inverse Ultimate 3000 C18 à phase inverse (RP-CLHP) contrôlé par le logiciel Chromeleon v. 6.80 (Dionex / LC Packings, Amsterdam, Pays-Bas) et couplé à un dispositif de localisation Probot MALDI contrôlé par le logiciel µCarrier 2.0 (Dionex / LC Packings, Amsterdam, Pays-Bas). Avant la nano-LC-MS / MS, les fractions séchées sous vide ont été remises en suspension dans 10 µl de tampon A (98% d'eau, 2% d'ACN et 0,05% de TFA). Les peptides ont été piégés sur une colonne de piégeage (C18, 3µm, 100Å de taille de pore) dans de l'ACN à 2% et du TFA à 0,05% pendant 8 min avant la séparation par Chromatographie en phase inverse (Acclaim PepMap™ RSLC 75 µm, 15 cm, nanoViper C18, (3% d'ACN et 0,05% de TFA) et le tampon B (80% d'ACN et 0,04% de TFA). Des débits de 20 µL / min et 0,3 µL / min ont été appliqués respectivement dans la pré-colonne et la nano-colonne. La séparation entière a duré 60 min. Les fractions provenant de la solution élue ont été recueillies pendant 15 secondes et repérées sur une plaque Opti-tof LC / MALDI Insert 123 x 81 mm (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), ce qui a donné 200 spots par fraction. La matrice d'acide a-cyno-4-hydroxy-cinnamique (CHCA, Sigma-Aldrich St-Louis, MO, USA) avec une concentration de 2 mg / mL dans ACN à 70% et TFA 0,1% a été ajoutée à la solution élue en

colonne À un débit de 0,9 µl / min, et donc intégré dans chaque spot de la plaque échantillon MALDI.

8. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF

L'analyse par MS et MS / MS d'échantillons peptidiques repérés par nanoLC-off-line a été effectuée en utilisant le spectromètre de masse MALDI-TOF / TOF 4800 (AB Sciex, Les Ulis, France) contrôlé par le logiciel Explorateur Series v 4000. L'analyse a été effectuée en mode réflecteur positif. Des spectres MS de m/z 700-3500 ont été acquis pour chaque spot en utilisant le laser 3500. Les 30 ions les plus forts dans chaque spectre de MS au-dessus d'un seuil S/N (Signal/Noise) de 10 ont été sélectionnés pour l'analyse MS/MS. Les ions sélectionnés ont été fragmentés en utilisant le mode d'activation CID (Collision Induced Dissociation) pour obtenir le spectre MS/MS correspondant qui est nécessaire pour déterminer la séquence de ces peptides et les quantifier.

9. Analyse Bioinformatique : ProteinPilot, isobar, gene ontology et PathwayStudio

a) ProteinPilot et isobar

Les spectres MS et MS / MS ont été utilisés pour l'identification et la quantification relative avec le logiciel ProteinPilot TM v 4.0 avec l'algorithme Paragon TM (AB Sciex, Les Ulis, France). L'analyse a été réalisée avec la base de données UniProtKB / Swiss-Prot Human (Institut Européen de Bioinformatique, Hinxton, Royaume-Uni). Dans nos études, la recherche a été définie sur "Thorough ID" et une analyse du taux de fausse découverte (FDR) de 1% a été appliquée. Les protéines quantifiées avec au moins un peptide au niveau de confiance de peptide de 95% ont été incluses dans l'ensemble final de protéines quantifiées. Afin de réaliser une analyse statistique des protéines quantifiées, nous avons utilisé le package R isobar (version 1.14.0). L'analyse a été effectuée en utilisant un ajustement normal et le rapport des protéines ayant un rapport de valeur p et un échantillon de valeur $p < 0,05$ sont considérés comme significativement différentiellement exprimées. Les données iTRAQ sont présentées sous forme de ratio protéique dans les différentes conditions par rapport aux cellules témoins non traitées.

b) Ontologie génique et analyse de réseau protéique

L'analyse de l'ontologie génique « Gene Ontology » a été réalisée à l'aide du système de classification PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) version 13.1 (publié le 20 février 2018) qui contient 15524 familles de protéines, réparties en 79562 sous-familles de protéines fonctionnellement distinctes.

L'analyse des sous-réseaux a été réalisée avec Pathway Studio Mammalian Web 10.3 (logiciel Ariadne Genomics®, Elsevier® Inc, Rockville, MD, USA) avec la liste des protéines dérégulées suite à l'exposition des cellules aux NPs de fer et au FeCl₃ et les paramètres suivants: Générer un sous-réseau avec des centres en aval du voisins protéiques avec tous les types de connexions listés (réaction chimique, régulation directe, expression, effet de miARN, synthèse de molécules, transport de molécules, liaison du promoteur, modification et régulation des protéines). Les sous-réseaux sont générés en connectant des entités aux voisins dans la base de données ResNet Explore. Un sous-réseau est constitué d'un régulateur et de ses cibles. Comme nous analysons les données d'expression des protéines, nous avons sélectionné l'option générer un sous-réseau avec le centre en aval des voisins pour identifier les processus qui régulent par ces protéines et qui sont modulés par le niveau d'expression de la protéine.

L'analyse des processus biologiques dans lesquels les protéines dérégulées, suite à l'exposition des rats aux nanoparticules de Fer et au FeCl₃, sont impliquées a été faite avec PANTHER et TargetMine.

RESULTATS ET DISCUSSION

V. RESULTATS ET DISCUSSION

A. Etude *in vitro* des effets des NPs de fer sur les cellules SH-SY5Y

1. Introduction

Les effets des NPs de γ -Fe₂O₃ ont été recherchés sur différents modèles. Comme première partie, nous nous sommes proposé d'étudier ces effets *in vitro*. Dans ce présent travail, nous avons utilisé un modèle de cellules neuronales : la lignée SH-SY5Y issue de neuroblastome humain. Ainsi notre travail s'est axé sur les questions suivantes : « Quels sont les effets potentiels toxiques des NPs de fer sur les cellules SH-SY5Y ? » « Est-ce que les tests cytotoxiques et génotoxiques permettent de répondre à cette question ? » « Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets toxiques des NPs de fer ? ». L'étude de l'effet des NPs a été faite de manière globale pour couvrir et investiguer tous les points que les NPs peuvent induire suite à l'exposition au niveau des cellules SH-SY5Y. Des études de la viabilité cellulaire (le test MTT, le test du bleu de trypan) et de génotoxicité (le test des Comètes qui permet de détecter des lésions primaires de l'ADN et le dosage de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine) ont été réalisées sur des cellules exposées aux NPs. Le dosage du fer en tant qu'élément trace a été aussi réalisé par ICP-MS pour évaluer l'internalisation des NPs de fer par les cellules. Cet effet a été aussi évalué par le moyen de la cytométrie en flux et la microscopie à fluorescence en mode Darkfield. Durant toute l'étude, nous avons utilisé le chlorure de fer FeCl₃ pour comparer les effets du fer à l'état ionique et du fer à l'état nanométrique. Les expériences ont été réalisées minimum 3 fois sur des cellules indépendantes. Après avoir étudié la partie cytotoxique et génotoxique, et pour mieux comprendre ces effets nous avons réalisé une étude protéomique. Cette étude a permis d'évaluer les effets des NPs de fer au niveau moléculaire et protéique. L'étude protéomique a été réalisée par l'approche « Bottom-up » basée sur le marquage isotopique iTRAQ et la spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF. Les échantillons « contrôle et traité par FeCl₃ ou bien F1 ou F3 » ont été marqués par les étiquettes de *m/z* 114, 115, 116 et 117. Ce marquage a permis d'identifier et de quantifier les peptides/protéines sous ou sur-régulés par la comparaison des ratios entre « contrôle et traité » contre la base de données UniprotKb/SwissProt et en utilisant « Isobar Package ». Par la suite, les différentes protéines ont été étudiées par la suite avec les méthodes d'analyse bioinformatique telles que

« PANTHER » et « PathwayStudio » de point de vue localisation, rôle, fonction, interaction et voies impliquées.

Ces travaux de recherche ont fait l'objet de l'article suivant qui est en révision dans le journal « Nanotoxicology ».

a) Résumé des principaux résultats

Dans notre étude actuelle, nous avons étudié les effets des NPs de fer sur la lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y. Nous avons mené des études cytotoxiques et génotoxiques pour évaluer les effets phénotypiques des NPs de fer sur les cellules, et une étude protéomique pour évaluer les effets moléculaires et les mécanismes par lesquels ce type de NPs pourrait induire une toxicité ou une perturbation au niveau cellulaire. Nos principaux résultats ont montré que l'utilisation de trois tailles différentes des NPs de fer (14, 22 et 30 nm) induit un détachement cellulaire, des changements morphologiques cellulaires, une internalisation des NPs de fer et une mortalité cellulaire d'une manière dépendante de la taille et de la concentration des NPs de fer dans les milieux de culture. Les NPs de fer ont induit de légers dommages génotoxiques testés par un test de comète modifié sans affecter le cycle cellulaire, la fonction mitochondriale, l'intégrité de la membrane, le niveau de calcium intracellulaire et la génération de ROS. Lors de cette étude *in vitro*, nous avons utilisé aussi le FeCl₃ pour comparer également les effets des NPs de fer et du fer ferrique en incubant les cellules dans les mêmes conditions dans les deux cas. Les résultats obtenus démontrent que dans tous les essais, les NPs présentaient plus de toxicité que le fer ferrique. L'analyse protéomique suivie par l'annotation des gènes avec l'ontologie et l'analyse des voies de signalisation a mis en évidence les effets des NPs de fer sur le cytosquelette, l'apoptose cellulaire et le développement du cancer. Au total, nos résultats ont fourni plus d'informations sur les effets des NPs de fer sur les cellules humaines et en particulier sur la lignée cellulaire cancéreuse.

b) Conclusion

Les études *in vitro* présentent plusieurs avantages en recherche de point de vue rapidité, haut débit, multiplicité des analyses, prédiction des effets des NPs, et plus important de point de vue éthique. Lors de cette investigation, l'utilisation de la lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y a permis d'évaluer la toxicité des NPs de fer sur plusieurs plans, d'étudier les

processus biologiques et les voies de signalisation dans lesquels les protéines dérégulées en réponse aux NPs de fer ou bien au fer ferrique sont impliquées et d'identifier des biomarqueurs d'exposition à ces NPs principalement les trois protéines « Barrier-to-autointegration factor, Histone H2A type 1-A et Homeobox protein aristless-like 3 ».

c) Article I

Investigating the toxic effects induced by Iron Oxide Nanoparticles on neuroblastoma cell line: an integrative study combining cytotoxic, genotoxic and proteomic tools

Dalel Askri^{1,2,3,4,*}, Valérie Cunin^{1,2,3}, David Béal⁵, Sylvie Berthier⁶, Benoit Chovelon^{7,8}, Josiane Arnaud^{2,3}, Walid Rachidi⁵, Mohsen Sakly⁴, Salem Amara⁴, Michel Sève^{1,2,3}, and Sylvia G. Lehmann^{1,2,3,9}

- 1) Grenoble Alpes University, PROMETHEE Proteomic Platform, BEeSy, Grenoble, France
- 2) LBFA Inserm U1055, PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France
- 3) Institut de Biologie et Pathologie, CHU de Grenoble Alpes, France
- 4) Carthage University, College of Sciences of Bizerte, Unit of Research in Integrated Physiology, Bizerte, Tunisia
- 5) Chimie Interface Biologie pour l'Environnement, la Santé et la Toxicologie (CIBEST), UMR 5819, Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC, SyMMES, F-38000 Grenoble, France
- 6) Cytometry Platform, Pole Biology, University Grenoble Alpes, Grenoble, France
- 7) University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France
- 8) Unit of Hormonal and Nutritional Biochemistry, Department of Biology, Toxicology, Pharmacology, CHU Grenoble Alpes, Inserm, U1055, Grenoble, France
- 9) Univ. Grenoble Alpes, Univ. Savoie Mont Blanc, CNRS, IRD, IFSTTAR, ISTERre, 38000 Grenoble, France

*Corresponding Author: Dr. Dalel Askri, Plateforme de Protéomique Promethee-IBP-CHU Grenoble Alpes-Grenoble-FRANCE, email address: dalel.askri@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Nanomaterials have gained much attention for their use and benefit in several fields. Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) have been used in Biomedicine as contrast agents for imaging cancer cells. However, several studies reported the potential toxicity of those nanoparticles in different models especially in cells. Therefore, in our present study, we investigated the effects of IONPs on the SH-SY5Y neuroblastoma cell line. We carried out cytotoxic and genotoxic studies to evaluate the phenotypic effects, and proteomic investigation to evaluate the molecular effects and the mechanisms by which this kind of NPs could induce toxicity. Our results showed that the use of three different sizes of IONPs (14, 22 and 30 nm) induced cell detachment, cell morphological changes, size and concentration dependent IONP internalization and cell mortality. IONPs induced slight genotoxic damage assayed by modified comet assay without affecting cell cycle, mitochondrial function, membrane integrity, intracellular calcium level, and without inducing ROS generation. All the studies were performed to compare also the effects of IONPs to the ferric iron by incubating cells with equivalent concentration of FeCl_3 . In all tests, the NPs exhibited more toxicity than the ferric iron. The proteomic analysis followed by gene ontology and pathway analysis evidenced the effects of IONPs on cytoskeleton, cell apoptosis and cancer development. Our findings provided more information about IONP effects on human cells and especially on cancer cell line.

Keywords: Iron oxide nanoparticles; Neuroblastoma; Toxicity; Proteomics

Introduction

In recent years, Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) have attracted the attention of the scientific community due to their unique magnetic properties and their biocompatibility. These nanoparticles (NPs) are used in different fields especially in Biomedicine for diagnosis and therapy, possessing then “theranostic” effects. They are used as gene and drug delivery carriers, contrast agents in Magnetic Resonance Imaging (MRI) and therapeutic agents in cancer hyperthermia (Cortajarena et al. 2014). The IONP surface can be modified by coating which impacts their physicochemical properties and modulate their use in many applications (Cortajarena et al. 2014; Yarjanli et al. 2017). The increasing use of those NPs in biomedical applications and their benefits create then an always growing research topic that is interesting and requires a better evaluation of the risks and an improved safety of these NPs. Many in vitro and in vivo studies have been conducted in this context. However, the literature shows

conflicting outcomes and interpretations related to IONPs toxicity. Indeed, IONPs are known to cause different biological responses, including the generation of reactive oxygen species (ROS) (González-Flecha 2004), the modification of cell signaling and the stimulation of pro-inflammatory cytokines and fibrosis (Muller et al. 2005). In 2012, Khan et al. investigated the cytotoxic effects of Fe₃O₄ NPs on A549 human lung epithelial cancer cells and normal IMR-90 lung fibroblasts. According to their study, cancerous and normal cells were exposed to various concentrations of Fe₃O₄ NPs (1–100 µg/mL) for 24 and 48 hours. Their findings showed that Fe₃O₄ NPs had significant cytotoxic effects on A549 human lung cancer cells, but not on normal IMR-90 human lung fibroblasts (Khan et al. 2012). Namvar et al. in 2014 evaluated the effects of Fe₃O₄ NPs on cancer cells such as human cell lines for leukemia (Jurkat cells), breast cancer (MCF-7 cells), cervical cancer (HeLa cells), and liver cancer (HepG2 cells). In the first step they performed MTT assay for all cell lines then they chose the Jurkat cell line as it had the lowest inhibitory concentration compared to the three other cell lines. As results, the researchers evidenced a significant increase of the phase sub G1 by flow cytometry analysis, apoptosis induction and caspase-3 and caspase-9 activation in a time-response manner (Namvar et al. 2014). Alarifi et al., evidenced on a MCF-7 breast cancer cell line cytotoxicity and genotoxicity of Fe₂O₃ NPs by the induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis activation (Alarifi et al. 2014). The dose range was 10, 30, 60, and 120 µg/mL. The team used MTT and lactate dehydrogenase leakage assay to examine the cytotoxicity mechanisms of IONPs. They used ROS generation, lipid peroxidation, depletion of superoxide dismutase, glutathione and catalase activities in MCF-7 cells to study oxidative stress and caspase-3 activity assay with DAPI staining for chromosome condensation to study apoptosis. They studied also the DNA damage by alkaline single-cell gel electrophoresis (modified comet assay) (Alarifi et al. 2014). According to few studies, IONPs are degraded into the cells by the lysosomes, where IONPs are metabolized and produce free iron ions that could affect the different biological processes (Malvindi et al. 2014). In the same year, Lin and his collaborators evaluated the cytotoxicity of unmodified Fe₃O₄ NPs in the rat renal cell line NRK-52E using a proteomic analysis. They identified 435 proteins and quantified 311 proteins. Mostly, the differentially expressed proteins (DEP) were cell death and apoptosis related proteins, Ras-related proteins, glutathione related proteins, and chaperones proteins (Lin et al. 2014). However, they did not give enough information about IONPs interaction mechanisms. No other proteomic studies have been carried on the effects of IONPs on other cell type. Therefore, the cellular response to IONPs in different cells should be investigated in order to understand IONPs interactions and how they could induce or not cytotoxicity.

In this study we evaluated the toxic effects of IONPs on human neuroblastoma cell line as it is one of the best models to study neurodegenerative diseases such as Alzheimer Disease. SH-SY5Y cells were exposed to the different concentration of the IONPs (12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/mL) for 24 h and/or 48h. We also investigated the Nano size effect by testing three types of NPs (14, 22 and 30nm). We assessed cell viability by common MTT and Trypan blue exclusion tests. We also investigated the cellular response initiated by IONPs exposure using fluorescence probes to quantify the mitochondrial function, membrane integrity, intracellular calcium level and ROS generation. DNA damage after exposure of IONPs in the SH-SY5Y cells was performed using modified comet assay. We studied also the effects on cell cycle, cell size and granularity by flow cytometry. Moreover, the cellular response after exposure to a low dose (LD10) was further investigated by a global quantitative labeled proteomic approach followed by bioinformatics analysis.

Material and Methods

Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles

IONPs used in this paper were gently provided by the Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials applied to the Environment at the Faculty of Sciences of Gabès under the direction of Professor Lassaad El Mir. Suspensions of Fe₂O₃ NPs (F1, F2 and F3) were prepared by a modified sol-gel method (Lemine et al. 2014). The procedure is detailed in Supplementary material & methods n°1.

Powder

IONPs were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD). The XRD shows the size and crystallized structure of these NPs. This technique was performed using the PANalytical Xpert Pro diffractometer with Cu k radiation ($k = 1.54178 \text{ \AA}$) in the range of $2\theta = 20\text{-}70^\circ$ at the 0.02° degree. The average size of the crystallites is calculated from the Scherrer formula $D = K \lambda / B \cos\theta$, where $k = 1.54178 \text{ \AA}$, K is a constant whose value is about 0.9, and B is the width of Peak at mid-maximum height (LMH) expressed in radians. The size and shape of IONPs were determined by a JEOL transmission electron microscope (JEM-2100F) operating at 200 keV.

Suspension

A stock solution of 5 mg / mL of IONPs in sterile water was prepared to make a range of cell treatment concentrations. In suspension, IONPs were sonicated by the sonicator Sonics® for 60 min with 1 min ON and 1 min OFF and then dispersed in an ultrasonic bath for 60 min immediately before use. This suspension was diluted 1:100 in different solutions (water, DMEM with and without serum) to characterize the IONPs in suspension by the Dynamic Light Scattering (DLS) technique using a NanoZetasizer (Malvern). This technique allows us to measure the hydrodynamic diameter of the NPs in solution and to study their dispersion state.

Cell Culture of SH-SY5Y Cell line

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were kindly provided by Dr. Walid Rachidi from the CEA of Grenoble. The cells were grown in a complete culture medium containing Ham F12-EMEM (Gibco™), 0.5% penicillin-streptomycin, 1% nonessential amino acids (NEAA) and 10% foetal calf serum in an incubator at 37°C under 5% CO₂. The culture was made in 75cm² flasks to make the necessary passages before seeding the cells on appropriate plates or petri dishes for the treatment with IONPs. For passages, cells were harvested using Gibco Trypsin-EDTA (0.05%).

Cell MTT viability test after treatment by IONPs or FeCl₃

Cell viability was assessed using the MTT assay, which is based on the reduction of the MTT dye (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) to formazan crystals, an insoluble intracellular blue product, by cell dehydrogenases. The amount of product formed is proportional to the quantity of living cells and also to their metabolic activities. Cells were seeded onto 96-well plates at a density of 20×10^3 cells per well in 200 µL for 24 hours. Subsequently, the cells were treated with increasing doses of IONPs and FeCl₃ (12.5, 25, 50, 100, and 200 µg / mL) for an additional 24 hours (Figure S1). Cells grown in culture medium without IONPs were used as controls in each experiment. At the end of the exposure, the cells were washed with PBS, 200 µL of MTT (Sigma; 0.5 mg / mL) was added to each well and the cells were incubated for 4 hours at 37 ° C. The medium was carefully removed, the cells were re-washed with PBS and 150 µL of DMSO was added. The plates were placed on a minimum stirrer for 30 min until the formazan crystals were completely dissolved. Then, formazan crystals were transferred into new plates for absorbance reading at 560 nm using a microplate

reader (Varioskan® Flash, Thermo Scientific). The percentage of viability was calculated as the following formula: % of viable cells= (OD of treated sample/OD of control sample) ×100. In order to ensure that there was no interference between MTT and IONPs, we performed an interference test with IONPs and without the cells, and the measured OD was similar to blank sample (data not shown).

Cell Viability assessment by trypan blue exclusion test

Trypan blue is a water-soluble dye used for the exclusion test to distinguish viable and non-viable cells, and thus to make a cell count to evaluate cell viability. A living cell is white under a microscope, whereas a dead cell is blue.

To do this, 20.10^4 SH-SY5Y cells were seeded on 12-well plates in a 1 mL volume for 24 hours. Subsequently, the cells were treated with increasing doses of IONPs and FeCl₃ (12.5, 25, 50, 100, and 200 µg / mL) for an additional 24 hours. Cells grown in culture medium without IONPs were used as controls in each experiment. At the end of the exposure, suspended cells and adherent cells were harvested for trypan blue counting of live and dead cells. Cell viability was expressed as a percentage of live cell number / number of live and dead cells.

Cell cycle analysis by Flow Cytometry

The cell cycle analysis has for objective to see whether the IONPs induce cell cycle disturbance or not by quantifying the amount of DNA during the cycle. Flow cytometry allows to distinguish three phases of the cell cycle: G0 / G1: cells activation, S: DNA synthesis, and G2 / M: mitosis.

During apoptosis, the analysis of the cell cycle makes it possible to demonstrate a Sub-G1 peak (which is located just before the G0 / G1 peak) showing DNA fragmentation. This peak allows the determination of the proportion of cells in apoptosis. For the measurement of the cycle, 7.10^5 cells were grown in a 25 cm² flask for 24 or 48 hours. Subsequently the cells were treated with increasing doses of IONPs (12.5, 25, 50, 100, and 200 µg / mL) for an additional 24 hours. Cells grown in culture medium without IONPs were used as controls in each experiment. The cells were harvested, fixed and permeabilized with 70% cold ethanol overnight at -20 ° C.

The cells were washed and resuspended in 0.5 ml of PBS containing propidium iodide (PI) (1 mg / ml) and RNases (0.5 mg / ml), then incubated for at least 30 minutes at +4 °C and in the dark. The DNA content was quantified by flow cytometer BD FACSCanto™ II (BD Biosciences). Data were analysed with BD FACSDiva software (BD Biosciences).

Comet assay for genotoxicity testing

To assess the potential genotoxic effects of IONPs, we used the comet assay and the repair-specific enzyme formamido pyrimidine glycosylase (Fpg). SH-SY5Y Cells were seeded on 12-well plates in a 1 mL volume for 24 hours at a density of 20.104 cells/ well. Subsequently, the cells were treated with increasing doses of IONPs and FeCl₃ (50, and 200 µg / mL) for an additional 24 hours. Cells grown only in culture medium were used as negative controls in each experiment. Cells treated with H₂O₂ were used as positive controls. At the end of the exposure, suspended cells and adherent cells were harvested, counted and froze in a freezing solution containing SVF+ 10% DMSO till the day of the assay. Frozen pellets of SH-SY5Y treated or not with FeCl₃ or IONPs were embedded in low-melt agarose (Sigma) at 37 °C (final concentration 0.6% in PBS) and spread on microscope slides coated with one dried layer of 1% normal agarose (Sigma) in PBS. After gelling on ice, the slides were immersed in a lysis buffer (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 0.1 M EDTA, 10% DMSO, and 1% Triton X-100, pH 10; Sigma) at room temperature in the dark. The slides were neutralized with 5 min-three washes in 0.4 M Tris-HCl (Sigma), pH 7.4. For the detection of oxidized purines, we did a digestion with FPG (ref 4040-100-EB, Trevigen). A volume of 100 µL per slide (0.05 U/µL FPG) was added for 45 min at 37 °C. Samples without Fpg were treated with the FPG digestion buffer alone. After digestion, the slides were transferred to an electrophoresis tank filled with electrophoresis buffer (0.3 M NaOH and 1mM EDTA) for 30 min at room temperature. Electrophoresis was performed for 30 min at 21 V. After migration, the slides were rinsed in neutralization buffer (3 × 5 min, room temperature). Finally, slides were stained with gel red. A fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) connected to a charge-coupled device (CCD) camera and a computer-based analysis system (Comet assay IV software, Perceptive Instruments Ltd) was used to determine the extent of DNA damage after electrophoresis of DNA fragments in the agarose gel. The extent of damage was evaluated as the average of the triplicate values of the tail DNA intensity (% of DNA in the tail of the comet) from the analysis of 50 comets of each slide of a triplicate experiment.

Cell size and granularity analyses by Flow Cytometry

In flow cytometry, the different populations running in a flow cytometer can be distinguished by the forward scattered light (FSC), which is an indicator of cell size, shape and refractive index and related to cell membrane integrity. Another parameter, the side scattered light (SSC) is related to cell internal complexity (cellular granularity or cellular inclusions). In our study, SH-SY5Y cells were seeded in 6 well plates at a density of 580.10^3 cells / well for 24 hours prior to treatment. On the treatment day, the cells were treated with increasing concentrations of IONPs: 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for 24 and 48 hours. The untreated cells were used as a control. Flow cytometric analyses were performed on a BD FACSCanto™ II flow cytometer (BD Biosciences). Ten thousand cells were acquired for each sample that was prepared in triplicate. Data were analysed with BD FACSDiva software (BD Biosciences).

Fluorescence assays to study MMP, Ca^{2+} content, membrane integrity and ROS induction

For the fluorescence assays, cells were seeded onto 96-well plates at a density of 13.10^3 cells per well in 200 μL for 24 hours. Subsequently, the cells were treated with increasing doses of IONPs and FeCl_3 (12.5 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for an additional 24 hours. Cells grown in culture medium without IONPs were used as negative controls in each experiment. Cells treated with 1mM H_2O_2 for 1 hour were used as positive controls. After 24 hours incubation, cell media were discarded; cells were washed with DMEM free Phenol medium and then reincubated for 30 minutes in 100 μL of DMEM free Phenol medium containing the different fluorescent probes detailed below (Invitrogen). At the end of the exposure, the cells were washed with DMEM free Phenol medium then observed under the microscope. The Mitochondrial transmembrane potential (MMP), intracellular content in Ca^{2+} , membrane integrity and ROS induction were assessed using respectively the following probes at the indicated concentration: 1.5 μM JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzamidozylcarbocyanine iodide); 5 μM Fluo 4AM; 20 μM PI and 5 μM CM-H2DCFDA (general indicator of ROS induction). 2 μM Hoechst was used to visualize the cellular nuclei.

Red and green fluorescence emissions were analysed by fluorescence microscope (ZEISS Axio Vert.A1) using an excitation wavelength of 488 nm and observation wavelengths of 530 nm for green fluorescence and 585 nm for red fluorescence. For blue, the excitation wavelength was 361nm and the observation wavelength was 497 nm. LED intensity was

adjusted to lower level and identical setting was used for acquiring images of all conditions tested. ImageJ software was used to prepare the figures.

Internalisation of IONPs using Darkfield Microscopy

Darkfield Microscopy is used to visualize NP in suspension but also inside the cells (Gnerucci et al. 2016). In our experiment, cells were seeded in 24 well plates at a density of $14 \cdot 10^4$ cells per well for 24 hours, and then treated at two concentrations of IONPs, 5 and 25 $\mu\text{g/mL}$, for additional 24 hours incubation. After treatment, they were washed with DMEM free Phenol medium and reincubated with Hoechst (2 μM) at 37°C for 30 minutes in DMEM free Phenol medium. Cells were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde (PAF) 4% for 20 minutes at room temperature. They were washed again after fixation with PBS and mounted on a glass slide for microscopy imaging (ZEISS Axio Vert.A1).

Internalisation of IONPs using Iron trace element determination by ICP MS

Cells were seeded on a 6 cm petri dish (60 x 15 mm) at a cell density of $1.6 \cdot 10^6$ for 24 hours prior to treatment. On the treatment day, the cells were treated with increasing concentrations of IONPs (F1 and F3; 14 and 30nm): 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for 24 hours. The next day, the supernatant was removed and stored at -20°C for ICP MS analysis. The cells were washed, trypsinized, and counted using trypan blue. The dry pellet was kept for the ICP MS analysis. We used a quadrupole ICP-MS Thermo X serie II (Thermo Electron, Bremen, Germany) equipped with quartz impact bead spray chamber and concentric nebulizer. The Xt interface and collision cell technology (CCT) options were used. Cells were mineralized in HNO_3 and then diluted at 1:100 in water before the analysis. Standard solutions were prepared in nitric acid 1% (v/v). ^{56}Fe isotope was measured and ^{71}Ga at 650 nmol/L was used as internal standard. The limit of detection was 10.2 nmol/L.

Proteomic analysis of differentially expressed proteins (DEP) after IONPs and FeCl_3 treatment

Due to sample number limitation to study IONP and Fe effects on the protein level, we choose to use only the F3 IONP as it showed the strongest cytotoxicity. The other samples were the control non-treated and FeCl_3 treated cells. SH-SY5Y cells were seeded on a 6 cm petri dish (60 x 15 mm) at a cell density of $1.6 \cdot 10^6$ for 24 hours prior to treatment. Then, the cells were treated with the corresponding Lethal Dose 10 (LD10) for FeCl_3 and F3, which has been

determined by the MTT test for 24 hours before protein extraction. The whole process of the proteomic study is detailed in Supplementary material & methods n°2.

Western Blot analysis

For Western Blot analysis, SH-SY5Y protein extracts were made as we previously described in the first section of proteomic analysis. Afterwards, 40µg of total protein was loaded on a TGX Stain-Free™ FastCast™ 12% Acrylamide gels (Biorad) and separated by SDS PAGE. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane using a Transfert System (Biorad). Membranes were blocked with PBS-Tween 0.1% containing 5% nonfat milk and incubated with B-actin antibody (A2228; Sigma) at 1/10 000 dilution, B-Tubulin antibody (NA 1118; ThermoFisher) at 1/1000 dilution, Lamin antibody (SAB4200236; Sigma) at 1/10 000 dilution in PBS-Tween 0.1% containing 5% nonfat milk for two hours at room temperature. After washing in PBS-Tween 0.1%, membranes were incubated with HRP conjugated secondary antibodies (NA931; Sigma ECL anti-mouse IgG HRP-linked, whole antibody) at 1/20 000 dilution in PBS-Tween 0.1% containing 5% nonfat milk for 1 h at room temperature. Membranes were then washed in PBS-Tween 0.1%, and blot images were acquired on Molecular Imager Gel Doc XR+ and Chemidoc XRS+ Systems (Biorad). Specific detected bands corresponding to each protein were quantified using Image Lab Software 5.1 (Biorad), and corresponding intensities were normalized with total protein content and expressed as a ratio.

Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate and repeated at least 3 times. The results were expressed as mean $\pm$ Standard Error to Mean (SEM). The results were treated with a Student's t-test using Microsoft Excel 2010. A *p-value* lower than 0.05 was considered significant (* $p < 0.05$).

Results

IONPs characterization

IONPs were characterized as a powder and as a suspension. The measures (Table 1) showed that the size of the three batches of NPs used in this study is less than 30 nm and is respectively 14, 22 and 30nm for F1, F2 and F3 when they are powder. TEM and XRD diffraction images have been published earlier (Lemine et al. 2014). The NPs were diluted in

culture media with and without serum and for the three types of NPs we observed an increase in the size. Interestingly, the size of aggregated NPs in the suspension depends on its pristine size, the largest NPs will lead to larger aggregates. For example in complete culture media, F1 size is 381.8 nm, F2 436.3 nm and F3 562.1 nm. Moreover, when the culture medium is serum free, the size of the NPs becomes higher than the previous measurements. This suggests protein corona formation and that the serum presence in the culture media reduces the size of the IONPs aggregates. The images obtained by light microscopy showed that agglomeration rate increased in the cells according to the nanoparticles' size (Figure S1). In all measurements, the polydispersity index pdI is comprised between 0.2 and 0.46 suggesting that our NPs are dispersed in monodisperse system. Z potential was under zero in all the tested solutions and was around -10mV. It is known that for zeta potential, when the value is far from zero, this indicates that the particles disperse well in the media since the electrostatic repulsive force among the particles is large, which increases the aqueous stability of NPs. Moreover, NPs dispersion with a zeta potential value far from zero is considered as stable or relatively monodisperse.

IONPs decrease cell viability in size and concentration-dependent manner

MTT assay was performed for studying viability after FeCl₃ or IONPs treatment for 24 hours with a range of concentrations from 12.5 to 200µg/mL of Fe. The results showed that FeCl₃ did not affect the viability of SH-SY5Y cells even at the highest concentrations. However, in the conditions of IONPs, the decrease in viability is IONPs size and concentration dependent (Figure 1A). At all tested concentrations, F3 showed a significant higher decrease in viability compared to the two other types F1 and F2. At 100 and 200 µg /mL the difference is statistically significant between all the IONPs, with higher cytotoxicity when IONP size increased. From the obtained dose-response curves, we determined the doses that induce 10% cell mortality designed below as LD10. The LD10 was 7.82, 10.94 and 3.13 µg/mL respectively for F1, F2 and F3.

We used also the Trypan blue assay to study cell viability. The test evidenced the same results found with the MTT assay although the difference between F1 and F2 was not so clear (Figure 1B) but F3 induced significant higher decreased viability than F1 and F2. At the 200 µg/ml concentration, F3 induces 53 and 51% decrease of viability with respectively MTT and trypan blue assays.

IONP exposure did not affect the cell cycle nor induced apoptosis

As IONPs induce cytotoxicity, we decided to investigate their effect on cell cycle after treatment of 24h with the highest dose of FeCl₃, F1, F2 and F3 used previously for the viability assays (200µg/mL). Results obtained after the flow cytometry analysis showed that there is no perturbation or arrest of the cell cycle and no apoptosis induction, as the proportion of the phase sub G1 was similar between all the treatment conditions (Figure 2). The incubation was further extended to 48h incubation and similar results were obtained (data not shown).

IONPs are up-taken by the SH-SY5Y cells

The uptake of nanoparticles by cells is an important factor to assess in nanotoxicity studies. The forward and side-scattered light (FSC and SSC) of flow cytometry could be used as a guide to measure potential uptake of NPs. Here, we investigated the IONPs cell uptake by measuring the cell size and the granularity of SH-SY5Y cells 24h after exposure using FACS flow cytometry. No changes were observed on the cell size; however, we observe an increase of the granularity measured in SSC mode with the three types of NPs that was NP concentration dependent (Figure 3). Moreover, the uptake of IONP inside cells was also assessed by measuring the Fe trace element in the SH-SY5Y cells by ICP MS. An increase of iron content in the cells was observed with a NP size and concentration-dependent manner (Figure 4) suggesting an uptake of IONPs.

Darkfield Microscopy is used to visualize inorganic nanoparticles in biological matrix, we then imaged SH-SY5Y cells after IONPs treatment using different modes. Results are represented in Figure 5. The control as well as FeCl₃ treated cells showed a weak signal in dark-field mode, however, the IONPs (F2 and F3) showed a strong signal. IONPs are also visible in transmitted light (TL) mode. Nearly all IONP signal colocalized with cells islets that are visible on TL mode and fluorescence mode with the staining of the nucleus in blue by Hoechst. All these results confirmed that IONPs are efficiently internalized by cells.

IONP exposure did not affect mitochondrial function, membrane integrity, intracellular calcium level and didn't induce ROS production

We investigated the IONP effects on diverse cellular processes by fluorescence microscopy using specific probes. Several studies showed that IONPs could induce oxidative stress via ROS induction. Increasing oxidative stress is known to increase the intracellular calcium

level, mitochondrial membrane (MM) damage that disturbs the mitochondrial membrane potential (MMP), cell membrane damage and ultimately cause cell death. JC-1 is a membrane-permeant monomer dye that is widely used to monitor mitochondrial health in various cell types. This dye accumulates in healthy mitochondria causing red fluorescent aggregates but is present as green monomer in the cytoplasm of cells where the MMP is disturbed. Fluo 4AM is used to study the intracellular level of Ca^{2+} and PI to study the membrane integrity as it is not staining viable cells. H2DCFDA is used to assess general oxidant levels.

As presented in Figure 6A, we observed no changes in the JC-1 red signal after 24 hour IONPs treatment suggesting functional MMP and mitochondria in IONPs treated cells. No increase in calcium signal and no signal for PI were observed (Figure 6B), suggesting no changes in intracellular calcium level and cellular membrane integrity in IONP treated cells. And finally, no ROS production was evidenced (Figure 6C) following IONPs exposure for 24 and 48h (results not shown) at doses of 12.5 and 50 $\mu\text{g/mL}$. The presented figures are those corresponding to the dose of 50 $\mu\text{g/mL}$.

IONPs induced DNA damage

Comet assay is used to detect DNA strand breaks. The enzyme formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) is a DNA repair enzyme used to assess quantitatively the levels of 8-oxoguanine in DNA as a measure of damaged DNA. The comet assay showed that IONPs are responsible for DNA fragmentations. In fact, compared to control and FeCl_3 , treatments with F1 and F3, at the concentrations of 50 and 200 $\mu\text{g/mL}$, increased significantly the percentage of DNA in tail (Figure 7). More interesting, at 200 $\mu\text{g/mL}$, F3 induced significant DNA damage higher than F1. Moreover, the repair-specific enzyme Fpg assay showed that IONPs induce DNA damage by increasing of the percentage of DNA in tail more than the DNA breaks detected by the classical comet assay (Figure 7).

Different proteomic changes after IONPs exposure

To have a better picture of the cellular response after exposure to IONPs and FeCl_3 , we used an iTRAQ labeling followed by OFFGEL fractionation and OFF-Line NanoLC MS-MS as previously described by Lehmann et al., (2017). This proteomic investigation allowed us to analyze the whole cell extracts prepared from the control cells versus the cells that were exposed to iron ion (FeCl_3) and F3 IONP and to evaluate the cellular responses to the

presence of iron and IONP in terms of protein quantitative changes. Due to sample number limitation, we selected only the largest IONPs, F3 which induced a higher cytotoxicity. We chose to use the LD10 previously determined by the MTT assay in order to have a low level of mortality and to observe the biological effects. The LD10 was 9.38 $\mu\text{g/mL}$ for FeCl_3 and 3.13 $\mu\text{g/mL}$ for F3. iTRAQ is well suited for protein biomarker and disease specific drug target discovery studies, as it enables both identification and quantitation of proteins in efficient sample multiplexing by evidencing differentially expressed proteins from each sample. Control SH-SY5Y cells were labeled with iTRAQ m/z 113 and 114 ion reporter tags, FeCl_3 treated cells were labeled with iTRAQ m/z 115 and 116 ion reporter tags and F3 treated cells were labeled with iTRAQ m/z 119 and 121 ion reporter tags. Thus, the ratios between treated and control cells indicate the relative protein abundance between those sample conditions.

Our proteomic screening allows to identify 656 proteins and to quantify 649 proteins. Among those proteins, 68 were significantly differentially expressed (DEP) between the FeCl_3 treated vs the control cells (41 upregulated and 27 downregulated) (Table 2) and 20 DEP proteins in IONPs vs control (6 upregulated and 14 downregulated) (Table 3). 15 out of 20 among the DEP in IONPs vs control cells were also dysregulated when the cells were treated with FeCl_3 indicating a common cellular response (Figure 8). The 5 out of 20 remaining that are dysregulated only in response to IONPs will be considered as nano specific and related to the nanoparticle effects.

Gene ontology and network analysis

The 68 and 20 DEP previously quantified following FeCl_3 and IONP treatments were analyzed using bioinformatic tools such as PANTHER (Mi, Muruganujan, and Thomas 2013). Their functional classification according to biological process and PANTHER protein class is illustrated by pie chart. The DEP proteins after FeCl_3 treatment are involved in various biological processes (Figure 9A); the most affected processes are cellular process with 42.2%, metabolic process with 27.7%, cellular component organization or biogenesis with 16.9% and the rest immune system process (3.6%), biological regulation (2.4%) and developmental process (2.4%). The DEP belong mostly to nucleic acid binding class (38.3%) and the cytoskeleton protein class (12.8%) (Figure 9B). After IONP exposure, the impacted biological processes are mostly similar than after FeCl_3 exposure. The 3 top processes are cellular process (33.3%), cellular component organization or biogenesis (24.2%) and metabolic

process (15.2%) (Figure 10A). The main protein classes were cytoskeleton proteins (46.2%) and nucleic acid binding (30.8%) (Figure 10B). Moreover, a Sub-network analysis was performed by Pathway studio with the list of common DEP between FeCl₃ and IONPs treatment in order to identify their common target. We evidenced that the common response showed an impact of FeCl₃ and IONPs on the cytoskeleton as 5 out of these 15 DEP are some main upstream neighbors of cell division and microtubule cytoskeleton assembly (Table 4 and Figure 11). Network analysis was performed with Pathway studio using the network builder tool and identifying the common targets for the 5 DEP related to the specific response to IONPs: TECR, BANF1, NUDT21, ALX3, and HIST1H2AA. The Figure 12 shows that those entities are involved in DNA recombination (TECR and BANF1), cell proliferation (TECR, BANF1 and NUDT21), mRNA splicing (BANF1 and NUDT21), carcinogenesis (BANF1 and NUDT21), apoptosis (BANF1, NUDT21 and ALX3), cell survival (BANF1 and ALX3), and chromatin structure (BANF1 and HIST1H2A).

Cytoskeleton modification and specific Nano response

One common response to FeCl₃ and Nano form of iron (IONPs) is directed towards the cytoskeleton as evidenced by our network analysis. Furthermore, the proteomic analysis evidenced the dysregulation of 3 proteins involved in cytoskeleton function: actin cytoplasmic 1 (iTRAQ ratio 0.54 for FeCl₃ and 0.59 for IONPs); Prelamin A/C (iTRAQ ratio 1.47 for FeCl₃ and 1.37 for IONPs) and tubulin (iTRAQ ratio 0.54 for FeCl₃ and 0.59 for IONPs). These results were validated by another technique which is Western Blotting (WB) that show after IONPs treatment a decrease of expression of actin cytoplasmic 1 (WB ratio: 0.39), an increase of Prelamin A/C (WB ratio: 1.34). The western Blot imaging validated the up or down regulation of actin cytoplasmic 1, Lamin and Tubulin are presented in Figure 13.

Discussion

To investigate how neuroblastoma cell line deals with IONPs and FeCl₃, we performed a cytotoxic and genotoxic study completed by a proteomic study. When taken together, our results produce a large view of the cellular response to iron and IONPs. The IONPs used in our study showed increased size in suspension than in powder. Costa et al., in 2016 evaluated IONPs coated to silica (100 nm) or oleic acid (10.9 nm) cytotoxicity on SH-SY5Y neuroblastoma cell line and A172 glioblastoma cell line (Costa et al. 2016). The team reported that IONPs dispersed in cell culture media showed a larger size and lower stability than those dispersed in water which in concordance with our findings. This increase in size

has been shown in other studies, and it is mainly due to the formation of agglomerates at physiological pH and electrolyte concentration (Bihari et al. 2008). In water, the NPs have also a much larger diameter by DLS than the one determined by the TEM (as powder NPs), indicating that these particles are not particularly stable. In our study, the results obtained by comparing the DLS measurements with or without serum revealed the importance of serum presence to prevent high nanoparticle agglomeration. Various investigations have shown the importance of serum as a dispersant product to improve particle dispersion and stability. However, they reported, simultaneously, that serum is responsible for size increase by forming corona proteins around particles, which prevents the NPs from agglomerating by providing steric hindrance (Wiogo et al. 2011).

Luther et al., (2013) studied the endocytic uptake of IONPs by cultured brain microglia cells. They reported that exposure of microglial cells to BODIPY®-labeled IONPs (BP-IONPs) caused a time- and concentration-dependent increase in the cellular iron content, while the iron content of microglial cells incubated without BP-IONPs remained unchanged (Luther et al. 2013). In fact, according to their study, high concentrations of IONPs or long incubations led to higher specific cellular iron contents that compromised the cell viability. This finding is consistent with the view that microglial cells take up particles until they die (Fleige et al. 2001). Indeed, the loss in cell viability upon exposure to high concentrations of IONPs may be a consequence of a rapid liberation of toxic iron ions from the accumulated particles, as low molecular weight iron has been described to be toxic for microglial cells (Zhang et al. 2006; Oshiro et al. 2008) and to induce detachment of cells (Bishop et al. 2010). Previous studies stated that IONPs are stored in lysosomes where they decompose to free iron (Laskar et al. 2012; Laurent et al. 2012). Free iron ions can affect mitochondria and/or increase radical concentration. Moreover, depending on concentration and other experimental conditions, IONPs can directly damage mitochondria by causing morphological alterations or decrease in mitochondrial membrane potential (Fröhlich 2013). However, the study of Geppert et al., in 2013 concluded that 7 days after astrocytes exposure to the NPs most of the accumulated IONPs remain deposited as electron dense IONP aggregates in cellular vesicles (Geppert et al. 2013). Only little iron has been released from the accumulated IONPs. Taken together, this could explain our findings regarding the increase of cellular iron content without affecting the mitochondrial membrane potential and generation of ROS at 50 µg/mL using fluorescence tools whereas DNA damages and repair were observed. Indeed, it has been reported that the increase of iron causes an oxidative imbalance via the stimulation of the production of ROS

mediated mainly by Fe^{2+} ions. However, in our study, the effect of Fe^{3+} ions resulting from the dissolution of FeCl_3 did not induce any cytotoxicity at the level of SHSY-5Y cells in contrast to IONPs.

Cytoskeletal disruption and mitochondrial activity as well as changes in protein and nuclear metabolism are the main effects of NPs reported by proteomic studies. The results of the proteomic investigation evidenced the difference of response between iron ion and iron nanoparticles which can explain the toxicity of IONPs compared to the iron ion overload. This is in the favor of the hypothesis that the effects of IONPs accumulation are more toxic than the iron ion release. Our proteomic outcomes evidenced the effect of IONPs on the actin cytoskeleton. Those findings are in concordance with the results of by Soenen et al., using fluorescence tools (Soenen et al. 2010). In their paper, the authors reported that Resovist, Endorem and MLs (IONPs based drugs) induced transient actin cytoskeleton alterations in the human blood outgrowth endothelial cells (hBOECS). Moreover, they found that those drugs abrogated the formation of long and extended microtubules leading to a high compact microtubule network closer to the cell nucleus.

The list of different proteins dysregulated at the end of our study was compared to the list of proteins published by Petrak et al., in 2008 known as the "déjà vu", and the lists of proteins deregulated at the end of different studies (Petrak et al. 2008; Triboulet et al. 2013; Triboulet et al. 2015; Dalzon et al. 2017). The comparative study showed that certain proteins such as keratin, annexin, peroxyredoxin, tropomyosin, enolase and tubulin have already been reported as the most disturbed proteins following exposure to metals and more specifically to metallic NPs such as copper, titanium or mineral NPs such as silica NPs. In 2015, Vogt et al., studied the composition of "corona" proteins following treatments of RAW 264.7 macrophages with dextran-coupled iron NPs (Vogt et al. 2015). Their results showed that the most abundant proteins are linked to hemostasis, in particular fibrinogen and coagulation factors.

Moreover, among the 5 DEP specific to the nano form of Fe, the protein "Barrier-to-autointegration factor" BANF1 was reported in a study published in 2014 by Edelmann et al., to be disturbed and down regulated following the exposure of BEAS-2B type human lung cells to copper NPs (Edelmann et al. 2014). Other proteins were also affected and are involved in cytoskeletal signaling pathways, epithelial remodeling, ILK, EIF2 and RhoA, etc. These proteins had a molecular function: death and cell survival, protein synthesis, post-

translational, protein folding, cellular development and proliferation, cell cycle and cell morphology.

Here, we report for the first time, to our knowledge, that by the proteomic study we have been able to deduce that the NPs of iron have effects not only on the cytoskeleton but also on the cell viability by the deregulation of the specific nano proteins «Barrier-to-autointegration factor, Histone H2A type 1-A and Homeobox protein aristaless-like 3 ». This makes these three proteins potential biomarkers of exposure to iron NPs.

Conclusion

To conclude, the cytotoxic, genotoxic and proteomic investigations following cell treatments by IONPs or ionic iron Fe^{3+} made it possible to study the global profile following nanoparticle exposure. Cytotoxicity and genotoxicity studies have shown that IONPs are more toxic to SH-SY5Y cells than free ferric ions. The proteomic study has shown that the common point between the response to ferric ions and iron NPs are cytoskeletal disruption and cell division. All together this study supports the potential use of IONPs to treat tumors.

Declaration of interests

The authors report no conflicts of interest in this work.

Acknowledgments

We would like to thank Pr. Lassaad El Mir and his team for providing Iron Oxide Nanoparticles, the EQUIPEX Nano-ID (ANR-10-EQPX-39-01) for the access to the nanoZetasizer, and Dr. Marie José Stasia and her team for the access to the cell culture laboratory. Thanks also to Dr. Catherine Guette and Dr. Damien Besson for the FASP method adjusted to iTRAQ labeling, and Dr. Sylvie Michelland for her kind assistance in the proteomic study.

Funding

This study was supported by research grants for Dalel Askri from the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research, the Auvergne Rhone-Alpes Region (grant N° 16.007278.01) and the French Embassy in Tunisia-CampusFrance. The project leading to this publication has also received funding for Dr. Sylvia G. Lehmann from Excellence Initiative of Aix-Marseille University - A*MIDEX, a French “Investissements d’Avenir” program, through its associated Labex SERENADE project.

References

- Alarifi, Saud, Daoud Ali, Saad Alkahtani, and M. S. Alhader. 2014. "Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress, DNA Damage, and Caspase Activation in the Human Breast Cancer Cell Line." *Biological Trace Element Research* 159 (1–3): 416–24. doi:10.1007/s12011-014-9972-0.
- Bihari, Peter, Minnamari Vippola, Stephan Schultes, Marc Praetner, Alexander G. Khandoga, Christoph A. Reichel, Conrad Coester, Timo Tuomi, Markus Rehberg, and Fritz Krombach. 2008. "Optimized Dispersion of Nanoparticles for Biological in Vitro and in Vivo Studies." *Particle and Fibre Toxicology* 5. doi:10.1186/1743-8977-5-14.
- Bishop, Glenda M., Ivo F. Scheiber, Ralf Dringen, and Stephen R. Robinson. 2010. "Synergistic Accumulation of Iron and Zinc by Cultured Astrocytes." *Journal of Neural Transmission* 117 (7): 809–17. doi:10.1007/s00702-010-0420-9.
- Campone, Mario, Isabelle Valo, Pascal Jézéquel, Marie Moreau, Alice Boissard, Loïc Campion, Delphine Loussouarn, Véronique Verrièle, Olivier Coqueret, and Catherine Guette. 2015. "Prediction of Recurrence and Survival for Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) by a Protein Signature in Tissue Samples." *Molecular & Cellular Proteomics* 14 (11): 2936–46. doi:10.1074/mcp.M115.048967.
- Cortajarena, Aitziber L., Daniel Ortega, Sandra M. Ocampo, Alberto Gonzalez-García, Pierre Couleaud, Rodolfo Miranda, Cristobal Belda-Iniesta, and Angel Ayuso-Sacido. 2014. "Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings." *Nanobiomedicine* 1: 2. doi:10.5772/58841.
- Costa, Carla, Fátima Brandão, Maria João Bessa, Solange Costa, Vanessa Valdiglesias, Gözde Kiliç, Natalia Fernández-Bertólez, et al. 2016. "In Vitro Cytotoxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Neuronal and Glial Cells. Evaluation of Nanoparticle Interference with Viability Tests." *Journal of Applied Toxicology* 36 (3): 361–72. doi:10.1002/jat.3213.
- Dalzon, Bastien, Catherine Aude-Garcia, Véronique Collin-Faure, Hélène Diemer, David Béal, Fanny Dussert, Daphna Fenel, et al. 2017. "Differential Proteomics Highlights Macrophage-Specific Responses to Amorphous Silica Nanoparticles." *Nanoscale* 9 (27): 9641–58. doi:10.1039/c7nr02140b.
- Edelmann, Mariola J., Leslie A. Shack, Caitlin D. Naske, Keisha B. Walters, and Bindu Nanduri. 2014. "SILAC-Based Quantitative Proteomic Analysis of Human Lung Cell Response to Copper Oxide Nanoparticles." *PLoS ONE* 9 (12): 1–32. doi:10.1371/journal.pone.0114390.
- Fleige, Gerrit, Christiane Nolte, Michael Synowitz, Florian Seeberger, Helmut Kettenmann, and Claus Zimmer. 2001. "Magnetic Labeling of Activated Microglia in Experimental Gliomas." *Neoplasia* 3 (6): 489–99. doi:10.1038/sj.neo.7900176.

Fröhlich, Eleonore. 2013. "Cellular Targets and Mechanisms in the Cytotoxic Action of Non-Biodegradable Engineered Nanoparticles." *Current Drug Metabolism* 14 (9): 976–88. doi:10.2174/1389200211314090004.

Geppert, Mark, Charlotte Petters, Karsten Thiel, and Ralf Dringen. 2013. "The Presence of Serum Alters the Properties of Iron Oxide Nanoparticles and Lowers Their Accumulation by Cultured Brain Astrocytes." *Journal of Nanoparticle Research* 15 (1). doi:10.1007/s11051-012-1349-8.

Gnerucci, Alessio, Giovanni Romano, Fulvio Ratto, Sonia Centi, Michela Baccini, Ugo Santosuosso, Roberto Pini, and Franco Fusi. 2016. "Statistical Detection of Nanoparticles in Cells by Darkfield Microscopy." *Physica Medica* 32 (7): 938–43. doi:10.1016/j.ejmp.2016.06.007.

González-Flecha, Beatriz. 2004. "Oxidant Mechanisms in Response to Ambient Air Particles." *Molecular Aspects of Medicine*. doi:10.1016/j.mam.2004.02.017.

Khan, Mohd Imran, Akbar Mohammad, Govil Patil, S. A H Naqvi, L. K S Chauhan, and Iqbal Ahmad. 2012. "Induction of ROS, Mitochondrial Damage and Autophagy in Lung Epithelial Cancer Cells by Iron Oxide Nanoparticles." *Biomaterials* 33 (5): 1477–88. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.080.

Laskar, Amit, Moumita Ghosh, Sikander Iqbal Khattak, Wei Li, and Xi-Ming Yuan. 2012. "Degradation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle-Induced Ferritin by Lysosomal Cathepsins and Related Immune Response." *Nanomedicine* 7 (5): 705–17. doi:10.2217/nnm.11.148.

Laurent, Sophie, Carmen Burtea, Coralie Thirifays, Urs O. Häfeli, and Morteza Mahmoudi. 2012. "Crucial Ignored Parameters on Nanotoxicology: The Importance of Toxicity Assay Modifications And 'cell Vision.'" *PLoS ONE* 7 (1). doi:10.1371/journal.pone.0029997.

Lehmann, Sylvia G., Sandrine Bourgoïn-Voillard, Michel Seve, and Walid Rachidi. 2017. "Tubulin Beta-3 Chain as a New Candidate Protein Biomarker of Human Skin Aging: A Preliminary Study." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. doi:10.1155/2017/5140360.

Lemine, O. M., K. Omri, M. Iglesias, V. Velasco, P. Crespo, P. De La Presa, L. El Mir, Houcine Bouzid, A. Yousif, and Ali Al-Hajry. 2014. "Fe₃O₄-Fe₂O₃ by Sol-Gel with Large Nanoparticles Size for Magnetic Hyperthermia Application." *Journal of Alloys and Compounds* 607. Elsevier B.V.: 125–31. doi:10.1016/j.jallcom.2014.04.002.

Lin, Yi-Reng, Chao-Jen Kuo, Hugo You-Hsien Lin, Chin-Jen Wu, and Shih-Shin Liang. 2014. "A Proteomics Analysis to Evaluate Cytotoxicity in NRK-52E Cells Caused by Unmodified Nano-Fe₃O₄." *The Scientific World Journal* 2014: 1–9. doi:10.1155/2014/754721.

Luther, Eva M., Charlotte Petters, Felix Bulcke, Achim Kaltz, Karsten Thiel, Ulf Bickmeyer, and Ralf Dringen. 2013. "Endocytotic Uptake of Iron Oxide Nanoparticles by Cultured Brain Microglial Cells." *Acta Biomaterialia* 9 (9). Acta Materialia Inc.: 8454–65. doi:10.1016/j.actbio.2013.05.022.

Malvindi, Maria Ada, Valeria De Matteis, Antonio Galeone, Virgilio Brunetti, George C. Anyfantis, Athanassia Athanassiou, Roberto Cingolani, and Pier Paolo Pompa. 2014. "Toxicity Assessment of Silica Coated Iron Oxide Nanoparticles and Biocompatibility Improvement by Surface Engineering." *PLoS ONE* 9 (1): 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0085835.

Mi, Huaiyu, Anushya Muruganujan, and Paul D. Thomas. 2013. "PANTHER in 2013: Modeling the Evolution of Gene Function, and Other Gene Attributes, in the Context of Phylogenetic Trees." *Nucleic Acids Research* 41 (D1): 377–86. doi:10.1093/nar/gks1118.

Muller, Julie, François Huaux, Nicolas Moreau, Pierre Misson, Jean François Heilier, Monique Delos, Mohammed Arras, Antonio Fonseca, Janos B. Nagy, and Dominique Lison. 2005. "Respiratory Toxicity of Multi-Wall Carbon Nanotubes." *Toxicology and Applied Pharmacology* 207 (3): 221–31. doi:10.1016/j.taap.2005.01.008.

Namvar, Farideh, Heshu Sulaiman Rahman, Rosfarizan Mohamad, Javad Baharara, Mahnaz Mahdavi, Elaheh Amini, Max Stanley Chartrand, and Swee Keong Yeap. 2014. "Cytotoxic Effect of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Synthesized via Seaweed Aqueous Extract." *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 2479–88. doi:10.2147/IJN.S59661.

Oshiro, Satoru, Ken ichi Kawamura, Chun Zhang, Toshio Sone, Masaki S. Morioka, Shin Kobayashi, and Kazuyuki Nakajima. 2008. "Microglia and Astroglia Prevent Oxidative Stress-Induced Neuronal Cell Death: Implications for Aceruloplasminemia." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1782 (2): 109–17. doi:10.1016/j.bbadis.2007.12.002.

Petrak, Jiri, Robert Ivanek, Ondrej Toman, Radek Cmejla, Jana Cmejlova, Daniel Vyoral, Jan Zivny, and Christopher D. Vulpe. 2008. "Déjà vu in Proteomics. A Hit Parade of Repeatedly Identified Differentially Expressed Proteins." *Proteomics* 8 (9): 1744–49. doi:10.1002/pmic.200700919.

Soenen, Stefaan J H, Nele Nuytten, Simon F. De Meyer, Stefaan C. De Smedt, and Marcel De Cuyper. 2010. "High Intracellular Iron Oxide Nanoparticle Concentrations Affect Cellular Cytoskeleton and Focal Adhesion Kinase-Mediated Signaling." *Small* 6 (7): 832–42. doi:10.1002/sml.200902084.

Triboulet, Sarah, Catherine Aude-Garcia, Lucie Armand, Véronique Collin-Faure, Mireille Chevallet, Hélène Diemer, Adèle Gerdil, et al. 2015. "Comparative Proteomic Analysis of the Molecular Responses of Mouse Macrophages to Titanium Dioxide and Copper Oxide Nanoparticles Unravels Some Toxic Mechanisms for Copper Oxide Nanoparticles in Macrophages." *PLoS ONE* 10 (4): 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0124496.

Triboulet, Sarah, Catherine Aude-Garcia, Marie Carrière, Hélène Diemer, Fabienne Proamer, Aurélie Habert, Mireille Chevallet, et al. 2013. “Molecular Responses of Mouse Macrophages to Copper and Copper Oxide Nanoparticles Inferred from Proteomic Analyses.” *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (11): 3108–22. doi:10.1074/mcp.M113.030742.

Vogt, Carmen, Maria Pernemalm, Pekka Kohonen, Sophie Laurent, Kjell Hultenby, Marie Vahter, Janne Lehtiö, Muhammet S. Toprak, and Bengt Fadeel. 2015. “Proteomics Analysis Reveals Distinct Corona Composition on Magnetic Nanoparticles with Different Surface Coatings: Implications for Interactions with Primary Human Macrophages.” *PLoS ONE* 10 (10): 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0129008.

Wiogo, Hilda T R, May Lim, Volga Bulmus, Jimmy Yun, and Rose Amal. 2011. “Stabilization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Biological Media by Fetal Bovine Serum (FBS).” *Langmuir* 27 (2): 843–50. doi:10.1021/la104278m.

Wisniewski, J R, A Zougman, N Nagaraj, M Mann, and Jacek R Wi. 2009. “Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis.” *Nature Methods* 6 (5): 377–362. doi:10.1038/nmeth.1322.

Yarjanli, Zahra, Kamran Ghaedi, Abolghasem Esmaeili, Soheila Rahgozar, and Ali Zarrabi. 2017. “Iron Oxide Nanoparticles May Damage to the Neural Tissue through Iron Accumulation, Oxidative Stress, and Protein Aggregation.” *BMC Neuroscience* 18 (1). BioMed Central: 51. doi:10.1186/s12868-017-0369-9.

Zhang, X., N. Surguladze, B. Slagle-Webb, A. Cozzi, and James R. Connor. 2006. “Cellular Iron Status Influences the Functional Relationship between Microglia and Oligodendrocytes.” *GLIA* 54 (8): 795–804. doi:10.1002/glia.20416.

List of figures:

Figure 1. Viability of SH-SY5Y cells determined by MTT (A) and trypan blue exclusion (B) tests following 24 h treatment with FeCl₃ and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3 (light grey to black bars respectively). Cell viability data are presented as normalized to the non-treated control cells as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. * $p < 0.05$ compared to control; § $p < 0.05$ compared to Fe; # $p < 0.05$ compared to F1 and \$ $p < 0.05$ compared to F2 using t-student test.

Figure 2. Cell cycle analysis of SH-SY5Y cells by flow cytometry following 24 h treatment with FeCl₃ and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3 at the dose of 200 $\mu\text{g/mL}$. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. t-student test was used for the statistics.

Figure 3. Cell size and granularity analyses of SH-SY5Y cells by flow cytometry following 24 h treatment with FeCl₃ and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3. The results are presented as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. FSC: Forward Scattered Light; SSC: Side Scattered Light. * $p < 0.05$ compared to control using t-student test.

Figure 4. Cellular uptake of increasing size IONPs, F1 and F3, following 24 h treatment and measured by ICP-MS. The results are presented as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. * $p < 0.05$ compared to control using t-student test.

Figure 5. Internalisation of IONPs (F2 and F3) determined by Darkfield Microscopy following 24 h treatment. NC: Negative Control. Images were analysed using ImageJ Software. Hoechst-blue stained nuclei.

Figure 6 (A, B and C) Effects of IONPs at 50 $\mu\text{g/mL}$ for 24 hours on mitochondrial function, membrane integrity, intracellular Ca concentration and ROS production.

Figure 7. Induction of DNA damage and Fpg DNA repair (Mean tail intensity %) in SH-SY5Y cells measured by alkaline comet assay following FeCl₃ and IONPs exposure (C1 means 50 $\mu\text{g/mL}$ and C2 means 200 $\mu\text{g/mL}$). C0: Negative Control; PC: Positive Control. The results are presented as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. * $p < 0.05$ compared to control; § $p < 0.05$ compared to Fe, and # $p < 0.05$ compared to F1 using t-student test.

Figure 8. Venn diagram showing common cellular response between FeCl₃ and IONPs treatments.

Figure 9. Functional classification of the 68 DEP following Fe exposure according to the biological processes (A) and PANTHER protein class (B) (Analysed and generated from PANTHER).

Figure 10. Functional classification of the 20 DEP following IONP exposure according to the biological processes (A) and PANTHER protein classes (B) (Analysed and generated from PANTHER).

Figure 11. The common DEP for FeCl₃ and IONPs treatment are some upstream Neighbors of microtubule cytoskeleton assembly (Analysed and generated from pathway studio).

Figure 12. Common targets for the 5 DEP options related to the specific response to IONPs (Analysed and generated from pathway studio).

Figure 13. Representative Western blot results of Actin, Lamin and Tubulin bands from Western Blot validation. Relative quantification was performed on the results of three independent experiments using ImageLab software 6.0 (Biorad) after normalization to total proteins. * $p < 0.05$ compared to control using t-student test.

List of tables:

Table1. IONPs characterization using Transmission Electron Microscopy and Dynamic Light Scattering. F for fraction, TEM for Transmission Electron Microscopy, DLS for Dynamic Light Scattering, CFS for Calf Fetal Serum, PdI for Polydispersity Index. P for Potential.

Table 2. Downregulated (red) and Upregulated (green) proteins after FeCl₃ exposure compared to control cells. Statistically significant iTRAQ ratios (p value ratio and p value sample ≤ 0.05) for the 68 proteins that are down or upregulated.

Table 3. Downregulated (red) and Upregulated (green) proteins after IONP exposure compared to control cells. Statistically significant iTRAQ ratios (p value ratio and p value sample ≤ 0.05) for the 20 proteins that are down or upregulated.

Table 4. Upstream neighbors of common DEP for FeCl₃ and IONPs treatment (Analysed and generated from pathway studio).

Figures and Tables

Cell viability assays

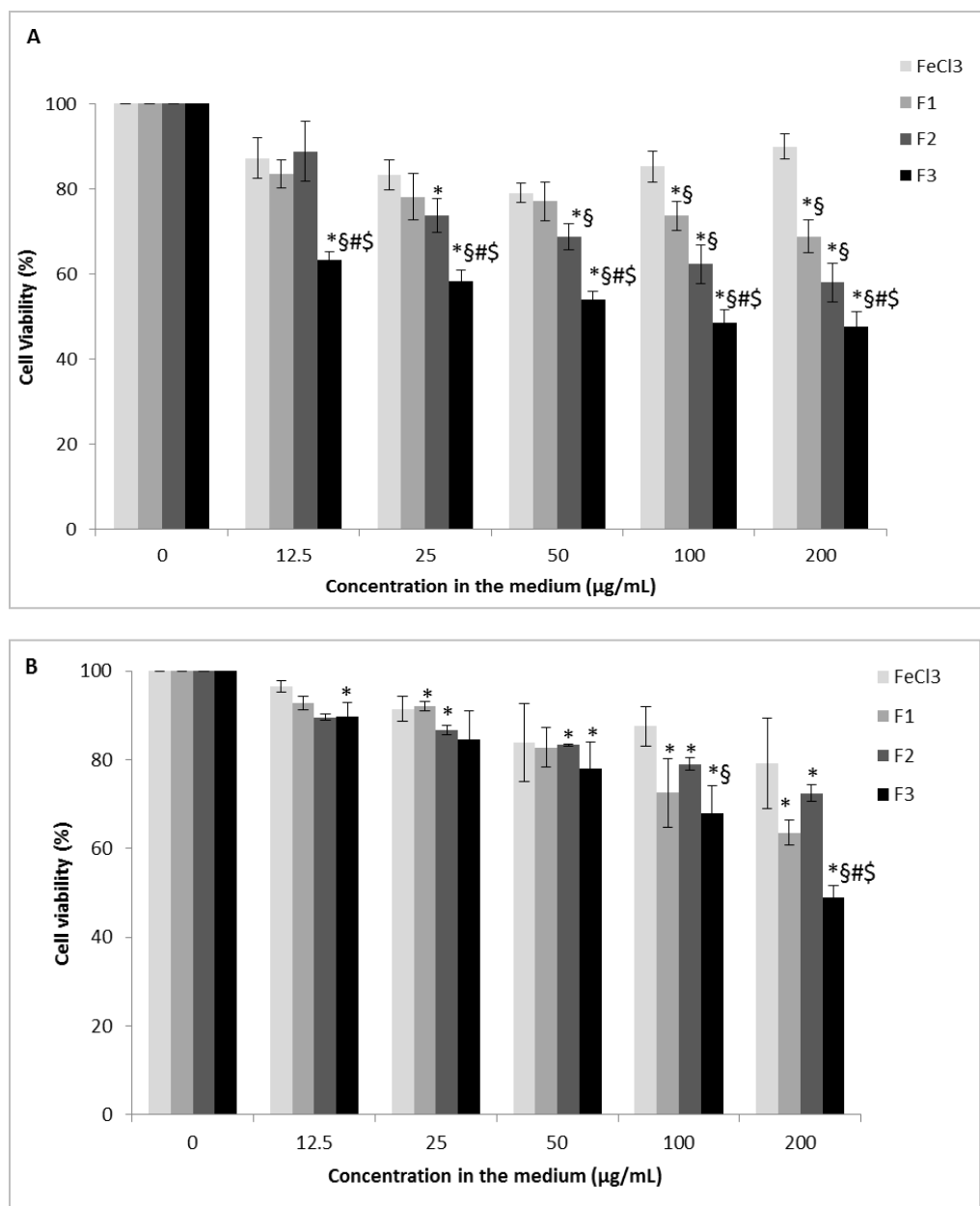


Figure 1. Viability of SH-SY5Y cells determined by MTT (A) and trypan blue exclusion (B) tests following 24 h treatment with FeCl₃ and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3 (light grey to black bars respectively). Cell viability data are presented as normalized to the non-treated control cells as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. * $p < 0.05$ compared to control; § $p < 0.05$ compared to Fe; # $p < 0.05$ compared to F1 and \$ $p < 0.05$ compared to F2 using t-student test.

Cell cycle analysis

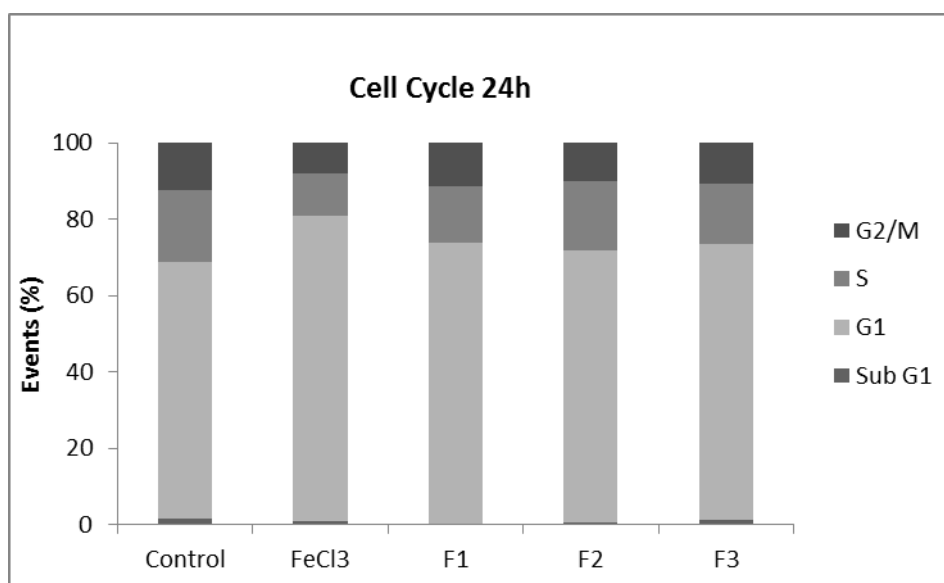


Figure 2. Cell cycle analysis of SH-SY5Y cells by flow cytometry following 24 h treatment with FeCl₃ and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3 at the dose of 200 µg/mL. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. t-student test was used for the statistics.

Cell size and granularity analyses by FSC and SSC mode 24h after IONPs exposure

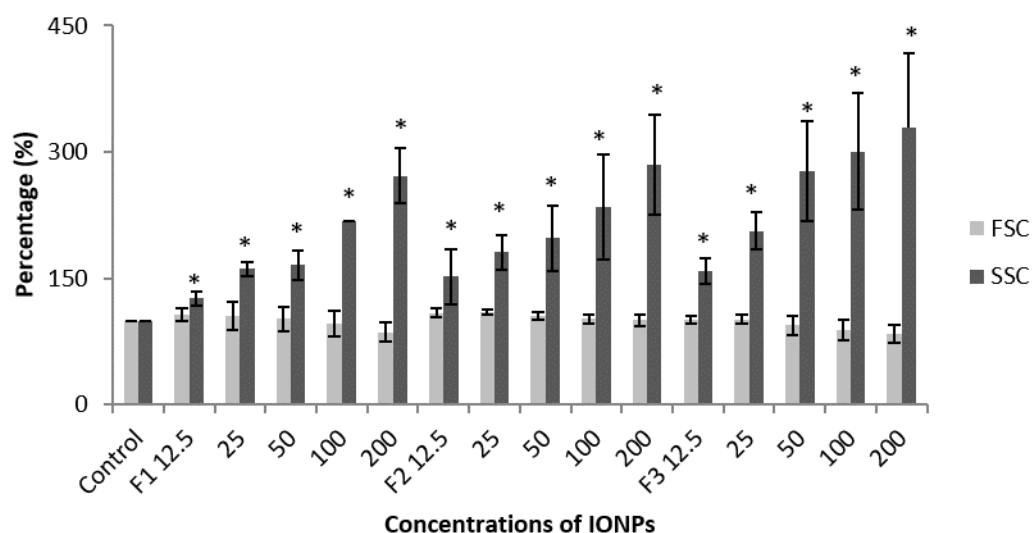


Figure 3. Cell size and granularity analyses of SH-SY5Y cells by flow cytometry following 24 h treatment with FeCl_3 and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3. The results are presented as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. FSC: Forward Scattered Light; SSC: Side Scattered Light. * $p < 0.05$ compared to control using t-student test.

Iron trace element assay by ICP MS

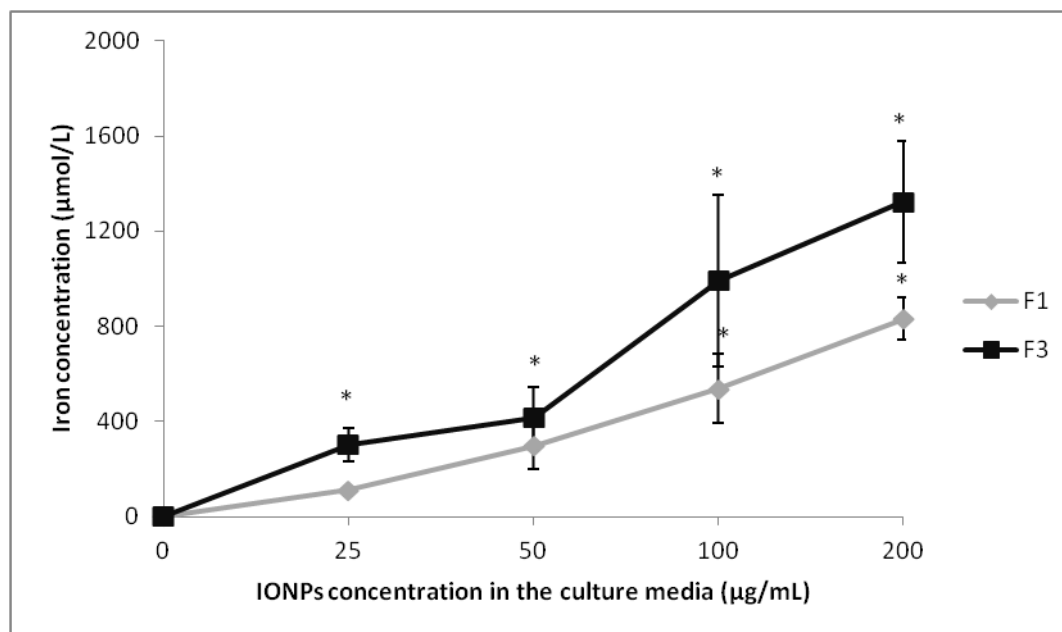


Figure 4. Cellular uptake of increasing size IONPs, F1 and F3, following 24 h treatment and measured by ICP-MS. The results are presented as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. * $p < 0.05$ compared to control using t-student test.

Internalisation of IONPs using Darfield Microscopy

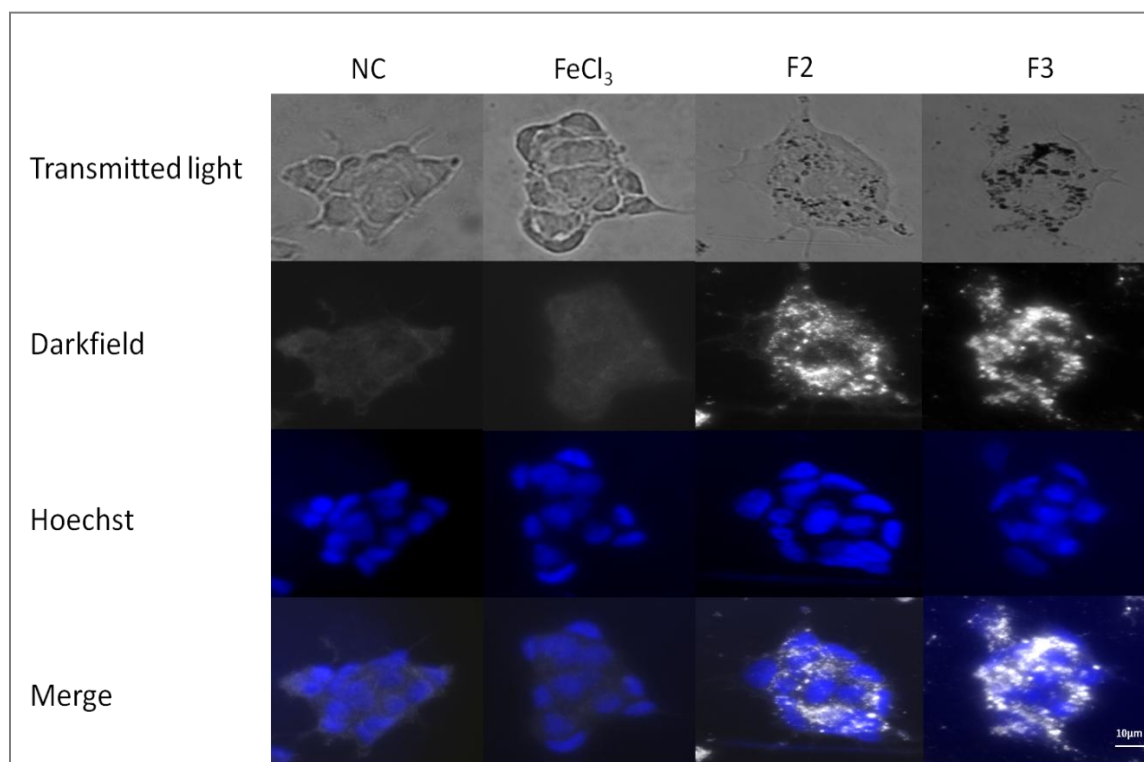


Figure 5. Internalisation of IONPs (F2 and F3) determined by Darkfield Microscopy following 24 h treatment. NC: Negative Control. Images were analysed using ImageJ Software. Hoechst-blue stained nuclei.

Fluorescence assays to study MMP, Ca²⁺ content, membrane integrity and ROS induction

Figure 6 (A, B and C) Effects of IONPs at 50 µg/ml for 24 hours on mitochondrial function, membrane integrity, intracellular Ca concentration and ROS production.

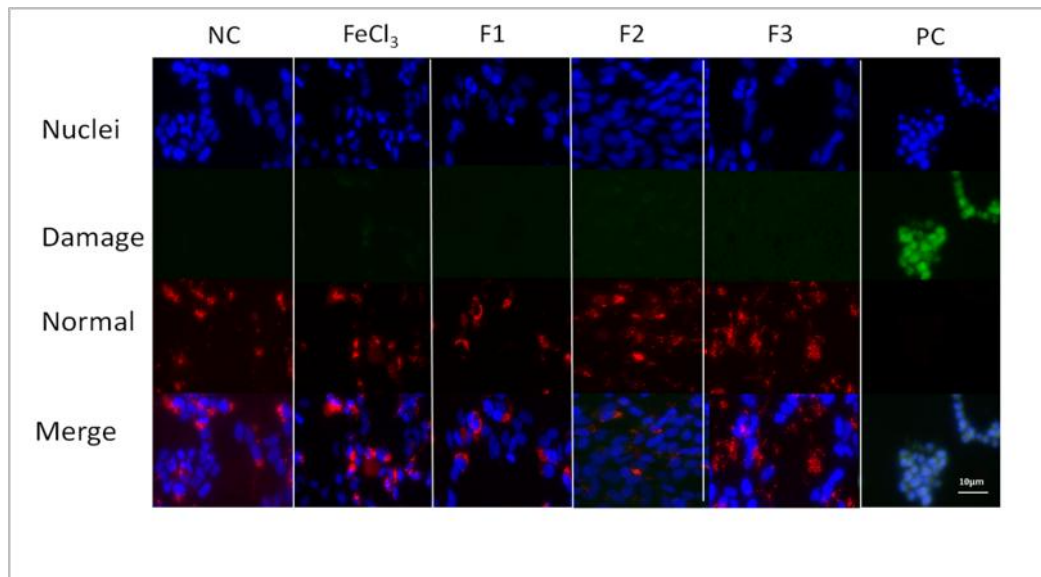


Figure 6A. Mitochondrial Membrane Potential (MMP) of SH-SY5Y cells following 24h treatment with 50 µg/mL FeCl₃ and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3. NC: Negative Control; PC: H₂O₂, Positive Control. Blue channel: Hoechst-blue stained nuclei, Green channel: Mitochondria with decreased membrane potential, Red channel: Healthy Mitochondria. Images were analysed using Image J Software.

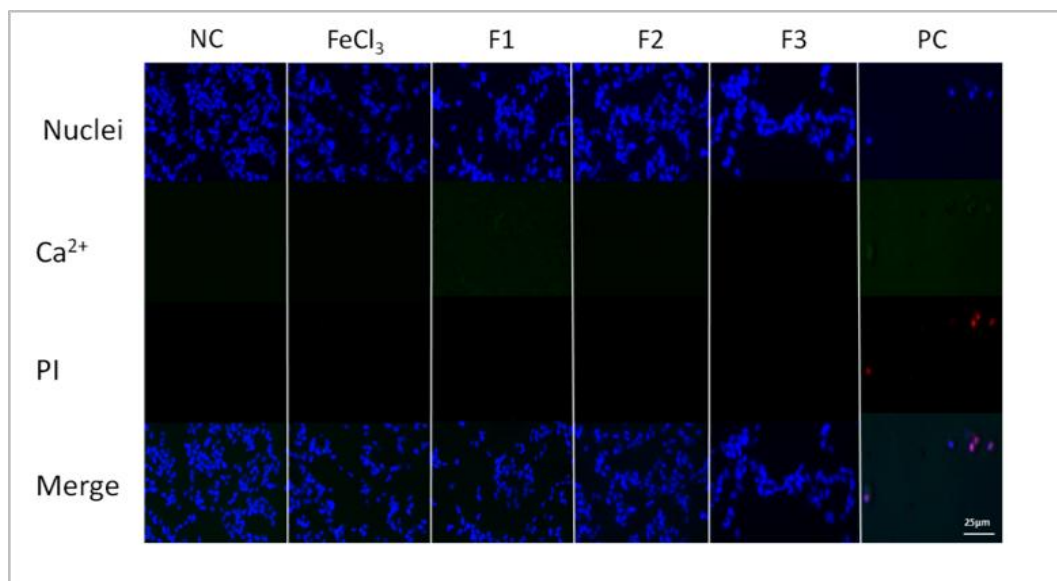


Figure 6B. Intracellular calcium content and membrane integrity of SH-SY5Y cells following 24 h treatment with 50 µg/mL FeCl₃ and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3. NC: Negative Control; PC: H₂O₂, Positive Control. PI: Propidium Iodide. Blue channel: Hoechst-blue stained nuclei, Green channel: Increased intracellular calcium level in the cytoplasm, Red channel: Membrane damage. Images were analysed using Image J Software.

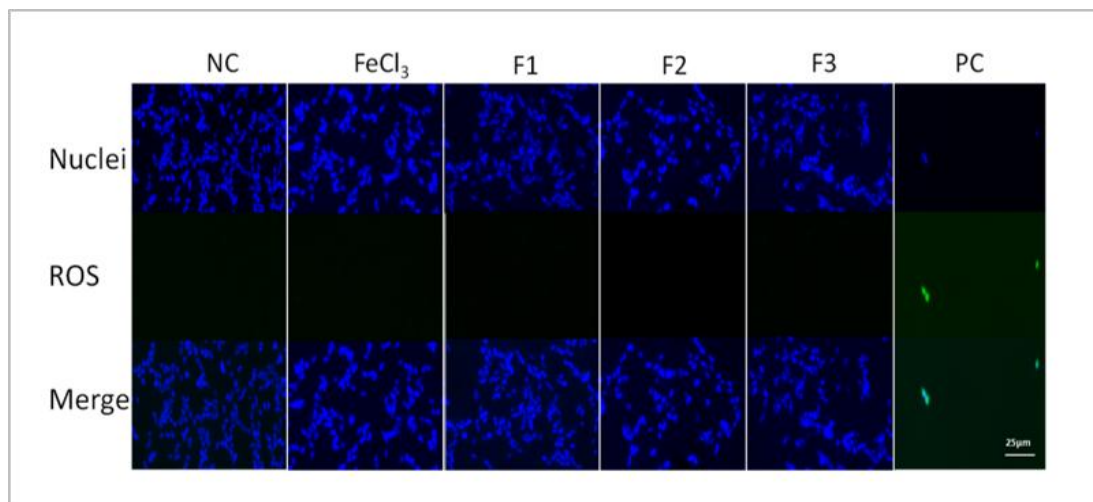


Figure 6C. ROS induction in SH-SY5Y cells following 24 h treatment with 50 µg/mL FeCl₃ and IONPs of increasing sizes, F1; F2 and F3. NC: Negative Control; PC: H₂O₂, Positive Control. Blue channel: Hoechst-blue stained nuclei, Green channel: ROS induction. Images were analysed using Image J Software.

DNA damage and Fpg DNA repair

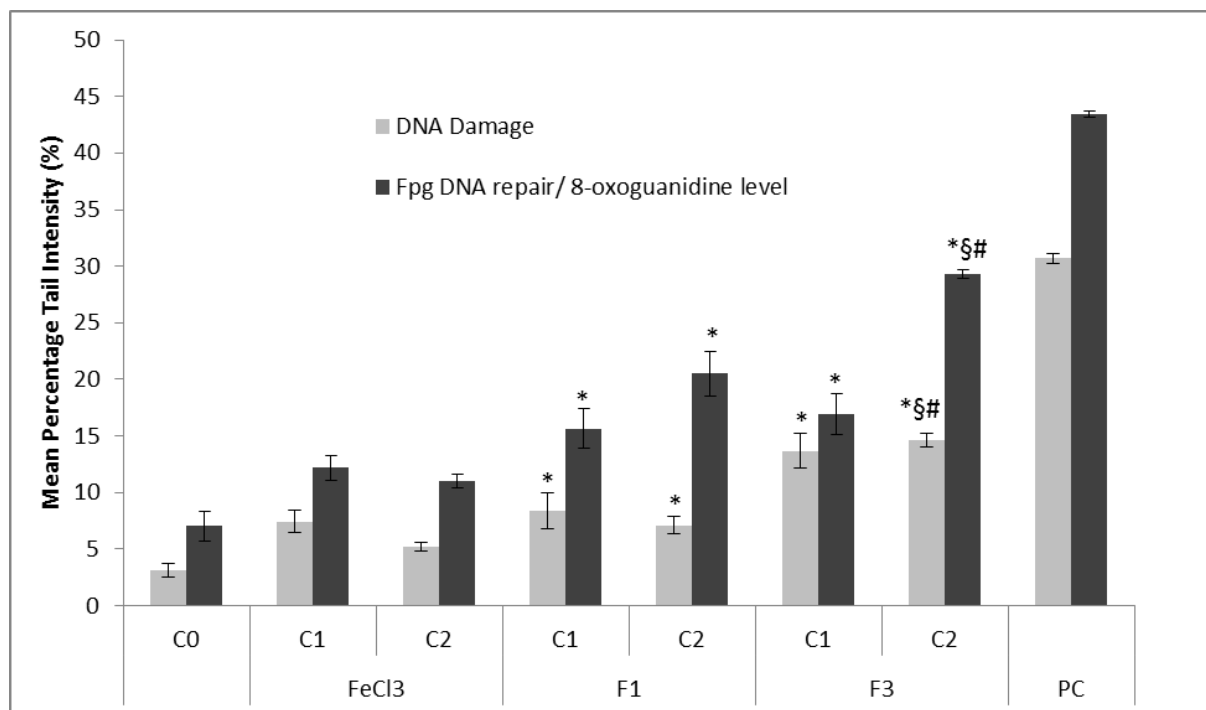


Figure 7. Induction of DNA damage and Fpg DNA repair (Mean tail intensity %) in SH-SY5Y cells measured by alkaline comet assay following FeCl_3 and IONP_5 exposure (C1 means $50 \mu\text{g/mL}$ and C2 means $200 \mu\text{g/mL}$). C0: Negative Control; PC: Positive Control. The results are presented as the mean $\pm$ SEM of three biological replicates. * $p < 0.05$ compared to control; § $p < 0.05$ compared to Fe, and # $p < 0.05$ compared to F1 using t-student test.

Proteomic analysis of differentially expressed proteins (DEP) after FeCl₃ and IONPs treatments

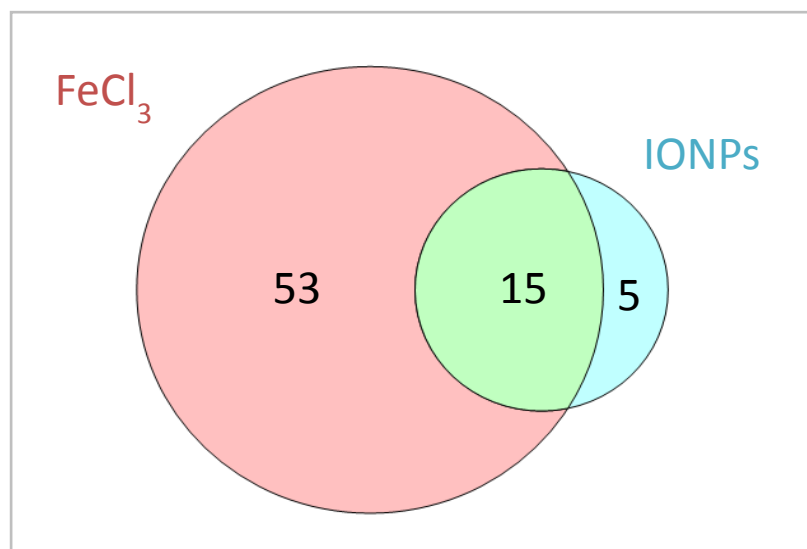


Figure 8. Venn diagram showing common cellular response between FeCl₃ and IONPs treatments.

Gene ontology and network analysis

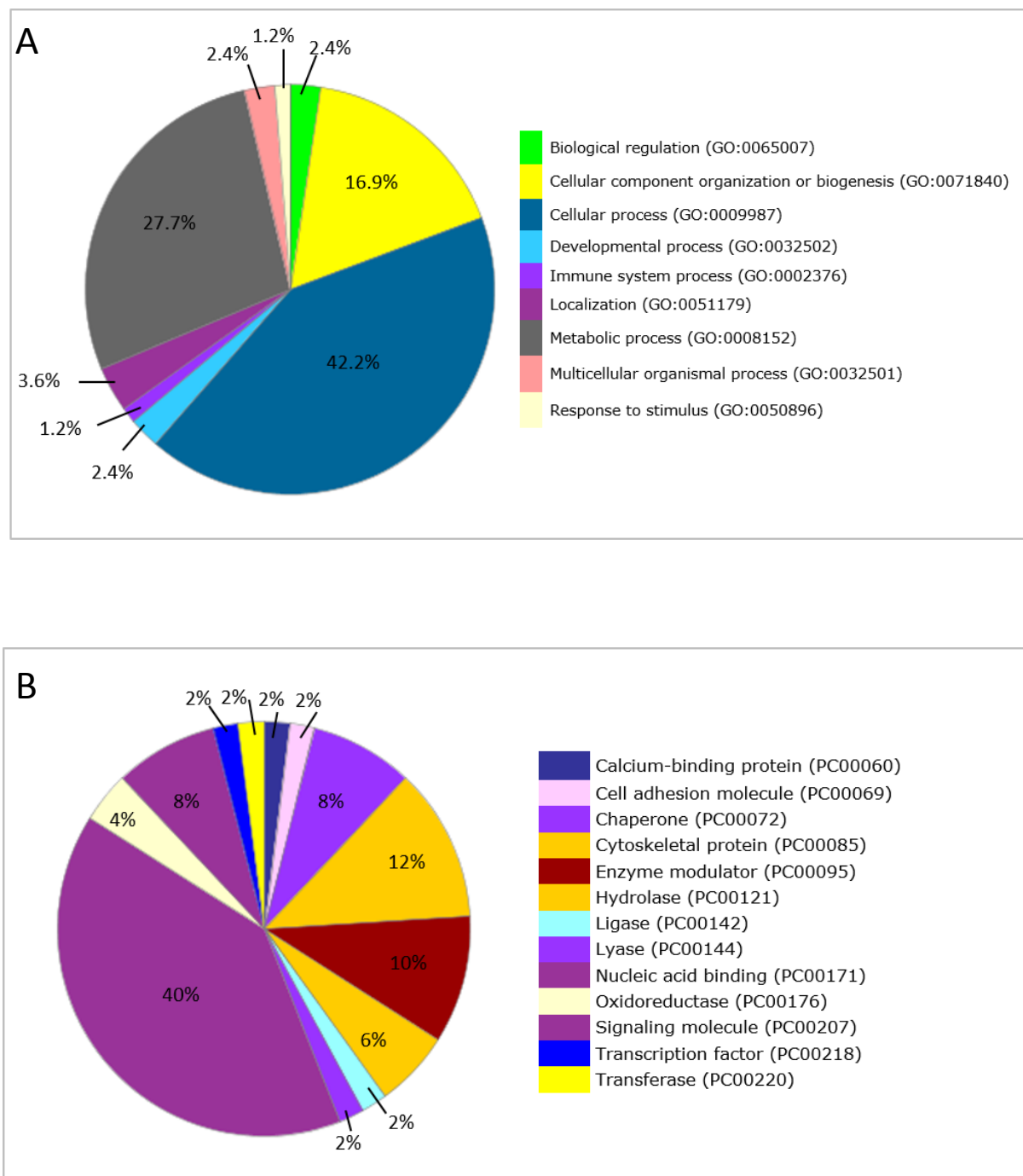


Figure 9. Functional classification of the 68 DEP following Fe exposure according to the biological processes (A) and PANTHER protein class (B) (Analysed and generated from PANTHER)

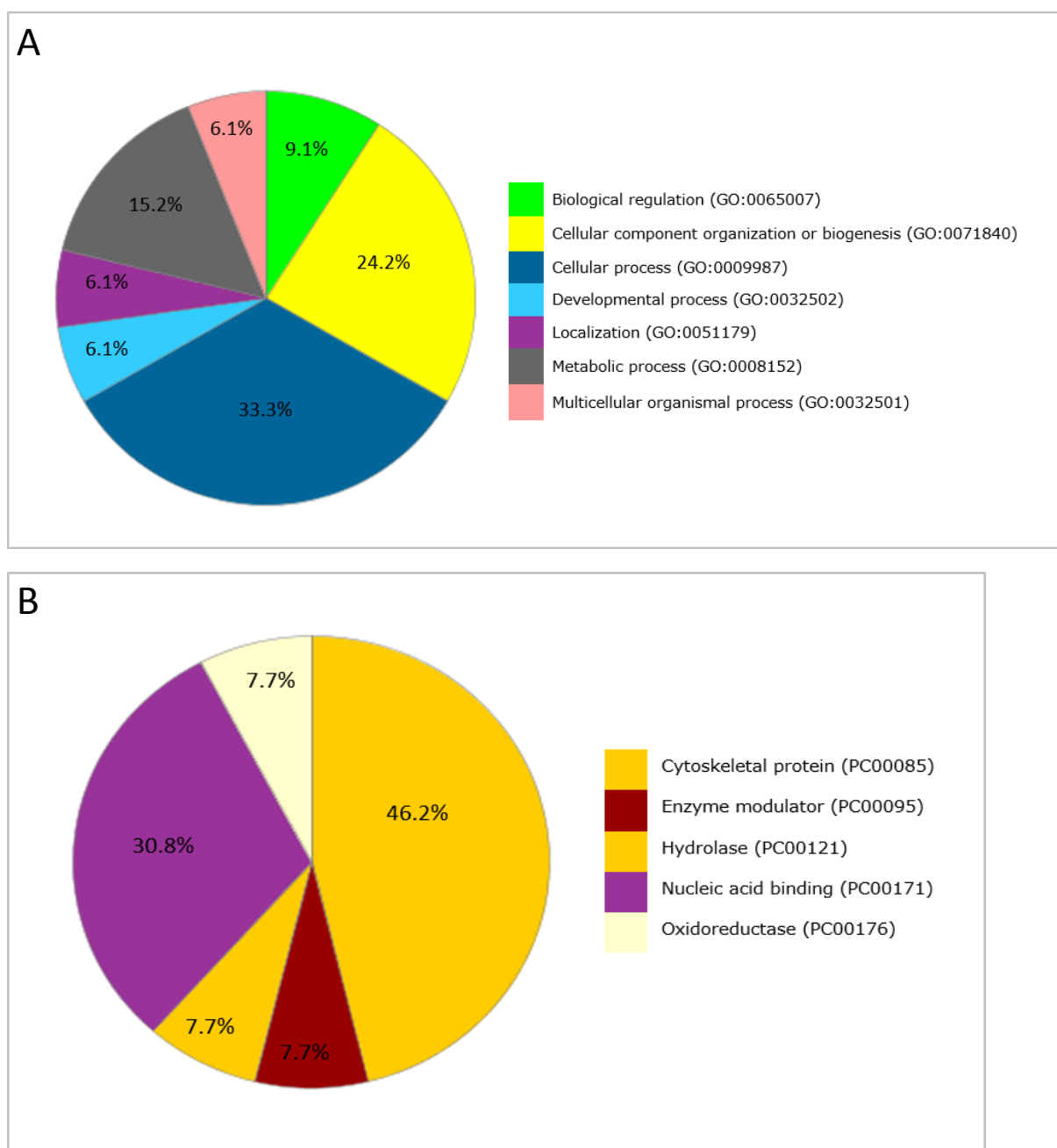


Figure 10. Functional classification of the 20 DEP following IONP exposure according to the biological processes (A) and PANTHER protein classes (B) (Analysed and generated from PANTHER)

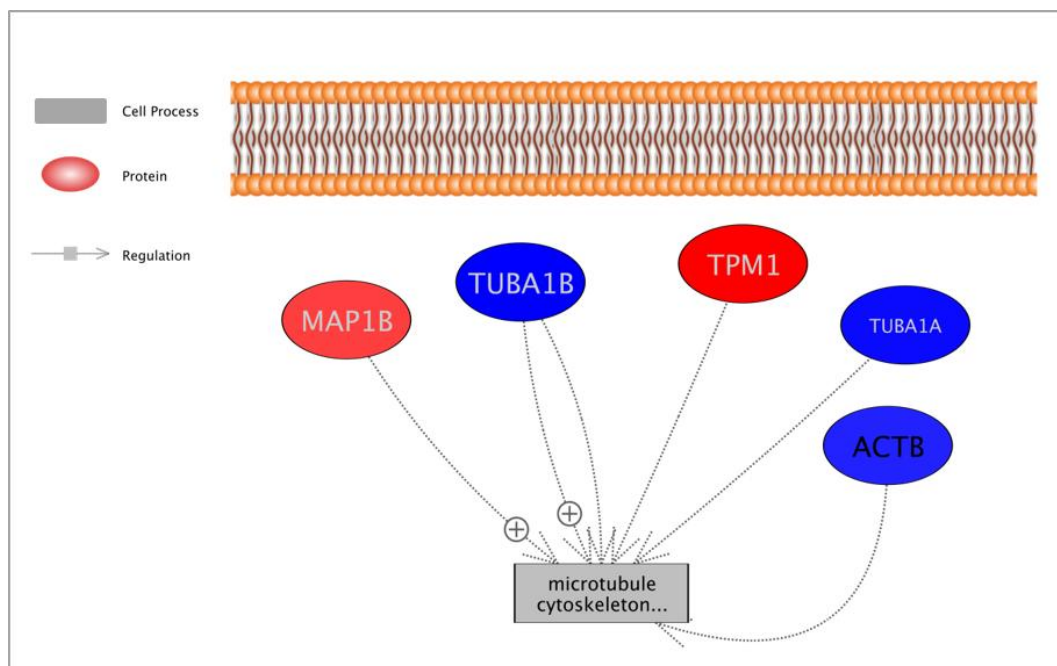


Figure 11. The common DEP for FeCl_3 and IONPs treatment are some upstream Neighbors of microtubule cytoskeleton assembly (Analysed and generated from pathway studio)

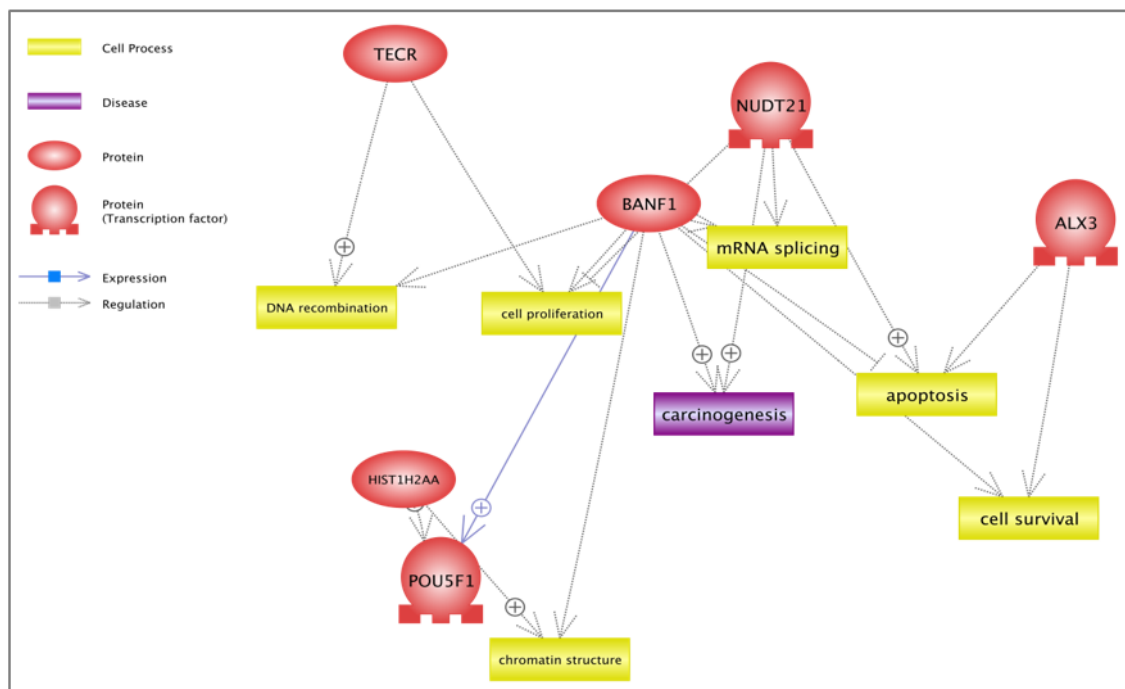


Figure 12. Common targets for the 5 DEP options related to the specific response to IONPs (Analysed and generated from pathway studio)

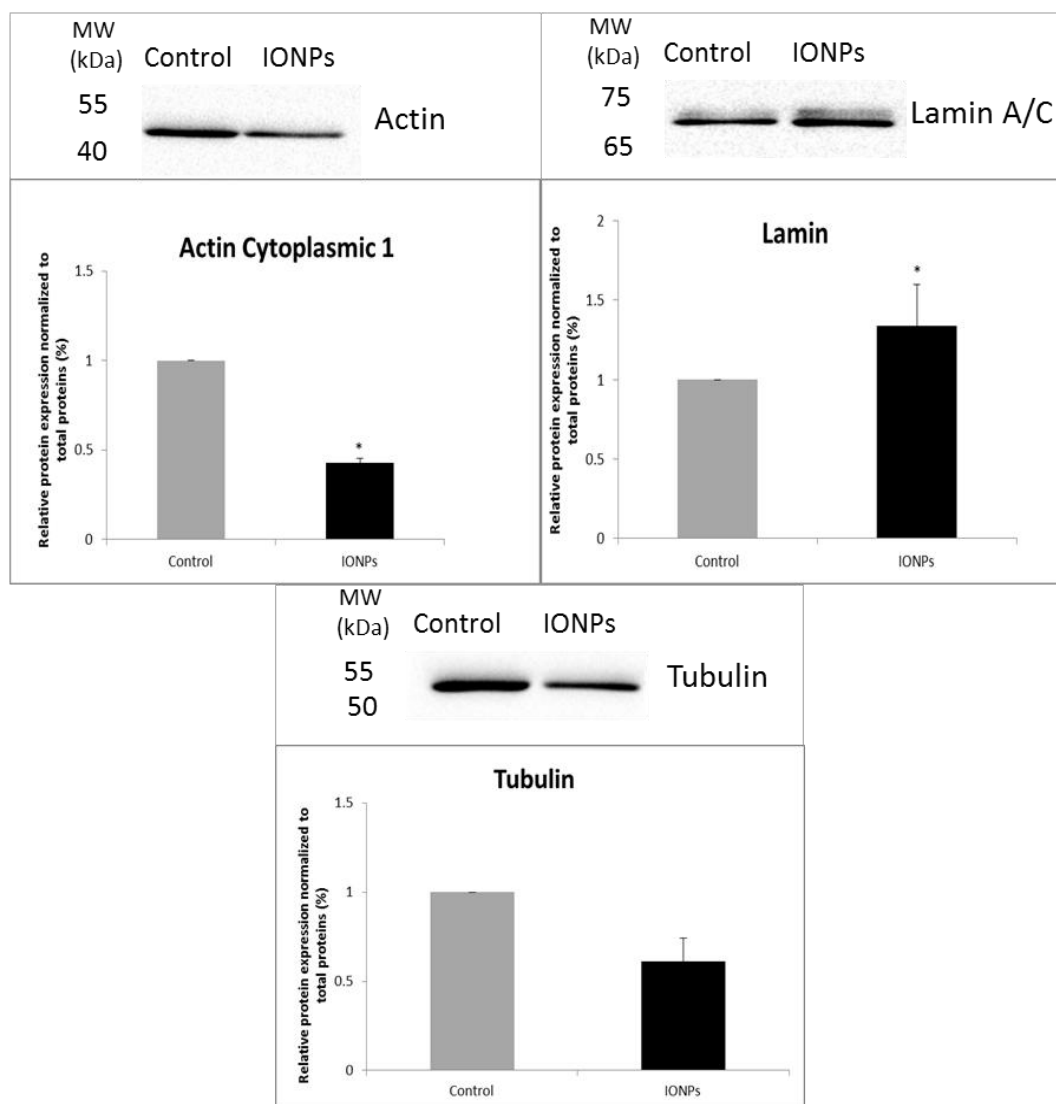


Figure 13. Representative Western blot results of Actin, Lamin and Tubulin bands from Western Blot validation. Relative quantification was performed on the results of three independent experiments using ImageLab software 6.0 (Biorad) after normalization to total proteins. * $p < 0.05$ compared to control using t-student test.

IONPs characterization: Table of size PDI and z potential

Table1: IONPs characterization using Transmission Electron Microscopy and Dynamic Light Scattering. F for fraction, TEM for Transmission Electron Microscopy, DLS for Dynamic Light Scattering, CFS for Calf Fetal Serum, PDI for Polydispersity Index. P for Potential.

			F1	F2	F3
TEM	Powder	Size (nm)	14	22	30
		Size (nm)	329,9	188,6	174,2
	MilliQ water	PdI	0,29	0,459	0,302
		Zeta P (mV)	-7,79	-8,42	-10,6
		Size (nm)	928,5	1129	1433
	Medium without CFS	PdI	0,362	0,216	0,254
		Zeta P(mV)	-10	-11	-9,55
		Size (nm)	381,8	436,3	562,1
	Medium with CFS	PdI	0,235	0,279	0,428
		Zeta P(mV)	-10	-9,97	-9,31

Table 2: Downregulated (red) and Upregulated (green) proteins after FeCl₃ exposure compared to control cells. Statistically significant iTRAQ ratios (*p* value ratio and *p* value sample ≤ 0.05) for the 68 proteins that are down or upregulated.

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P68363	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	1	31	4.43	0.395	0.001	0.001	-0.404
Q71U36	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	1	17	4.43	0.456	0.001	0.001	-0.341
P63261	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	1	6	2.67	0.461	0.001	0.002	-0.337
P31151	S10A7_HUMAN	Protein S100-A7	S100A7	1	1	10.89	0.468	0.019	0.002	-0.329
Q9UK08	GBG8_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-8	GNG8	1	3	24.29	0.505	0.016	0.003	-0.296
Q99460	PSMD1_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	PSMD1	1	3	1.26	0.507	0.036	0.004	-0.295
P60709	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	1	11	2.67	0.540	0.000	0.003	-0.268
P35527	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	15	87	1.28	0.589	0.008	0.007	-0.230
P02765	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	2	3	1.63	0.602	0.005	0.005	-0.220
Q13838	DX39B_HUMAN	Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	3	21	3.5	0.636	0.019	0.015	-0.197
O00154	BACH_HUMAN	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	ACOT7	3	12	4.21	0.649	0.014	0.011	-0.188
P09104	ENOG_HUMAN	Gamma-enolase	ENO2	1	4	4.15	0.660	0.048	0.013	-0.181
P27695	APEX1_HUMAN	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	1	21	5.35	0.663	0.017	0.012	-0.178
Q99622	C10_HUMAN	Protein C10	C12orf57	2	6	11.9	0.666	0.042	0.013	-0.176
P69892	HBG2_HUMAN	Hemoglobin subunit gamma-2	HBG2	1	7	6.8	0.667	0.000	0.013	-0.176
P04264	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	27	320	1.55	0.684	0.014	0.015	-0.165
P54819	KAD2_HUMAN	Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2	1	6	6.69	0.691	0.026	0.019	-0.161

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P62888	RL30_HUMAN	60S ribosomal protein L30	RPL30	3	11	5.22	0.704	0.032	0.020	-0.153
P13645	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	22	171	3.08	0.713	0.037	0.023	-0.147
P19404	NDUV2_HUMAN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	1	4	5.22	0.716	0.038	0.027	-0.145
Q15126	PMVK_HUMAN	Phosphomevalonate kinase	PMVK	1	3	4.17	0.717	0.037	0.028	-0.144
P35908	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	15	73	1.41	0.724	0.047	0.028	-0.140
P68402	PA1B2_HUMAN	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	PAFAH1B2	1	22	3.93	0.737	0.029	0.039	-0.133
Q8NBS9	TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5	TXNDC5	1	12	2.08	0.748	0.012	0.037	-0.126
P54578	UBP14_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	USP14	2	7	2.63	0.751	0.009	0.048	-0.125
P23284	PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	5	38	5.09	0.752	0.022	0.032	-0.124
Q08945	SSRP1_HUMAN	FACT complex subunit SSRP1	SSRP1	4	20	1.55	0.760	0.047	0.036	-0.119

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P62258	1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	7	40	3.92	1.269	0.015	0.045	0.103
P26583	HMGB2_HUMAN	High mobility group protein B2	HMGB2	4	22	3.83	1.320	0.023	0.041	0.121
Q969Q0	RL36L_HUMAN	60S ribosomal protein L36a-like	RPL36AL	2	4	8.49	1.322	0.046	0.042	0.121
P61981	1433G_HUMAN	14-3-3 protein gamma	YWHAG	6	37	4.05	1.324	0.012	0.041	0.122
P46777	RL5_HUMAN	60S ribosomal protein L5	RPL5	8	26	2.69	1.327	0.020	0.028	0.123
Q99613	EIF3C_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C	1	3	0.77	1.332	0.045	0.035	0.124
P40925	MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	2	10	3.59	1.335	0.025	0.038	0.126
P16401	H15_HUMAN	Histone H1.5	HIST1H1B	9	108	3.54	1.338	0.032	0.034	0.126
P84098	RL19_HUMAN	60S ribosomal protein L19	RPL19	5	9	3.06	1.338	0.007	0.022	0.126
P18669	PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	6	34	5.51	1.344	0.013	0.030	0.128
P52565	GDIR1_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDIA	8	70	7.35	1.351	0.021	0.027	0.131
P67809	YBOX1_HUMAN	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	10	74	6.17	1.390	0.041	0.027	0.143
Q71DI3	H32_HUMAN	Histone H3.2	HIST2H3A;	6	157	5.15	1.393	0.019	0.021	0.144
P60866	RS20_HUMAN	40S ribosomal protein S20	RPS20	2	12	12.61	1.402	0.021	0.026	0.147
P46821	MAP1B_HUMAN	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	5	10	1.26	1.416	0.040	0.014	0.151

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q9NQC3	RTN4_HUMAN	Reticulon-4	RTN4	1	6	1.09	1.420	0.000	0.020	0.152
O95433	AHSA1_HUMAN	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	AHSA1	2	4	2.37	1.425	0.047	0.020	0.154
P47914	RL29_HUMAN	60S ribosomal protein L29	RPL29	3	23	3.77	1.429	0.023	0.017	0.155
P05204	HMG2_HUMAN	Non-histone chromosomal protein HMG-17	HMG2	3	30	18.89	1.433	0.043	0.038	0.156
P46779	RL28_HUMAN	60S ribosomal protein L28	RPL28	5	20	5.84	1.438	0.003	0.011	0.158
P09382	LEG1_HUMAN	Galectin-1	LGALS1	3	42	7.41	1.450	0.031	0.013	0.162
P02545	LMNA_HUMAN	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C	LMNA	11	41	1.66	1.473	0.005	0.012	0.168
O14979	HNRDL_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRNPDL	2	8	1.9	1.486	0.025	0.016	0.172
P39748	FEN1_HUMAN	Flap endonuclease 1	FEN1	1	8	4.21	1.506	0.006	0.014	0.178
P62266	RS23_HUMAN	40S ribosomal protein S23	RPS23	6	45	5.59	1.532	0.000	0.015	0.185
P29966	MARCS_HUMAN	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	7	56	9.64	1.541	0.041	0.009	0.188
P49006	MRP_HUMAN	MARCKS-related protein	MARCKSL1	4	22	6.67	1.597	0.023	0.014	0.203
Q01082	SPTB2_HUMAN	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1	2	4	0.34	1.608	0.015	0.012	0.206
P53999	TCP4_HUMAN	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	SUB1	2	4	8.66	1.618	0.034	0.016	0.209
P62913	RL11_HUMAN	60S ribosomal protein L11	RPL11	3	13	6.74	1.708	0.001	0.009	0.233

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q969H8	MYDGF_HUMAN	Myeloid-derived growth factor	MYDGF	1	2	6.36	1.763	0.036	0.007	0.246
P27348	1433T_HUMAN	14-3-3 protein theta	YWHAQ	2	16	5.71	1.775	0.045	0.008	0.249
Q9Y383	LC7L2_HUMAN	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	1	2	3.83	1.808	0.044	0.007	0.257
P31946	1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	2	5	5.69	1.853	0.047	0.012	0.268
Q8NC51	PAIRB_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1	8	25	1.96	1.877	0.029	0.012	0.273
P62917	RL8_HUMAN	60S ribosomal protein L8	RPL8	4	9	3.11	1.883	0.000	0.004	0.275
P62263	RS14_HUMAN	40S ribosomal protein S14	RPS14	2	4	8.61	1.895	0.022	0.005	0.278
Q9UIG0	BAZ1B_HUMAN	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	BAZ1B	1	2	0.47	1.931	0.020	0.003	0.286
P09493	TPM1_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	1	1	3.17	2.135	0.020	0.002	0.330
Q9UII2	ATIF1_HUMAN	ATPase inhibitor, mitochondrial	ATPIF1	1	2	9.43	2.238	0.044	0.002	0.350
P14314	GLU2B_HUMAN	Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH	1	2	1.33	2.268	0.002	0.002	0.356

Table 3: Downregulated (red) and Upregulated (green) proteins after IONP exposure compared to control cells. Statistically significant iTRAQ ratios (p value ratio and p value sample ≤ 0.05) for the 20 proteins that are down or upregulated.

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P68363	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	1	31	4.43	0.34	1.61E-07	0.000612	-0.4685
Q71U36	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	1	17	4.43	0.4155	4.42E-05	0.001421	-0.3815
P63261	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	1	6	2.67	0.5156	0.010313	0.005384	-0.2877
O75531	BAF_HUMAN	Barrier-to-autointegration factor	BANF1	1	2	13.48	0.5318	0.049995	0.005323	-0.2743
Q9NZ01	TECR_HUMAN	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR	1	8	2.6	0.5662	0.020878	0.006121	-0.247
P60709	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	1	11	2.67	0.5897	0.00033	0.006048	-0.2293
P02765	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	2	3	1.63	0.5924	0.008082	0.009249	-0.2274
P35527	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	15	87	1.28	0.5984	0.003368	0.007559	-0.223
O00154	BACH_HUMAN	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	ACOT7	3	12	4.21	0.7166	0.035425	0.0248	-0.1447
P13645	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	22	171	3.08	0.7189	0.009705	0.036644	-0.1433
P04264	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	27	320	1.55	0.7329	0.013944	0.030954	-0.1349
O95076	ALX3_HUMAN	Homeobox protein aristaless-like 3	ALX3	1	3	2.33	0.7529	0.048431	0.033766	-0.1233
P69892	HBG2_HUMAN	Hemoglobin subunit gamma-2	HBG2	1	7	6.8	0.7573	0.006934	0.038177	-0.1207
P62888	RL30_HUMAN	60S ribosomal protein L30	RPL30	3	11	5.22	0.7578	0.028507	0.030631	-0.1204

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
O43809	CPSF5_HUMAN	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	3	4	3.08	1.3394	0.034449	0.03188	0.1269
P02545	LMNA_HUMAN	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C	LMNA	11	41	1.66	1.3673	0.045432	0.030192	0.1359
P46821	MAP1B_HUMAN	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	5	10	1.26	1.4017	0.023844	0.025183	0.1467
Q96QV6	H2A1A_HUMAN	Histone H2A type 1-A	HIST1H2AA	1	29	6.87	1.4716	0.033445	0.016374	0.1678
P62263	RS14_HUMAN	40S ribosomal protein S14	RPS14	2	4	8.61	1.5648	0.045908	0.009035	0.1945
P09493	TPM1_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	1	1	3.17	2.0266	0.03125	0.002646	0.3068

Table 4: Upstream neighbors of common DEP for FeCl₃ and IONPs treatment (Analysed and generated from pathway studio)

Name	Total # of Neighbors	# of Measured Neighbors	Gene Set Seed	Measured Neighbors	p-value
Upstream Neighbors of cell division	1768	5	Cell division	TPM1;AHSG;ACTB;ACTG1;TUBA1B	0.032856
Upstream Neighbors of microtubule cytoskeleton assembly	634	5	Microtubule Cytoskeleton assembly	TPM1;MAP1B;ACTB;TUBA1A;TUBA1B	0.037156

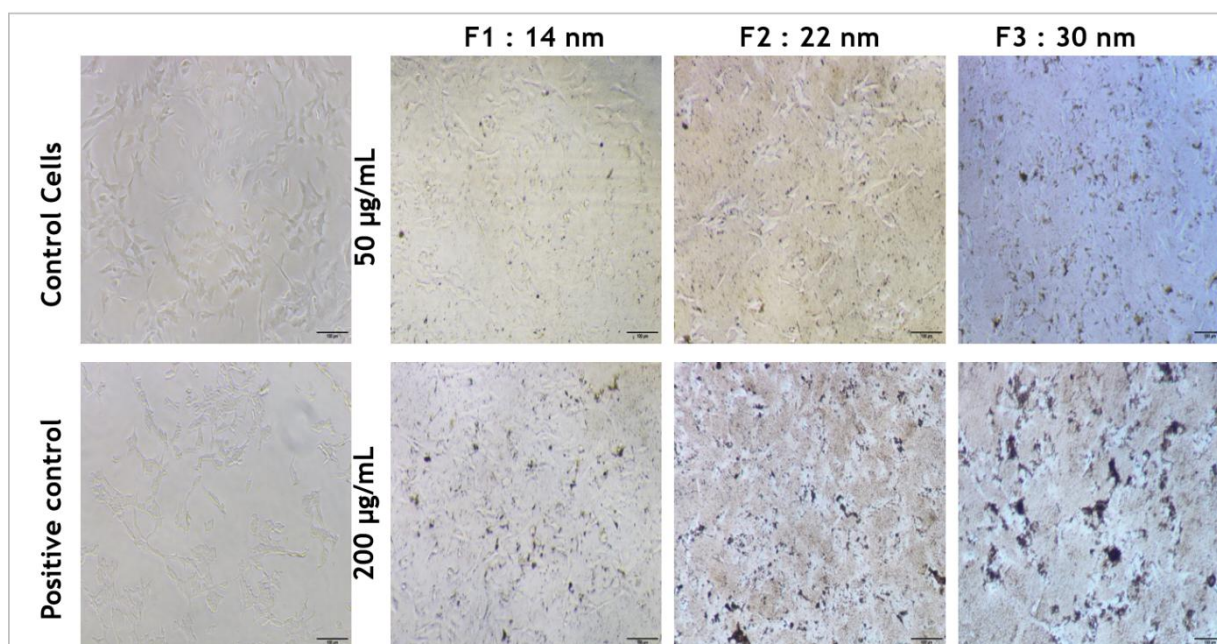


Figure S1: SHSY-5Y cells in contact with IONPs (F1, F2 and F3) at the dose of 50 and 200 µg/mL. Cells were incubated for 24h prior to be treated with IONPs. Control cells are those without any contact with IONPs. Positive Control represents the cells that were incubated with H₂O₂ for 24h. The pictures were taken 24h after treatment using the Nikon Eclipse TS100 inverted microscope.

Supplementary Material and Methods

S1: Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles

IONPs used in this paper were gently provided by the Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials applied to the Environment at the Faculty of Sciences of Gabès under the direction of Professor Lassaad El Mir. Suspensions of Fe₂O₃ NPs were prepared by a modified sol-gel method (Lemine et al. 2014) under supercritical conditions of ethyl alcohol (EtOH), in which the hydrolysis proceeds slowly to release water mixture by an esterification reaction in order to control the size of the nanoparticles formed. Indeed, 6 g of iron (III) acetylacetonate [C₁₅H₁₂FeO₆] used as a precursor of the synthesis is dissolved in 36 ml of methanol. After magnetic agitation, the solution was placed in an autoclave and dried under supercritical conditions of EtOH. These conditions were T_c = 243 ° C and P_c = 63.3 bar. Heating of the autoclave was provided by a furnace controlled by a temperature controller. The particle size can be adjusted by adjustment of magnetic stirring time. Three agitation

times of 15 min, 24 h and 48 h were used to produce nanoparticles with average diameters of 14, 22 and 30 nm, respectively.

S2: Protein extraction, digestion and iTRAQ labelling

Twenty four hours after treatment, cells were washed and trypsinized using trypsin-EDTA 0.05% (Gibco™). For sample preparation, we used a modified FASP (Filter Aided Sample Preparation) method (Wisniewski et al. 2009) adapted for iTRAQ (Campone et al. 2015). The cell pellets were lysed in a proportion of 1 million cells in 100 µL of lysis buffer (4% SDS, 0.1M DTT in 0.1M Tris-HCl, pH7.6). The cells were vortexed and incubated for 5 minutes at 95 °C before being lysed for 20 seconds with 1 sec OFF 1 sec ON at 20% amplitude using Sonics Vibracell® sonicator probe. Then, the lysate was centrifuged at 14,000 g for 10 minutes at 4° to get rid of the cell debris. Finally, the supernatant was recovered in a new tube and the amount of proteins was measured using BCA assay (Pierce). Afterwards, 1 mg of protein from each condition was deposited in a filtration centricon Microcon YM-30 (Millipore). Washing steps were performed with 8M urea, 0.1M Tris-HCl, pH8.5 buffer. The cysteine residues were blocked with 12 mM MMTS (methyl methanethiosulfonate; ThermoFisher Scientific) for 30 minutes at room temperature. Next, the proteins were digested in 0.5M TEAB, pH 8.5 by adding the trypsin/LysC Mix (Promega, USA) at an enzyme / protein ratio of 1:50 overnight at 37 ° C. At the end of the digestion, the peptides were desalted by a C18 spin column method (ThermoFisher Scientific) and then assayed by the BCA peptides method. The desalting was done according to manufacturer's instructions. Peptides were then dried and labeled using iTRAQ labels for 2 hours at room temperature. Biological replicates of control SH-SY5Y cells were labeled with iTRAQ m/z 113 and 114 ion reporter tags, those of FeCl₃ treated cells were labeled with iTRAQ m/z 115 and 116 ion reporter tags and those F3 treated cells were labeled with iTRAQ m/z 119 and 121 ion reporter tags. All reagents were from the iTRAQ Reagents 8 plex application kit (AB Sciex, Framingham, USA).

Peptide separation by OFFGEL Isoelectrofocusing followed by Reverse Phase Nano-liquid Chromatography

Peptide fractionation according to their pI was performed on the OFFGEL 3100 Fractionator using the OFFGEL Linear pH 3-10 (Agilent Technologies) with a 24-well configuration according to the user protocol. Briefly, 53 µg of each of the iTRAQ labeled peptides were pooled and then dried in a vacuum concentrator and suspended in 3.6 ml of focused OFFGEL

buffer. The IPG gel band was rehydrated and 150 μ L of sample was loaded into each well. The peptides were concentrated until 50 kVh were accumulated with a maximum voltage of 8000 V, 50 μ A and 200 W. After fractionation, the 24 OFFGEL fractions were desalinated using C18 ZipTips (Milipore Corp, MA, USA). The resulting fractions were collected, dried using a vacuum concentrator and maintained at -20 ° C prior to nano-LC-MS / MS analysis.

Peptides were separated using a Ultimate 3000 C18 reverse phase chromatography (nanoRP-LC) system controlled by Chromeleon v 7 (Dionex / LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) and coupled to a Probot MALDI localization device controlled by the μ Carrier 2.0 software (Dionex / LC Packings, Amsterdam, the Netherlands).

Before the nano-LC-MS / MS, the dried fractions were resuspended in 10 μ L of buffer A (98% water, 2% ACN and 0.05% TFA). Peptides were concentrated on a trapping column (C18, 3 μ m, 100Å pore size, ThermoFisher Scientific) in 2% ACN and 0.05% TFA for 5 min prior to separation by reverse phase chromatography (Acclaim PepMap TM RSLC 75 μ m, 15 cm, nanoViper C18, 2 μ m, 100Å pore size, ThermoFisher Scientific) with a binary buffer A (2% ACN and 0.05% TFA) and buffer B (80% ACN and 0.04% TFA). Flow rates of 20 μ L / min et 0,3 μ L / min were applied in the trapping column and the nano-column, respectively, the entire separation was for 60 minutes, the fractions from the eluted solution were collected at a frequency of a spot per 15 seconds on an Opti-TOF LC / MALDI Insert 123 x 81 mm (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), resulting in 200 spots per fraction. The α -cyno-4-hydroxy-cinnamic acid matrix (CHCA, Sigma- Aldrich St-Louis, MO, USA) with a concentration of 2 mg / mL in 70% ACN and 0.1% TFA was added to the eluted column solution at a flow rate of 0.9 μ l / min, and thus integrated in each spot of the MALDI sample plate.

MALDI-TOF/TOF analysis

MS and MS / MS analysis of peptide samples spotted by nanoLC-off-line was performed using the MALDI-TOF/TOF 4800 mass spectrometer (AB Sciex, Les Ulis, France) controlled by the Explorer Series software v 4000. The analysis was performed in positive reflector mode. MS spectra of m / z 700-3500 were acquired for each spot using the laser. The strongest ions in each MS spectrum above a S / N (Signal / Noise) threshold of 10 has been selected for MS/MS analysis. The selected ions were fragmented using the CID (Collision Induced Dissociation) activation mode to obtain the corresponding MS/MS spectrum that is necessary to determine the sequence of these peptides and to quantify them.

Analysis of iTRAQ data

The MS and MS/MS spectra were used for identification and relative quantification using the ProteinPilot™ v 4.0 software with the Paragon™ Algorithm (AB Sciex, Les Ulis, France). The analysis was performed with the UniProtKB / Swiss-Prot Human database (European Institute of Bioinformatics, Hinxton, UK). In our study, the search was set to "Thorough ID" and a false discovery rate (FDR) analysis of 1% was applied. Proteins quantified with at least one peptide at the 95% peptide confidence level were included in the final set of quantified proteins. In order to perform statistical analysis for the quantified proteins we used the R package isobar (version 1.14.0). The analysis was performed using a normal fit and proteins which ratio had a p-value ratio and a p-value sample < 0.05 are considered significantly differentially expressed. The iTRAQ data are presented as protein ratio in the different conditions relatively to the control non-treated cells. The ratios for FeCl₃/Control are 115/113 and 116/114 and the ratios F3/Control 119/113 and 121/114.

Gene ontology and network analysis

Gene ontology analysis was performed with the list of 20 and 68 dysregulated proteins respectively after IONP and FeCl₃ treatments using PANTHER (Protein ANalysisTHrough Evolutionary Relationships) Classification System Version 13.1 (released 2018-02-03) (Mi, Muruganujan, and Thomas 2013). The functional classification of DEP regarding biological processes and protein classes are graphically illustrated in pie chart. Venn diagram for common and specific DEP between different treatments was created using Venn Diagram Plotter (<https://omics.pnl.gov/software/venn-diagram-plotter>).

Sub-network analysis was performed with Pathway Studio Mammalian Web 10.3 (Ariadne Genomics® software, Elsevier® Inc, Rockville, MD, USA) with the list of 15 dysregulated proteins common to FeCl₃ and IONP response and the 5 dysregulated proteins specifically in response to IONP. As we analysed protein expression data, we selected the option generate sub-network with centre downstream of neighbors to identify the processes that are regulating by these proteins and that are modulated by protein expression level. A sub-network consists of a regulator and its targets. All different types of connections listed (chemical reaction, direct regulation, expression, miRNA effect, molecule synthesis, molecule transport, promoter binding, protein modification and regulation) were studied. Sub-networks are generated by connecting entities to the neighbors in the ResNet Explore database.

B. Etudes *in vivo*

1. Introduction

Dans cette partie nous nous sommes proposé d'étudier l'effet des NPs de fer sur un modèle animal qui est le rat Wistar. L'avantage d'un modèle *in vivo* est d'intégrer la totalité des effets potentiels d'un perturbateur donné dans un contexte physiologique. Ainsi, ce genre d'étude permet d'étudier les paramètres phénotypiques suite à l'exposition aux NPs de fer par différentes voies. Les voies d'administration varient selon le but de l'étude et la façon de disponibilité des NPs dans la nature ou dans les produits d'usage. Prenons l'exemple de l'utilisation des NPs de fer comme agent de contraste en IRM, ceci suggère l'évaluation de la toxicité par administration de ces NPs par voie intraveineuse. Ces NPs de fer peuvent être aussi trouvées dans la nature ou produites par les chemins de fer principalement souterrains, ceci suggère l'évaluation de ces NPs par voie intranasale. Une autre voie potentielle c'est la voie orale vu que ces NPs sont utilisées en tant qu'additif alimentaire connu sous le terme « E172 », nous avons étudié ces trois voies d'administration des NPs de fer. Les résultats de chaque étude seront détaillés par la suite séparément.

2. Effets de l'administration intranasale des NPs de fer

Les effets des NPs ont fait l'objet de plusieurs études *in vivo*. Ces études ont exploré les effets des NPs sur le poids moyen des rats durant ou après l'exposition aux NPs, les paramètres biochimiques sériques et hématologiques, et la physiologie des rats en général. L'effet sur le système nerveux a été investigué récemment après administration de quelques types de NPs. D'ailleurs, des données sur l'effet des NPs sur le système nerveux entre autres le taux des neurotransmetteurs et le taux des éléments traces au niveau du cerveau ainsi que la cognition ont attiré l'attention des scientifiques et de la société civile. Ainsi nous avons pris en considération tous ces paramètres pour établir une étude globale suite à une exposition subaiguë aux NPs de fer à une dose journalière répétée pendant 7 jours de 10 mg/kg.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans le journal « Environmental Science and Pollution Research ».

a) *Résumé des principaux résultats*

Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'exposition subaiguë aux NPs de fer chez le rat Wistar, en particulier : (i) sur le comportement émotionnel et apprentissage / mémoire, (ii) sur les paramètres hématologiques et biochimiques, (iii) sur certains neurotransmetteurs et (iv) sur l'homéostasie des éléments traces. Les rats ont été traités pendant 7 jours consécutifs par des instillations intranasales à une dose de 10 mg / kg de poids corporel. Les résultats du suivi de l'évolution du poids des rats traités par rapport aux rats contrôles ont montré que le poids corporel moyen a augmenté significativement chez les rats exposés aux NPs de fer. De plus, plusieurs paramètres hématologiques étaient normaux chez les rats traités, à l'exception de la numération plaquettaire qui était augmentée. La thrombocytose, la diminution de taux de fer sérique et les modifications histologiques du foie prouvent l'effet inflammatoire induit par les NPs de fer chez les rats traités. L'étude biochimique a révélé que le niveau de phosphatase alcaline diminuait chez les rats exposés aux NPs de fer, mais aucun changement n'a été observé pour les autres enzymes hépatiques ALT et AST. L'homéostasie des éléments traces (Cu, Fe, Mn et Zn) a été légèrement modulée par l'exposition aux NPs de fer. Le dosage des neurotransmetteurs au niveau du cerveau a démontré que l'exposition intranasale subaiguë aux NPs de fer augmente significativement les taux de dopamine et de norépinéphrine dans le cerveau des rats. Cette perturbation de neurotransmetteurs n'a pas affecté le comportement émotionnel, l'indice d'anxiété et les capacités d'apprentissage / mémoire des rats

b) *Conclusion*

L'administration intranasale subaiguë des NPs de fer provoque quelques signes de toxicité en modulant légèrement la formule sanguine, les taux des enzymes hépatiques, la teneur en neurotransmetteurs dans le cerveau ainsi que la distribution des éléments traces dans les tissus (foie, poumon et cerveau). L'étude neurocomportementale a montré que l'exposition à court terme aux NPs de fer n'affecte pas le statut émotionnel et la mémoire de référence spatiale chez les rats Wistar adultes. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour confirmer l'absence d'effets secondaires en utilisant d'autres tests comportementaux et pour identifier les biomarqueurs potentiels liés à l'exposition aux NPs afin de détecter les effets potentiellement nocifs pour la santé humaine.

c) Article II

Intranasal instillation of iron oxide nanoparticles induces inflammation and perturbation of trace elements and neurotransmitters, but not behavioral impairment in rats

Dalel Askri^{1,2)*}, Souhir Ouni²⁾, Said Galai³⁾, Josiane Arnaud⁴⁾, Benoit Chovelon⁴⁾,
Sylvia G. Lehmann⁵⁾, Nathalie Sturm⁶⁾, Mohsen Sakly²⁾, Michel Sève¹⁾ and Salem Amara²⁾

1) University of Grenoble Alpes, PROMETHEE Proteomic Platform, CHU Grenoble Alpes, LBFA Inserm U1055 and BEeSy, Grenoble, France

2) University of Carthage, Fac. Sciences of Bizerte, Unit of Integrated Physiology, Bizerte, Tunisia

3) University of Tunis El Manar, Laboratory of Clinical Biology, National Institute of Neurology, Tunis, Tunisia

4) Unit of Hormonal and Nutritional Biochemistry, Department of Biology, Toxicology, Pharmacology, CHU Grenoble Alpes, Inserm, U1055, Grenoble, France

5) Univ. Grenoble Alpes, ISTerre, Grenoble, France

6) Department of Pathological Anatomy and Cytology, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

* Corresponding Author: Dalel Askri, Promethe Proteomic Platform, IBP, Grenoble-France.
Email: askridalel@gmail.com. Tel: 0033(0)669259993

Abstract

Over the last decades, engineered nanomaterials have been widely used in various applications due to their interesting properties. Among them, Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) are used as theranostic agents for cancer, and also as contrast agents in Magnetic Resonance Imaging. With the increasing production and use of these IONPs, there is an evident raise of IONPs exposure and subsequently a higher risk of adverse outcome for Humans and the environment. In this work, we aimed to investigate the effects of sub-acute IONPs exposure on Wistar rat, particularly: (i) on the emotional and learning/memory behavior, (ii) on the hematological and biochemical parameters, (iii) on the neurotransmitter content and (vi) on the trace element homeostasis. Rats were treated during 7 consecutive days by intranasal instillations at a dose of 10 mg/kg body weight. The mean body weight increased significantly in IONPs exposed rats. Moreover, several hematological parameters were normal in treated rats except the platelet count which was increased. The biochemical study revealed that Phosphatase Alkaline level decreased in IONPs exposed rats but no changes were observed for the other hepatic enzymes (ALT and AST) levels. The trace element homeostasis was slightly modulated by IONPs exposure. Sub-acute intranasal exposure to IONPs increased dopamine and norepinephrine levels in rat brain; however, it did not affect the emotional behavior, the anxiety index and the learning/ memory capacities of rats.

Key words: Iron Oxide Nanoparticles; Rat; Inflammation; Behavior; Trace elements; Neurotransmitters

1. Introduction

Nanotechnologies are based on the ability to study structures on an atomic and nanometric scales in the range of 1-100 nanometers (nm). Nanoparticles (NPs) create materials, tools and systems with novel properties and functions compare to larger size similar components (Bleeker et al. 2013). The innovative properties of NPs are mainly due to the increase of the surface to volume ratio and the predominance of the effects of quantum mechanics (Pitkethly 2008). Some NPs can cross the different protective barriers of living organisms. They can penetrate into the brain via transport along the nerves or through the blood brain barrier (Simko & Mattsson 2014). These NPs can be modified at their surface (coating), which modifies their physicochemical properties and opens their use in many applications (Cortajarena et al. 2014; Yarjanli et al. 2017). The increasing production of NPs and their parallel increasing use in the industry, as well as their presence in foods and cosmetics, make them a research topic that is always growing and interesting to better evaluate the risks and improve the safety of these NPs. Among them, Iron oxide Nanoparticles (IONPs) are widely used in several fields such as biology, medicine and the environment (Grover et al. 2012). In vivo, applications of IONPs could be classified as therapeutic, delivery and diagnostic (Magnetic Resonance Imaging (MRI)) agents; whereas for in vitro applications, the main use is in diagnosis (separation/selection and magnetic relaxometry) (Wáng & Idée 2017). Indeed, in drug delivery, the blood-brain barrier presents a real obstacle for the drug arrival to the brain, precisely in the treatment of neurodegenerative diseases, notably Alzheimer disease and Parkinson Disease (PD) as well as brain cancers. Thus, the encapsulation of these drugs in the NPs or their coupling to NPs could overcome this obstacle (Van Rooy et al. 2011). In 2013, Kim et al., reported that among several engineered coated IONPs, dimercaptosuccinic acid coated Fe₂O₃ (DMSA-Fe₂O₃) NPs were potent pro-apoptotic agents in the rat sciatic nerve, and have also differential ability to regulate oxidative stress, inflammation and apoptotic signaling in several other cells notably in neuroglia, macrophages, lymphocytes and endothelial cells (Kim et al. 2013). Recently, Sun et al., showed, using a model of derived cell line from the mouse brain, that the application of a magnetic field, stimulating convection and diffusion of IONPs, increases the permeability of these NPs through the blood-brain barrier (Sun et al. 2014). This change is in favor of a possible use of IONPs in the delivery of drugs in the central nervous system. Furthermore, Huang & Hainfeld reported that the intravenous delivery of biocompatible magnetic IONPs is able to load specifically the tumor with iron in mice with subcutaneous squamous cell carcinoma. With well determined thermal induction

and a tumor to non-tumor ratio higher than 16, precise tumor ablation becomes possible. Thus, this finding can be used clinically in combination with chemotherapy or radiotherapy to enhance their efficacy (Huang & Hainfeld 2013). Rather than their anti-tumor applications, IONPs based drugs such as ferumoxide and ferucarbotran are used in MRI as contrast agents, due to their biocompatibility, biodegradability and strong contrast enhancement (Elias & Tsourkas 2009; Cortajarena et al. 2014). Ferumoxytol (Feraheme®) is also used for the treatment of iron deficiency anemia in adults with chronic kidney disease. This treatment was approved in 2009 by the Food and Drug Administration (FDA) and in 2012 by the European Medicines Agency (EMA) as a treatment to be administered intravenously (Lu et al. 2010). However, in March 2015, the FDA warned that this treatment presents risks of anaphylactic shock and is contraindicated to persons who have an allergy to any intravenous iron substitute (Announcement 2015). Thus, IONPs biological properties should be known and studied in order to better understand the mode of action of these IONPs in the body (Kim et al. 2016). The toxicological properties relate both to the characteristics of the nanoparticulate size and to the chemical composition of the particle. These toxicological effects linked to nanoparticles are referred to as nanotoxicology and have been measured, particularly, in animals (Ai et al. 2011; Kim et al. 2013). Nevertheless, the mechanisms of toxicity of IONPs are not well solved and other studies are necessary to better clarify them. In this paper, we investigated the sub-acute intranasal toxicity of IONPs. Thereby, the effects of nanoparticles on emotional as well as learning and memory behavior, hematological and biochemical parameters were analyzed and organ histopathological damage was examined by histopathology. Besides, the distributions of trace element such as Iron, Manganese, Zinc and Copper in liver, lung and brain and the content in neurotransmitters in brain were investigated.

2. Material and Methods

2.1. Synthesis of Iron Nanoparticles

IONPs used in this paper were gently provided by the Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials applied to the Environment at the Faculty of Sciences of Gabes under the direction of Professor Lassaad El Mir. Samples of Fe₂O₃ NPs were prepared by a modified sol-gel method under supercritical conditions of ethyl alcohol (EtOH). Briefly, 6 g of iron (III) acetylacetonate [C₁₅H₁₂FeO₆] used as a precursor of the synthesis was dissolved in a 36 mL of methanol. After magnetic agitation, the solution was placed in an autoclave and dried under supercritical conditions of EtOH (T_c = 243 ° C, P_c = 6.33 x 10⁶ Pa). The particle size

was adjusted by magnetic stirring time of 48 hours, producing nanoparticles with an average diameter of 30 nm (Lemine et al. 2014).

2.2. Characterization of Iron Nanoparticles

IONPs were characterized by X-ray diffraction (XRD), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS).

The XRD determines the size and crystallized structure of these NPs. This technique was performed using the PANalytical XpertPro diffractometer. The size and shape of IONPs were determined by a JEOL transmission electron microscope (JEM-2100F) operating at 200 keV using Digital Micrograph and EDAX Genesis as software. In solution, the size of particles and their agglomerates were estimated by DLS, using Malvern Zetasizer Nano ZS and DTS Nano Software.

2.3. Solution preparation and Animal treatment

The IONPs were suspended in a physiological solution of 0.9% sodium chloride. The solution was sonicated for 60 min a hand-held sonicator (Sonics®) to minimize aggregate formation. Then, it was well vortexed for 1 min before each instillation. Wistar male rats (SIPHAT, Tunisia) weighing 130-200 g were randomly divided into 2 groups (n = 6): one control and one treated. The treated rats received 10 mg / kg of IONPs by intranasal instillation for 7 consecutive days. Control rats were instilled with 0.9% sodium chloride solution. The animals were housed under suitable conditions of temperature (25 °C) and light (12:12 hours light / dark cycle). All rats received water and food ad libitum. The experimental protocols were approved by the Medical Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of Pasteur Institute of Tunis (approval number: LNFP/Pro 152012).

The animals were anesthetised before being sacrificed 7 days after the last injection and the different organs were extracted to be analyzed and a relative organ / body weight ratio (mg/g) for each was calculated.

2.4. Behavioral tests

Two behavioral tests were performed, 24 hours after the last instillation, to evaluate the effect of IONPs on emotional state, learning and memory in rats:

2.4.1. Elevated Plus Maze

The Elevated Plus Maze test was used as before (Pellow et al. 1985; Maaroufi et al. 2009). The duration of the test was 5 min and we started by placing a rat in the center of the labyrinth, facing an open arm. The rat explored the device freely. Thus, the number of entries and the time spent in the different parts of the labyrinth (the open arms, the closed arms and the central part) were recorded using a video camera placed above the device.

The total activity in the labyrinth was evaluated by the total number of entries in the arms and the central part. A Percentage Reflecting Anxiety Status, also known as anxiety index, was calculated by the formula (time spent in closed arms * 100 / time spent in open and closed arms) (Pellow et al. 1985). The device was cleaned with 10% alcohol between each rat.

2.4.2. Morris Water Maze

The Morris Water Maze test was performed to evaluate spatial reference memory in rats (Morris 1984). Briefly, the labyrinth was placed in a room with various additional visual cues such as geometric figures in different colors fixed on the outside part of the pool, which allow the animal to find its way into the space. The path taken by the animal in the pool is recorded using a video camera placed above it. The experimenter goes behind a curtain near the maze in the experiment room to control the recording of the video. The experiment was carried out for 4 consecutive days, each rat underwent a daily session of four tests (maximum 60s / test) with a 10 min delay between the tests during which the rat was dried and placed back in its cage. On the first day, the platform remained slightly visible above the surface of the water and then the next 3 days is immersed 1 cm below the surface. Each day, four starting points were possible (Northeast, South-East, North-West or South-West). Their sequence varied from one test to another and from one day to the next. At the beginning of each test, a rat was gently released into the pool facing the wall in one of the four starting positions (North, South, East, West). Once in the water, the rat swam to reach the platform and climbed above it for 10s before returning to its cage (Deguil et al. 2010). If the animal did not find the platform for 60s, it was guided to it by the experimenter and left there for 20 seconds. Then, the rat was lifted from the water and was moved to a new starting point (Deguil et al. 2010). On the fifth day, a 60s retention test called "probe test" was performed. In fact, the platform was removed from the pool and the time spent by the rat in Northeast quadrant containing the platform for the previous 4 days was calculated.

2.5. Study of haematological and biochemical parameters

The rats were anesthetized and were sacrificed by rapid decapitation. Then, blood was collected in the EDTA tubes for hematologic analysis and heparin tubes for biochemical analysis. The hematologic parameters were measured using HORIBA ABX Pentra XL80 cell counter. For biochemistry, the parameters related to hepatic, renal, lipid and protein metabolism were measured using COBAS Integra 400 plus ROCHE®.

2.6. Neurochemical analysis

The rats were sacrificed and the brains were taken away and rapidly washed with 0.9% NaCl, then immediately stored at -80 °C. Sample contents in neurotransmitters (dopamine, epinephrine and norepinephrine) were measured as previously described (Amara et al. 2014; Enkel et al. 2014). Briefly, brain samples were weighed and homogenized (1/10, w/v) in an extraction solution (20mM HEPES buffer, pH 7.2, containing 1mM EDTA and 0.1M perchloric acid) using a hand-held sonicator (Sonics®). Yielded solutions were centrifuged at 15000 g for 10 min at 4°C. Neurotransmitter contents by HPLC with Coulometric Electrode Array Detector (ESA CoulArray®) using the ClinRep® HPLC Complete Kit for Catecholamines in Plasma. The limit of detection was 15 ng/L for dopamine and 8 ng/L for epinephrine and norepinephrine. Thirty five microliter samples were injected. The temperature applied on the system was 28°C. Tissue concentrations were determined by normalizing the quantified amounts of respective neurotransmitters to the corresponding weight of the individual tissue sample.

2.7. Trace element analysis

Iron, Manganese, Copper and Zinc were determined using a quadrupole ICP-MS Thermo X serie II (Thermo Electron, Bremen, Germany) equipped with quartz impact bead spray chamber and concentric nebulizer. The Xt interface and collision cell technology (CCT) options were used. Liver, lung and brain were mineralized in HNO₃ and then diluted at 1:100 in water before the analysis. Standard solutions were prepared in nitric acid 1% (v/v). ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu, ⁶⁵Cu, ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn isotopes were measured and ⁷¹Ga at 650 nmol/L was used as internal standard. The limits of detection and quantification were 0.96 nmol/L for Mn, 10.2 nmol/L for Fe, 32.7 nmol/L for Cu and 15.5 nmol/L for Zn.

2.8. Histopathological examination

Immediately after the sacrifice, the liver, the lung and the brain were taken away to be weighed. The tissue fragments were washed with a 0.9% solution of sodium chloride. They were fixed in 10% formalin and then paraffin included for histopathological analysis. The sections were cut about 5µm thick, deparaffinized, hydrated, and stained with hematoxylin-eosin (H & E).

2.9. Statistical analysis

The results are expressed as mean $\pm$ Standard Error to Mean (SEM). The results were treated with a Student's "t test". A p-value lower than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Characterization of Iron Oxide Nanoparticles

The Transmission Electron Microscopy (TEM) showed that IONPs have a spherical shape and an average size about 30 nm (Figure 1.A). Moreover, Energy dispersive X-ray (EDX) spectra of IONPs showed that there are no other elemental impurities present in these IONPs (Figure 1.B). Dynamic Light Scattering (DLS) was used to characterize the IONPs size distribution in solution. This technique measures the Brownian motion of particles and relates it to the particle size (Figure 1.C). In solution, the measured values were around 100 to 200 nm that is higher than the individual particle size shown in Figure 1.A (30 nm as measured by TEM).

3.2. Effects of IONPs on the body weight and the relative organ weight

Significant changes in the body weight gain and the relative organ weight were observed in the IONPs exposed rats compared to control group. The mean body weight significantly increased from the 4th day to the 8th day of the experiment. After treatment, it decreased to reach the weight of the control group at the 10th day and finally increased again in the 14th day (Figure 2). IONPs exposure decreased significantly the relative weight of kidneys and liver compared to controls but not that of brain, spleen and lungs (Table 1).

3.3. Effects of IONPs on the behavioral performances of rats

3.3.1. Anxiety and emotional state

Anxiety and emotional state of rats were assessed using the elevated plus maze. The time spent inside the close arms or the open arms of the labyrinth was not affected by the IONPs exposure (Figure 3.A) and we get the same result for the immobility time (Figure 3.B). Moreover, IONPs exposed group had no significant difference in the anxiety index (figure 3.C).

3.3.2. Spatial reference memory

The spatial reference memory was measured using the Morris water maze. Averages of the performances obtained during four training days were calculated for control and IONPs groups. For each group, the escape latencies to reach the platform decreased over the course of acquisition training and there was no significant difference between the two groups (Figure 4.A). The probe test performed the fifth day of the Morris water maze showed that the percentage of time spent in the area where the platform had been located during the four previous days remained similar in both groups (Figure 4.B).

3.4. Effects of IONPs on hematological parameters

The measurements of hematological parameters in both groups showed that the concentration of white blood cells, red blood cells, hemoglobin and the percentage of hematocrit remained unchanged (Table 2), but the platelet count increased significantly in treated rats compared to the control group.

3.5. Effects of IONPs on biochemical parameters

Treated group, by seven daily intranasal instillations of IONPs (10 mg/kg), showed a significant decrease of alkaline phosphatase (ALP) without changes of the transaminases. Glucose, lipids, total proteins, urea and creatinine levels remained unchanged also (Table 3). However, sub-acute exposure to IONPs decreased significantly iron level and transferrin saturation in treated rat compared to control rats.

3.6. Effects of IONPs treatment on neurotransmitter content in rat brain

Concentrations of monoamine neurotransmitters in brain homogenates are shown in Table 5. We found a significant increase of dopamine and norepinephrine levels in IONPs treated rats while the epinephrine level was not altered.

3.7. Effects of IONPs treatment on the trace element content in organs

Sub-acute intranasal exposure to IONPs decreased the concentration of manganese (Mn) and copper (Cu) in the liver. However, the content of these trace elements remained unchanged in the lung and the brain (Table 4). Interestingly, the determination of iron (Fe) and zinc (Zn) distribution in the liver, lung and brain shows no significant variations of the concentration of those elements in the IONPs exposed group compared to the control (Table 4).

3.8. Histopathological examination

The histopathological examination of the liver sections of control rats was normal. In comparison with the controls, sub-acute exposure to IONPs at 10 mg/kg (body/weight) induced slight pathological liver modifications manifested by sinusoidal congestion (SC), venous congestion (VC), deposition of Red Blood Cells in the vein and few lobular necro-inflammatory foci (NIF) (Figure 5). However, IONPs instillation did not affect the brain's structure neither the lung's structure (Results not shown).

4. Discussion

With the increasing production and use of IONPs, human body may be intentionally or unintentionally exposed to these nanoparticles via various possible routes including oral ingestion, inhalation, subcutaneous injection, intraperitoneal and intravenous penetration (Yah et al. 2012). Thus, IONPs may be then distributed through the systemic circulation in several tissues including the brain. Interestingly, the olfactory nerve pathway is considered as the most important entry to the central nervous system when the body is exposed to airborne NPs. Indeed, magnetite nanoparticles from outdoor air pollution were found in the human brain showing an entry in the brain directly via the olfactory bulb (Maher et al. 2016).

Adult Wistar rats were intranasally instilled daily with IONPs (10 mg/kg body weight) for seven successive days. Behavioral performances using neurobehavioral tests such as the elevated plus maze and Morris water maze, blood biochemistry, hematology, trace element biodistribution, neurotransmitter variation and histopathological modifications were investigated.

4.1. Effect on general health

Our findings indicated that IONPs exposure did not alter the general health of the animals

during the experimental days as no toxic sign or mortality was observed. However, IONPs administration increased significantly the body weight and decreased significantly the relative weight of liver and kidney in IONPs treated rats. These results are in concordance with those obtained by Szalay et al., (Szalay et al. 2012). This decrease of the organ coefficients indicates a systemic action of IONPs and may reflect a potential toxicity of IONPs.

4.2. Effect on brain and cognition

In the present study, IONPs had no impact on the cognitive performances of Wistar rats and the tissue organization of the brain remained unchanged. No effect of IONPs was found using elevated plus maze demonstrating unchanged anxiety-related behavior. However, Sheida et al., showed that abdominal injection IONPs increased rat's anxiety and fear, and decreased the locomotor activity of treated rats at dose of 14 mg/kg using the open field test which is a similar test used to assess emotion status in rodents (Sheida et al. 2017).

Furthermore, the Morris water maze that is one of the most frequently used tests to evaluate spatial learning and memory in rodents (Morris 1984) was not altered by the IONPs exposure suggesting that spatio-temporal organization of rat behavior was not affected. Moreover, control and IONPs treated rats were able to ameliorate their performances during trials; suggesting similar cognitive flexibility (Deguil et al. 2010; Labrie et al. 2009).

Our results revealed that the unchanged cognitive ability of IONPs treated rats could be related to the iron stability in the brain. Indeed, the tissue organization of the brain remained unchanged and trace elements concentrations remained similar in the two groups. Our results agree with those of Vayenas et al., who reported no change in Fe, Cu, Mn and Zn levels in the brain after iron overload (Vayenas et al. 1998). In contrast, in the study of Sheida et al., the intraperitoneal injection of IONPs was accompanied by significant changes of trace element concentrations in brain 7 days after injection. The increase in iron was associated with decrease in Zn, Cu and Mn compared to controls (Sheida et al. 2017). Interestingly, a remarkable decrease in concentrations of Zn can be considered as one of the mechanisms of disorders of higher nervous activity, namely, cognitive decline, memory impairment, and changes in motor activity (Sheida et al. 2017). In our study, the stable concentration of this trace element in the brain could explain the unchanged behavior and cognitive capacities of rats after IONPs instillation.

The discrepancies between studies can be explained by the nanoparticle properties and the

study design as underlined by Yarjanli et al., who reviewed the effect of iron nanoparticles on neural cells. The authors concluded that IONPs can generate oxidative stress and protein aggregation but that these effects largely depend on the nanoparticle's physical properties and dose, the exposure time and the route of administration (Yarjanli et al. 2017).

Dopamine, epinephrine and norepinephrine are neurotransmitters, which are found in neurons of all animals. Alteration of the normal expression of these transmitters is associated with human neurological disorders such as Parkinson's disease and depression (Nieoullon 2002).

Our results showed that acute exposure to IONPs affects the cerebral content of dopamine and norepinephrine in homogenate of rat brain by increasing their expression. This suggests a neuroprotective effect of IONPs against neurodegenerative diseases and cognitive alterations (depression and anxiety) confirmed by the unchanged cognitive capacities of IONPs treated rats comparing to controls. Such effect of IONPs was evidenced by Umarao et al., in 6-OHDA rat model of Parkinson's disease (PD) which is characterized by reduction in dopamine content (Umarao et al. 2016). Moreover, it has been reported that depression in PD is related to the loss of dopamine and norepinephrine innervation in the limbic system (Remy et al. 2005). However, after exposure to very small size IONPs (10 nm), another team observed a significant decrease in striatal dopamine and its metabolites and dopaminergic terminal damage as well as damage to neuronal vasculature (Imam et al. 2015). The increase of dopamine in brain can be explained by the state of stress induced in rats by the treatment with the nanoparticles, which causes an increase in the secretion of corticosterone, hormone known by its stimulatory action of dopamine in the central nervous system. The increase in noradrenaline in the brain can also result from the stress state induced by nanoparticles delivery. Indeed, hyperactivity of norepinephrine system is thought to be involved in sympathetic activation. In sum, the increase of dopamine and noradrenaline in the brain normally leads to conditions of attention and awakening. The differences between the findings seems to be related to the particle's size and properties and then to the aggregation/agglomeration behavior in the physiological medium. In fact, the use of IONPs as a drug delivery in the brain is still discussed because of the various considerations to take into account.

4.3. Effect on blood cells and inflammation

Blood cell count is used to monitor the hematological changes in the body caused by drugs or

chemicals. In this study, seven days after intranasal administration of IONPs, a significant increase of platelet count was observed. The exact mechanism of platelet count increase following NPs administration is not known. Platelets are usually increased in inflammatory reactions and immune responses since they contain a multitude of pro-inflammatory and immune-modulatory bioactive compounds and they are activated under stressful conditions (Von Hundelshausen & Weber 2007). Then reactive thrombocytosis seems to be the most outstanding effect on the hematopoiesis of treated rats. This finding is probably related to the decrease in plasma iron level and transferrin saturation detected in the IONPs group. Indeed, it is well known that in case of inflammation processes there is an increase of macrophages that use the plasmatic iron to deal with inflammation. In addition, histopathological examination showed that IONPs caused inflammatory response in the liver. Thus our results confirm the IONPs exposure-induced inflammation reported in previous studies (Hasan et al. 2012; Kim et al. 2016; Sadeghi et al. 2015; Park et al. 2010). In particular, Park et al., reported that a single intratracheal injection of IONPs in mice causes inflammatory responses, especially in the lung, manifested histologically by cell infiltration in the alveolar space and phagocytosis (Park et al. 2010). Furthermore, expressions of many genes related to inflammation or tissue damage such as heat shock protein, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and serum amyloid A were significantly induced (Park et al. 2010). Moreover, Recently, Sadeghi et al., using two different nanoparticle doses (20 and 40 mg/kg) and two exposing periods (7 and 14 times in 14 and 28 days respectively) to explore the toxicity of IONPs demonstrated that accumulation of these NPs results in significant inflammation in the liver and lung tissues (Sadeghi et al. 2015).

4.4. Effect on liver

ALP, ALT and AST enzymes increase in response to liver damage and are commonly evaluated in toxicity studies. After 7 days from the last instillation, significant decrease of ALP and histological changes were observed. Wang et al., reported a decrease in all the hepatic enzymes after IONPs inhalation in Wistar rats at dose of 8.5 mg/kg for 3 days and severe histological damages. They also noted that although the liver damages progressed throughout the 36 hours of post-exposure period, the liver enzyme activities never increase (Wang et al. 2010). In contrast, Shirband et al., using gavage to administer low doses of IONPs for 15 days in rats noted a significant increase in the levels of liver enzymes (ALT, AST and ALP) suggesting destruction of liver cells and obstruction of bile ducts (Shirband et al. 2014). Sadeghi et al., also reported an increase in transaminases, but not in alkaline

phosphatase activities after the 14th injection (Sadeghi et al. 2015). These differences could be explained by the differences in study designs. In addition, in our study, the liver may recover its homeostasis during the 7 days after the last instillation.

We also showed that Mn and Cu concentrations decreased significantly in the liver after 7 intranasal injections, but the concentration of Fe and Zn remained unchanged. Interactions between Fe-Mn and Fe-Cu are complex. The results are not in agreement with those of Vayenas et al., who reported an increase in Mn and Zn levels after iron overload (Vayenas et al. 1998). These authors did not use nanoparticles and attributed these raises to an increase in intestinal absorption and cellular uptake. In contrast, Chua and Morgan reported no change of liver manganese concentrations after an oral iron overload (Chua & Morgan 1996). To our knowledge, this is the first study that reported the effect of IONPs on trace element concentration in liver and our observation may be related to the use of nanoparticles.

4.5. Effect on lungs

The tissue organization of the lung remained unchanged. In contrast, Wang et al. demonstrated that IONPs caused histopathological damage to the lungs (Wang et al. 2010). In their work, they investigated the toxic effects of inhalation exposure to ferric oxide (Fe₂O₃) nanoparticles in rats at 8.5 mg/kg body weight. Similarly, Sadeghi et al., reported nanoparticle dose-dependent pulmonary emphysema, interstitial hyperemia and inflammation in lungs. Neutrophils, lymphocytes and eosinophils were present in the lung tissue (Sadeghi et al. 2015).

5. Conclusion

To conclude, the sub-acute intranasal administration of IONPs causes subtle signs of toxicity by slightly modulating the blood cell count, the liver function tests, the neurotransmitter content in the brain and the trace element distribution in tissues. Interestingly, the neurobehavioral examination showed that short-term exposure to IONPs does not affect the emotional status and the spatial reference memory in adult Wistar rats. However, further studies are necessary to confirm the lack of side effect using other behavioral performance test and to identify potential biomarkers related to IONPs exposure in order to detect potential hazardous effects on the human health.

Declaration of interests

The authors report no conflicts of interest in this work.

Acknowledgments

We would like to thank Professor Lassaad El Mir for providing Iron Oxide Nanoparticles and the equipex NanoID (ANR-10-EQPX-39) for the access to the nanoZS. Thanks also to the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the Auvergne Rhone Alpes Region (grant N° 16.007278.01 for Dalel Askri) for their funding.

References

Ai, J. et al., 2011. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International journal of nanomedicine*, 6, pp.1117–1127.

Amara, S. et al., 2014. Acute exposure to zinc oxide nanoparticles does not affect the cognitive capacity and neurotransmitters levels in adult rats. *Nanotoxicology*, 8(sup1), pp.208–215. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2013.879342>.

Announcement, S., 2015. FDA strengthens warnings and changes prescribing instructions to decrease the risk of serious allergic reactions with anemia drug Feraheme (ferumoxytol). , pp.1–4.

Bleeker, E.A.J. et al., 2013. Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(1), pp.119–125.

Chua, a C. & Morgan, E.H., 1996. Effects of iron deficiency and iron overload on manganese uptake and deposition in the brain and other organs of the rat. *Biological trace element research*, 55(1–2), pp.39–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971353>.

Cortajarena, A.L. et al., 2014. Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings. *Nanobiomedicine*, 1(2), p.doi: 10.5772/58841. Available at: <http://www.intechopen.com/journals/nanobiomedicine/engineering-iron-oxide-nanoparticles-for-clinical-settings>.

Deguil, J. et al., 2010. Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP Parkinsonian mice. *Neurotoxicity Research*, 17(2), pp.142–155.

Elias, A. & Tsourkas, A., 2009. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program, pp.720–726.

Enkel, T. et al., 2014. Reduced expression of nogo-a leads to motivational deficits in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8(January), pp.1–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3898325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Grover, V.A. et al., 2012. Adsorption and desorption of bivalent metals to hematite nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), pp.86–92.

Hasan, D.M. et al., 2012. Ferumoxytol-Enhanced MRI to Image Inflammation Within Human Brain Arteriovenous Malformations: A Pilot Investigation. *Translational Stroke Research*, 3(SUPPL. 1), pp.166–173.

Huang, H.S. & Hainfeld, J.F., 2013. Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp.2521–2532.

Von Hundelshausen, P. & Weber, C., 2007. Platelets as immune cells: Bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circulation Research*, 100(1), pp.27–40.

Imam, S.Z. et al., 2015. Iron Oxide Nanoparticles Induce Dopaminergic Damage: In vitro Pathways and In Vivo Imaging Reveals Mechanism of Neuronal Damage. *Molecular Neurobiology*, 52(2), pp.913–926.

Kim, E. et al., 2016. The effect of neutral-surface iron oxide nanoparticles on cellular uptake and signaling pathways. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, pp.4595–4607. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27695320><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5028088><https://www.dovepress.com/the-effect-of-neutral-surface-iron-oxide-nanoparticles-on-cellular-upt-peer-reviewed-article-IJN>.

Kim, Y. et al., 2013. In vivo nanoneurotoxicity screening using oxidative stress and neuroinflammation paradigms. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(7), pp.1057–1066.

Labrie, V. et al., 2009. Genetic inactivation of D-amino acid oxidase enhances extinction and reversal learning in mice. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(1), pp.28–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19117914> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2632856>.

Lemine, O.M. et al., 2014. γ -Fe₂O₃ by sol-gel with large nanoparticles size for magnetic hyperthermia application. *Journal of Alloys and Compounds*, 607, pp.125–131. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.04.002>.

Lu, M. et al., 2010. FDA report: Ferumoxytol for intravenous iron therapy in adult patients with chronic kidney disease. *American Journal of Hematology*, 85(5), pp.315–319.

Maaroufi, K. et al., 2009. Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate. *Physiology & behavior*, 96(2), pp.343–349.

Maher, B.A. et al., 2016. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), pp.10797–10801. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1605941113>.

Morris, R., 1984. Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, pp.7336–7336.

Nieoullon, A., 2002. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in Neurobiology*, 67(1), pp.53–83.

Park, E.-J. et al., 2010. Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology*, 275(1–3), pp.65–71. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X10002465>.

Pellow, S. et al., 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), pp.149–167.

Pitkethly, M., 2008. Nanotechnology: past, present, and future. *Nano Today*, 3(3–4), p.6.

Remy, P. et al., 2005. Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, 128(6), pp.1314–1322.

Van Rooy, I. et al., 2011. In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain. *Pharmaceutical Research*, 28(3), pp.456–471.

Sadeghi, L., Yousefi Babadi, V. & Espanani, H.R., 2015. Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue. *Bratislavske lekarske listy*, 116(6), pp.373–8.

Sheida, E. et al., 2017. The effect of iron nanoparticles on performance of cognitive tasks in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), pp.8700–8710. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85013081018&doi=10.1007%2Fs11356-017-85316&partnerID=40&md5=626b2c261f10e38bc9b09e725b40e087>.

Shirband, A. et al., 2014. Dose-dependent effects of iron oxide nanoparticles on thyroid hormone concentrations in liver enzymes: Possible tissue destruction. *Global Journal of Medicine Researches and Studies*, 1(1), pp.28–31.

Simko, M. & Mattsson, M.-O., 2014. Interactions Between Nanosized Materials and the Brain. *Current Medicinal Chemistry*, 21(37), pp.4200–4214. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=21&issue=37&spage=4200>.

Sun, Z. et al., 2014. Magnetic field enhanced convective diffusion of iron oxide nanoparticles in an osmotically disrupted cell culture model of the blood-brain barrier. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), pp.3013–3026.

Szalay, B. et al., 2012. Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro experiments. *Journal of Applied Toxicology*, 32(6), pp.446–453. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.1779>.

Umarao, P. et al., 2016. Neuroprotective Potential of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Along with Exposure to Electromagnetic Field in 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), pp.261–269.

Vayenas, D. V et al., 1998. Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper

concentration in rat tissues in vivo: study of liver, spleen, and brain. *Int J Clin Lab Res*, 28(3), pp.183–186. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801930>.

Wang, L. et al., 2010. Acute Toxicity of Ferric Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10, pp.8617–8624.

Wáng, Y.X.J. & Idée, J.-M., 2017. A comprehensive literatures update of clinical researches of superparamagnetic resonance iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 7(1), pp.88–122. Available at: <http://qims.amegroups.com/article/view/13786/14098>.

Yah, C.S., Iyuke, S.E. & Simate, G.S., 2012. A review of nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), pp.299–314.

Yarjanli, Z. et al., 2017. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC Neuroscience*, 18(1), p.51. Available at: <http://bmcneurosci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12868-017-0369-9>.

Figures

Figure 1: TEM micrograph showing the spherical iron oxide phase, the particles sizes were found to have an average size of 30nm (A). EDX spectra of IONPs representing the elemental composition of nanoparticles samples (B). The average hydrodynamic size of IONPs determined by Dynamic Light Scattering (C).

Figure 2: Mean Body Weight progress of treated rats with IONPs at dose of 10 mg/kg by intranasal instillation (7 days of treatment and then 7 days after treatment). Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per group*. * $p < 0.05$ using t Student test.

Figure 3: Effects of IONPs treatment for 7 consecutive days by intranasal injections on spent time in the closed and open arms (A), on immobility time (B) and on anxiety index from the elevated plus maze (C). (The test was performed 24 hours after the last instillation). Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per group*. t Student test was used for the statistical analyses.

Figure 4: Effects of IONPs on the behavioral performances of rats in Morris water maze; A) Escape latency to reach the platform during acquisition after intranasal administration of IONPs and B) the percent of spent time in the area where the platform was located on the previous day were measured. (The test was performed 24 hours after the last instillation). Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per group*. t Student test was used for the statistical analyses.

Figure 5: Histopathology of liver tissues in rats treated with IONPs for 7 consecutive days. (A) Control group showing normal liver with normal vein (V) and normal sinusoid (S), (B1) pathological alterations in the liver of IONPs (10 mg/kg) treated rats manifested by sinusoidal and venous congestion (SC and VC), RBC (Red Blood Cells) deposit and (B2) lobular necro-inflammatory foci (NIF). A and B1 magnification x200; B2 magnification x400

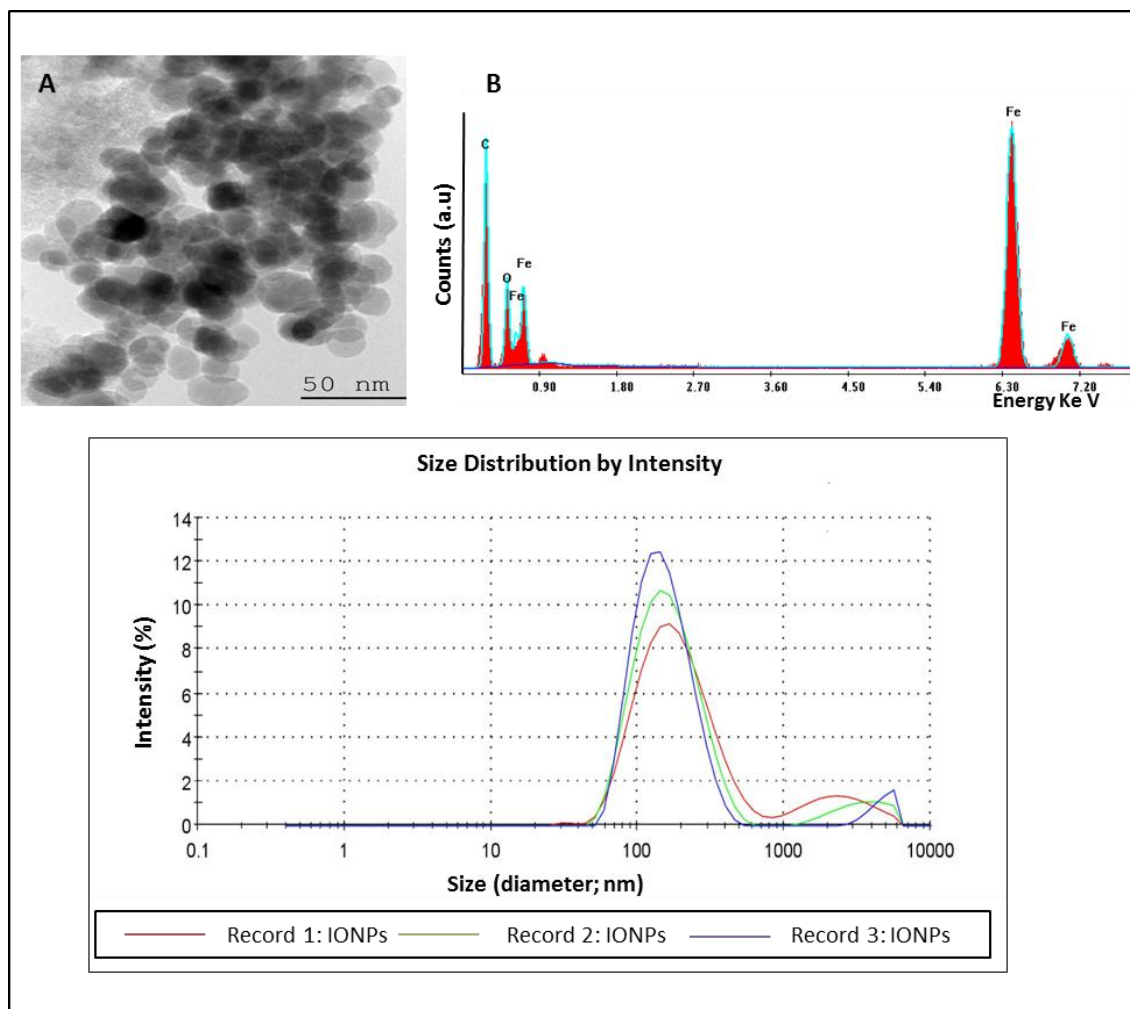


Figure 1: TEM micrograph showing the spherical iron oxide phase, the particles sizes were found to have an average size of 30nm (A). EDX spectra of IONPs representing the elemental composition of nanoparticles samples (B). The average hydrodynamic size of IONPs determined by Dynamic Light Scattering (C).

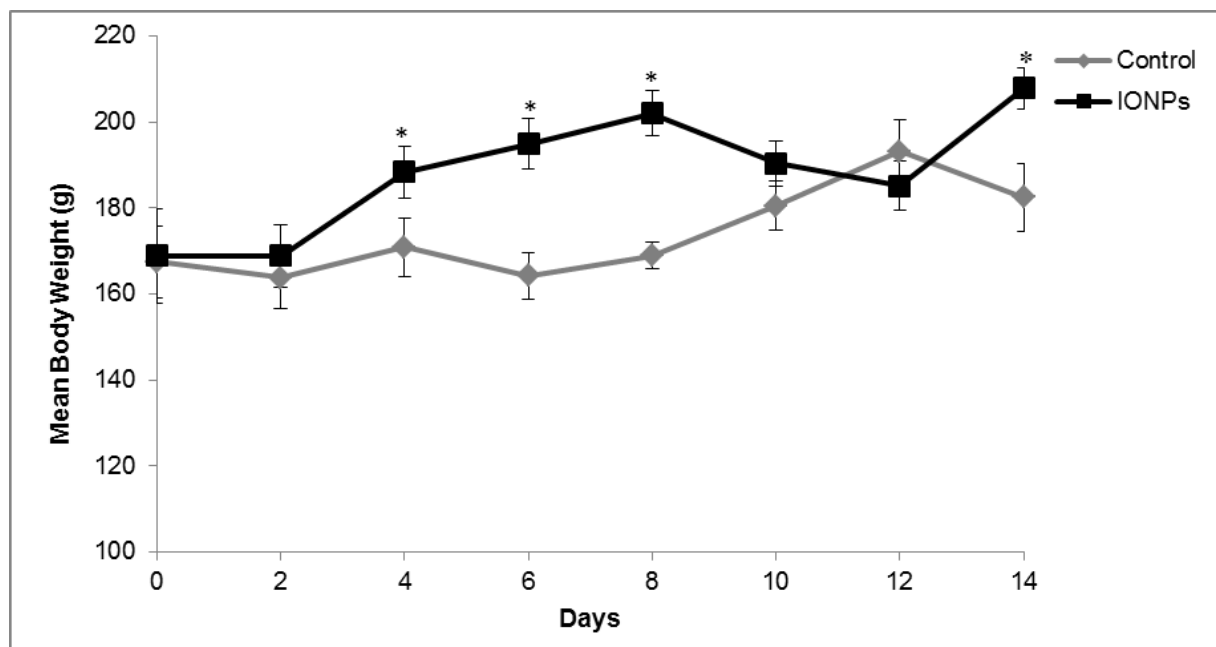


Figure 2: Mean Body Weight progress of treated rats with IONPs at dose of 10 mg/kg by intranasal instillation (7 days of treatment and then 7 days after treatment). Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per* group. * $p < 0.05$ using t Student test.

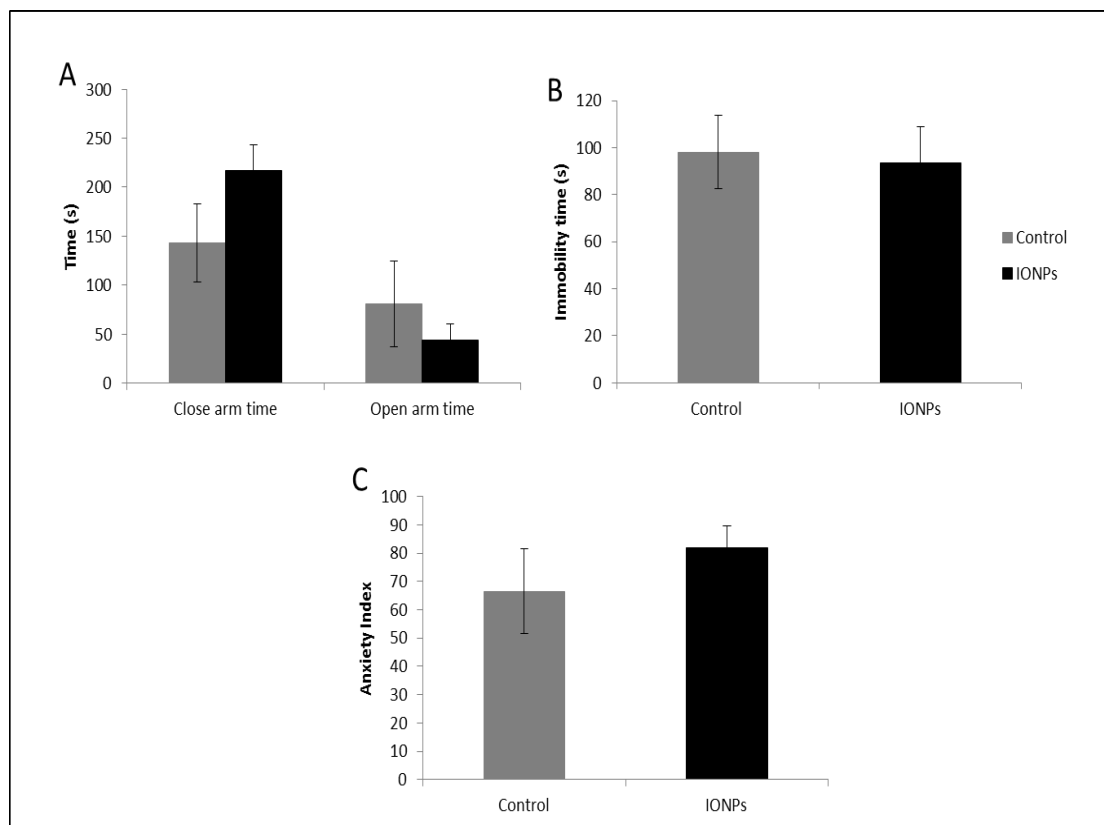


Figure 3: Effects of IONPs treatment for 7 consecutive days by intranasal injections on spent time in the closed and open arms (A), on immobility time (B) and on anxiety index from the elevated plus maze (C). (The test was performed 24 hours after the last instillation). Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per group*. t Student test was used for the statistical analyses.

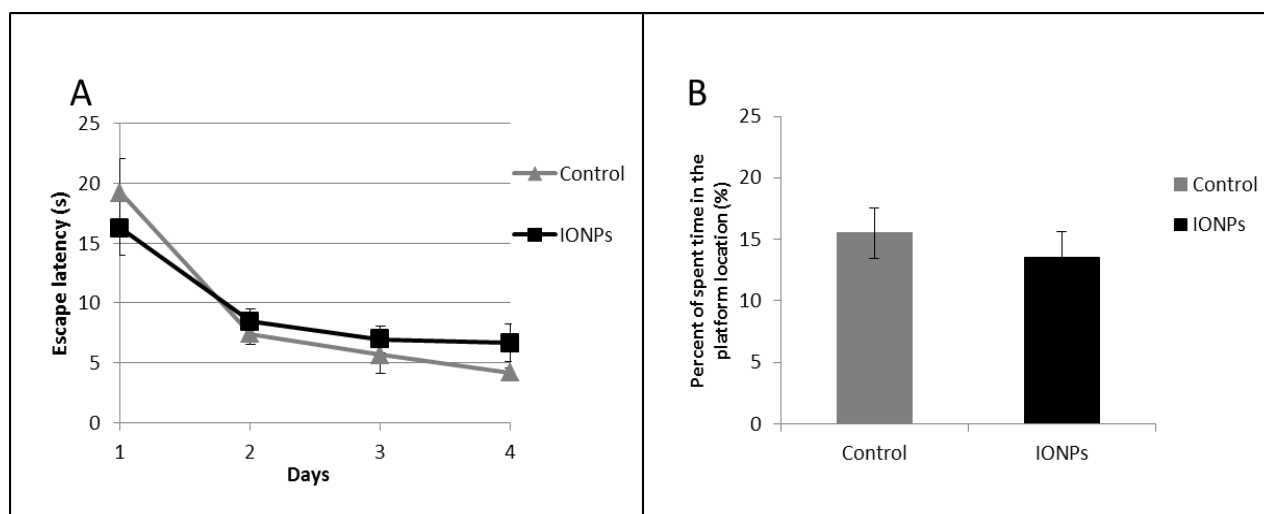


Figure 4: Effects of IONPs on the behavioral performances of rats in Morris water maze; A) Escape latency to reach the platform during acquisition after intranasal administration of IONPs and B) the percent of spent time in the area where the platform was located on the previous day were measured. (The test was performed 24 hours after the last instillation). Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per group*. *t* Student test was used for the statistical analyses.

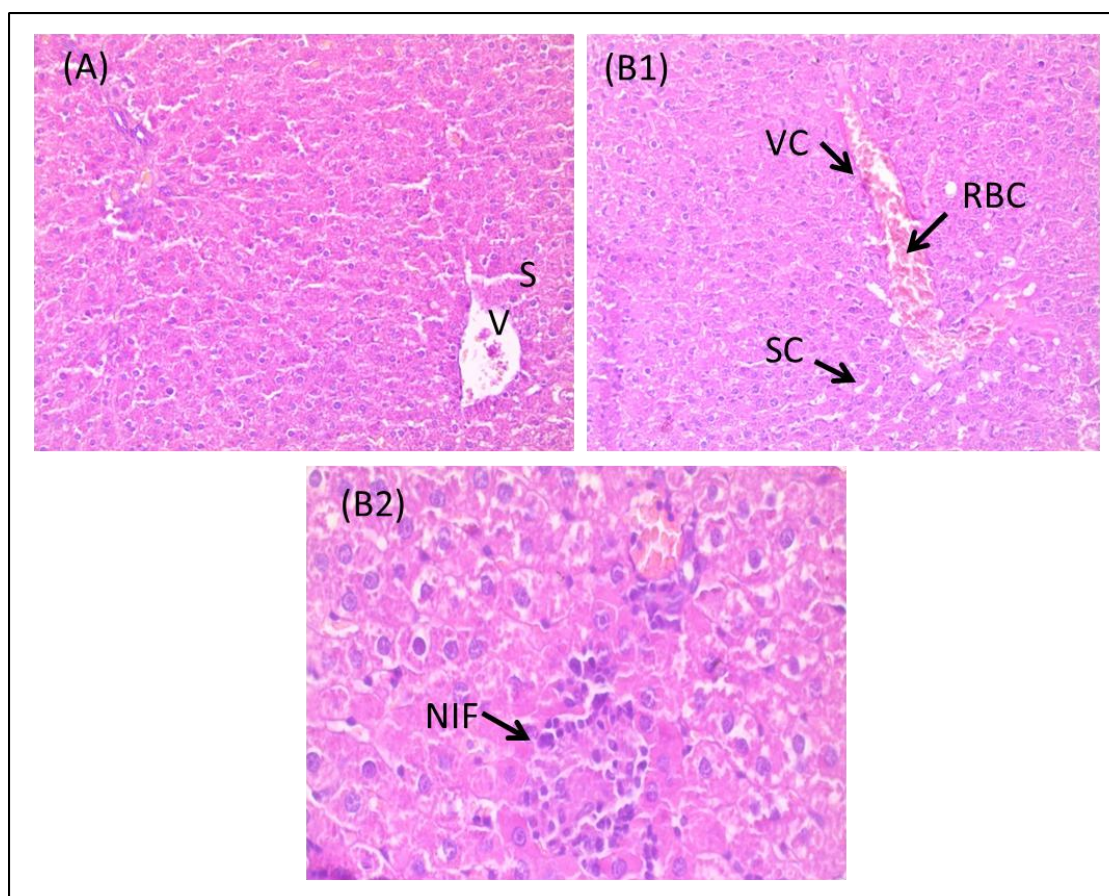


Figure 5: Histopathology of liver tissues in rats treated with IONPs for 7 consecutive days. (A) Control group showing normal liver with normal vein (V) and normal sinusoid (S), (B1) pathological alterations in the liver of IONPs (10 mg/kg) treated rats manifested by sinusoidal and venous congestion (SC and VC), RBC (Red Blood Cells) deposit and (B2) lobular necro-inflammatory foci (NIF). A and B1 magnification x200; B2 magnification x400

Tables

Table 1: Relative Organ Weight (mg/g) changes for treated rats with IONPs at dose of 10mg/kg for seven consecutive days. Data obtained at day 14 expressed as means $\pm$ SEM of 6 animals *per* group. * $p < 0.05$ using t Student test.

Table 2: Effects of IONPs intranasal instillation on hematological parameters in wistar rats. Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per* group. WBC white blood cells, RBC red blood cells, MCV mean corpuscular volume, MCH mean corpuscular hemoglobin. * $p < 0,05$ using t Student test.

Table 3: Effects of IONPs intranasal instillation on biochemical parameters in wistar rats. Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per* group. ALP alkaline phosphatase, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, TS Transferrin saturation. * $p < 0,05$ using t Student test.

Table 4: Effects of IONPs intranasal instillation on the trace element content in wistar rats. Data represent the means $\pm$ SEM of 6 animals *per* group. * $p < 0,05$ using t Student test.

Table 5: Effects of IONPs intranasal instillation on the neurotransmitter content (nanomol/mg) in rat brain. Data represent the means $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ using t Student test.

	Brain (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Liver (mg/g)	Spleen (mg/g)	Lungs (mg/g)
Control	9.05±0.21	9.94±0.41	53.42±1.92	3.65±0.23	7.96±0.19
IONPs	8.29±0.29	8.44±0.34*	47.05±1.5*	3.15±0.19	7.39±0.37

Table 1: Relative Organ Weight (mg/g) changes for treated rats with IONPs at dose of 10 mg/kg for seven consecutive days. Data obtained at day 14 expressed as means ± SEM of 6 animals *per* group. * $p < 0.05$ using t Student test.

	Control	IONPs
WBC 10⁹/L	6.65±0.76	7.83±0.78
RBC 10¹²/L	7.12±0.15	7.52±0.15
Hemoglobin g/dL	12.46±0.22	13.1±0.21
Hematocrit %	37.5±0.66	39.41±0.61
MCV fL	52.7±1.05	52.46±0.96
MCH g/dL	17.53±0.32	17.45±0.26
Platelets 10⁹/L	593±67.72	887±92.96*
Neutrophils %	1.98±0.37	1.74±0.28
Lymphocytes %	4.41±0.48	5.47±0.50
Monocytes %	0.18±0.04	0.44±0.13
Eosinophils%	0.13±0.03	0.16±0.01
Basophils %	0.006±0.003	0.01±0.004

Table 2: Effects of IONPs intranasal instillation on hematological parameters in wistar rats. Data represent the means ± SEM of 6 animals *per* group. WBC white blood cells, RBC red blood cells, MCV mean corpuscular volume, MCH mean corpuscular hemoglobin. * $p < 0,05$ using t Student test.

	Control	IONPs
ALP U/L	209.5±9.26	149.66±10.3*
ALT U/L	63.66±4.67	53.66±4.20
AST U/L	157±11.05	132.16±14.31
Cholesterol mmol/L	1.38±0.08	1.16±0.05
Creatinine µmol/L	16.66±2.8	17±0.81
Glucose mmol/L	8.52±0.45	8.69±0.68
Iron µmol/L	45.81±5.02	29.78±1.89*
TS %	39.2±3.89	29.28±2.15*
Proteins g/L	57.83±1.63	57.83±1.81
Triglycerides mmol/L	1.30±0.13	1.29±0.14
Uric acid µmol/L	88±3.61	65.16±14.45
Urea mmol/L	6.53±0.47	5.58±0.22

Table 3: Effects of IONPs intranasal instillation on biochemical parameters in wistar rats. Data represent the means ± SEM of 6 animals *per* group. ALP alkaline phosphatase, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, TS Transferrin saturation. * $p<0,05$ using t Student test.

	Liver		Lung		Brain	
	Control	IONPs	Control	IONPs	Control	IONPs
Mn (µg/g)	11.57±0.56	8.77±0.93*	1.22±0.04	1.12±0.05	1.89±0.21	1.94±0.13
Fe (µg/g)	379.67±25.39	410.32±35.81	503.56±33.54	530.7±96.72	80.84±3.07	86.62±5.53
Cu (µg/g)	15.11±0.79	11.56±1.07*	7.64±0.21	6.71±0.48	11.85±1.46	12.48±0.71
Zn (µg/g)	112.78±8.49	90.76±7.64	105.37±3.98	100.9±3.39	85.74±4.83	84.41±3.41

Table 4: Effects of IONPs intranasal instillation on the trace element content in wistar rats.

Data represent the means ± SEM of 6 animals *per* group. * $p < 0,05$ using t Student test.

	Dopamine (nanomol/mg)	Epinephrine (nanomol/mg)	Norepinephrine (nanomol/mg)
Control	29.84 ± 7.41	10.66 ± 1.31	330.00 ± 86.20
IONPs	198.82 ± 67.17*	13.40 ± 1.53	903.10 ± 115.44*

Table 5: Effects of IONPs intranasal instillation on the neurotransmitter content (nanomol/mg) in rat brain. Data represent the means ± SEM. * $p < 0,05$ using t Student test.

3. Effets de l'administration intraveineuse des NPs de fer

Les nanomatériaux manufacturés sont utilisés dans diverses applications en raison de leurs propriétés particulières. Les nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_2O_3 -NPs) sont utilisées dans la biomédecine comme agents théranostiques, c'est-à-dire comme agents de contraste dans l'imagerie par résonance magnétique et dans le traitement du cancer. Avec l'augmentation de la production et de l'utilisation de ces Fe_2O_3 -NPs, il y a une augmentation évidente de l'exposition au Fe_2O_3 -NPs et, par conséquent, un risque plus élevé de conséquences néfastes pour l'environnement et les humains. Ainsi, nous avons décidé d'établir une étude globale par exposition subaiguë des rats Wistar aux NPs de fer à une dose journalière répétée pendant 7 jours de 10 mg/kg. L'étude par voie intraveineuse a pour but aussi d'évaluer l'effet systémique de ces NPs.

Les résultats de notre étude ont été publiés récemment dans le journal « Journal of Trace Elements in Medicine and Biology ».

a) Résumé des principaux résultats

Dans ce travail, nous avons étudié les effets d'une exposition quotidienne intraveineuse de Fe_2O_3 -NPs sur le rat Wistar pendant une semaine. Comme résultats, nous avons montré que plusieurs paramètres hématologiques et transaminases ainsi que l'histologie des organes (foie, cerveau et poumon) sont restés inchangés chez les rats traités par rapport aux rats témoins. L'étude cognitive a montré que ni les niveaux de catécholamines cérébrales ni le comportement émotionnel et les capacités d'apprentissage et de mémoire des rats n'ont été affectés par l'exposition intraveineuse subaiguë aux NPs- Fe_2O_3 . Cependant, les niveaux de fer plasmatique et cérébral ont été perturbés après cette exposition.

b) Conclusion

L'étude de la toxicité subaiguë des NPs par l'administration intraveineuse des Fe_2O_3 -NPs a permis d'évaluer cette toxicité sur différents plans physiologiques. Dans les conditions de notre expérience, une administration intraveineuse subaiguë de 10 mg / kg de Fe_2O_3 -NPs pendant 7 jours semble ne pas avoir de danger pour les rats Wistar comme en témoigne la stabilité de la numération de formule sanguine, des marqueurs hépatiques, du contenu des neurotransmetteurs dans le cerveau et de la distribution du fer dans le foie. Nos résultats ont

démontré que les Fe₂O₃-NPs pourraient avoir des effets transitoires sur le rat suite à la diminution des taux de fer plasmatique et cérébral. Ces résultats permettent de mieux élucider les effets des NPs de fer dans un organisme vivant tel que le rat dont la physiologie présente des similitudes avec celle de l'Homme. Pour conclure, la voie intraveineuse reste de loin une voie d'administration plus sûre que d'autres, ce qui est encourageant pour l'utilisation des NPs de fer dans des applications biomédicales. De plus, l'utilisation de Fe₂O₃-NPs en tant qu'administration de médicaments dans le cerveau doit être documentée.

c) Article III

Sub-acute intravenous exposure to Fe₂O₃ nanoparticles does not alter cognitive performances and catecholamine levels, but slightly disrupts plasma iron level and brain iron content in rats

Dalel Askri^{1,2,3)*}, Souhir Ouni²⁾, Said Galai⁴⁾, Benoit Chovelon⁵⁾, Josiane Arnaud^{3,5)},

Sylvia G Lehmann⁶⁾, Mohsen Sakly²⁾, Michel Sève^{1,3)} and Salem Amara²⁾

1) Univ. Grenoble Alpes, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, PROMETHEE Proteomic Platform, 38000 Grenoble, France

2) Univ. Carthage, Fac. Sciences of Bizerte, Unit of Research in Integrated Physiology, Bizerte, Tunisia

3) Univ. Grenoble Alpes, Inserm, LBFA, BEeSy, 38000 Grenoble, France

4) University of Tunis El Manar, Laboratory of Clinical Biology, National Institute of Neurology, Tunis, Tunisia

5) CHU Grenoble Alpes, Unit of Hormonal and Nutritional Biochemistry, Institute of Biology and Pathology, F 38000 Grenoble, France

6) Univ. Grenoble Alpes, Univ. Savoie Mont Blanc, CNRS, IRD, IFSTTAR, ISTerre, 38000 Grenoble, France

* Corresponding Author: Dalel Askri, Promethee Proteomic Platform, IBP, 38000 Grenoble-France. Email: dalel.askri@univ-grenoble-alpes.fr Tel: 0033(0)669259993

Abstract

Engineered nanomaterials are used in various applications due to their particular properties. Among them, Iron Oxide Nanoparticles (Fe₂O₃-NPs) are used in Biomedicine as theranostic agents i.e. contrast agents in Magnetic Resonance Imaging and cancer treatment. With the increasing production and use of these Fe₂O₃-NPs, there is an evident raise of Fe₂O₃-NPs exposure and subsequently a higher risk of adverse outcome for the environment and Humans. In the present paper, we investigated the effects of an intravenous daily Fe₂O₃-NPs exposure on Wistar rat for one week. As results, we showed that several hematological parameters and transaminase (ALT and AST) levels as well as organ histology remained unchanged in treated rats. Neither the catecholamine levels nor the emotional behavior and learning / memory capacities of rats were impacted by the sub-acute intravenous exposure to Fe₂O₃-NPs. However, iron level in plasma and iron content homeostasis in brain were disrupted after this exposure. Thus, our results demonstrated that Fe₂O₃-NPs could have transient effects on rat but the intravenous route is still safer than others which is encouraging for their use in medical and/or biological applications.

Keywords: Fe₂O₃-NPs; iron; catecholamines; cognition; rat.

Introduction

Nanotechnology represents a complex domain that involves different fields such as electrical engineering, physics, chemistry, biology and medicine. The latter field, called nanomedicine [1], provides new tools of diagnosis and therapy based on nanomaterials. Among them, Iron oxide Nanoparticles (Fe₂O₃-NPs) are widely used in nanomedicine and also in other fields such as biology and environment [2]. In vivo, applications of Fe₂O₃-NPs could be classified as therapeutic, delivery and diagnostic (Magnetic Resonance Imaging (MRI)) agents; whereas for in vitro applications, the main use is in diagnosis (separation/selection and magnetic relaxometry) [3]. Indeed, the blood-brain barrier presents a real obstacle for the drug delivery

to the brain, particularly for the treatment of neurodegenerative diseases, notably Alzheimer and Parkinson Diseases as well as brain cancers. Thus, the encapsulation of drugs in the NPs or their coupling to NPs could overcome the obstacle of the blood-brain barrier [4]. They can penetrate into the brain via transport along the nerves or through the blood brain barrier [5]. The surface of these NPs can be modified by coating, which modifies their physicochemical properties and opens their use in nanomedicine [6,7]. Kim et al. [8] reported that among several engineered coated Fe₂O₃-NPs, dimercaptosuccinic acid coated Fe₂O₃ (DMSA-Fe₂O₃NPs) were potent pro-apoptotic agents for the rat sciatic nerve, and have also differential ability to regulate oxidative stress, inflammation and apoptotic signaling in several other cells notably in neuroglia, macrophages, lymphocytes and endothelial cells. Recently, Sun et al.[9], showed, using a model of derived cell line from the mouse brain, that the application of a magnetic field, stimulating convection and diffusion of Fe₂O₃-NPs, increases the permeability of these NPs through the blood-brain barrier. This change is in favor of a possible use of Fe₂O₃-NPs in the delivery of drugs to the central nervous system. Furthermore, another team reported that the intravenous delivery of biocompatible magnetic Fe₂O₃-NPs is able to load specifically the tumor in mice with subcutaneous squamous cell carcinoma [10]. With well determined thermal induction and a tumor to non-tumor ratio higher than 16, precise tumor ablation becomes possible. Thus, this finding can be used clinically in combination with chemotherapy or radiotherapy to enhance their efficacy. Besides their anti-tumor applications, Fe₂O₃-NPs based drugs such as ferumoxide and ferucarbotran are used in MRI as contrast agents, due to their biocompatibility, biodegradability and strong contrast enhancement [6,11]. Ferumoxytol (Feraheme®) is also used for the treatment of iron deficiency anemia in adults suffering from chronic kidney disease. This treatment was approved in 2009 by the Food and Drug Administration (FDA) and in 2012 by the European Medicines Agency (EMA) as a treatment to be administered intravenously [12]. However, in March 2015, the FDA warned about risks of anaphylactic shock in people who have an allergy to any intravenous iron substitute [13]. Thus, Fe₂O₃-NPs biological properties should be carefully studied to better understand the effects of these Fe₂O₃-NPs in the body [14]. The toxicological properties, namely nanotoxicology, depend on the characteristics of the nanoparticulate size and the chemical composition of the particle.

Several in vitro and in vivo studies have been conducted in this context, using various cell models and different routes of exposure in animals [8,14–20]. Nevertheless, the effects of Fe₂O₃-NPs on brain (behavior and neurotransmitters levels) are not well understood and

studies are necessary to better clarify those effects to minimize the risks and to increase the benefits for the use of the Fe₂O₃-NPs in nanomedicine. In this study, we investigated the possible toxic effects of sub-acute intravenous administration of Fe₂O₃-NPs in rats. Thereby, the effects of those nanoparticles on cognitive performances and the content of neurotransmitters and iron in brain were analyzed. The hematological and biochemical parameters as well as the organ histopathological modification were also examined.

Material and Methods

Synthesis and characterization of Iron Oxide Nanoparticles Fe₂O₃-NPs

Fe₂O₃-NPs used in this paper were gently provided by the Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials applied to the Environment at the Faculty of Sciences of Gabes under the direction of Professor Lassaad El Mir. Samples of Fe₂O₃-NPs were prepared by a modified sol-gel method under supercritical conditions of ethyl alcohol (EtOH). The particle size was adjusted by magnetic stirring time of 48 hours, producing NPs with an average diameter of 30 nm[21]. Fe₂O₃-NPs were characterized by X-ray diffraction (XRD), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS). The XRD determines the size and crystallized structure of these NPs using the PANalytical Xpert Pro diffractometer. The size and shape of Fe₂O₃-NPs were determined by a JEOL transmission electron microscope (JEM-2100F) operating at 200 keV using Digital Micrograph and EDAX Genesis as software. Fe₂O₃-NPs were suspended in alcohol solution and then deposited on a copper grid coated with a layer of carbon film.

Animal treatment

Young adult male Wistar rats aged 10 weeks and weighing ~ 184 g at the beginning of the experiments were purchased from SIPHAT (Ben Arous, Tunisia). They were randomly divided into 2 groups, control and treated with n=6 each. The treated group received 10 mg/kg of Fe₂O₃-NPs by intravenous injection (IV) for 7 consecutive days. Control rats were injected only with the 0.9% sodium chloride solution. The animals were housed under suitable conditions of temperature (25 °C) and light (12:12 hours light / dark cycle) and they received water and food ad libitum. The experimental protocols were approved by the Medical Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of Pasteur Institute of Tunis (approval number: LNFP/Pro 152012). For Fe₂O₃-NPs treatment, the NPs were suspended in a physiological solution of 0.9% sodium chloride then were sonicated for 60 min with a hand-

held sonicator (Sonics®). Before each injection, the solution was also vortexed for 1 min. Before being sacrificed, the rats were anesthetised. The sacrifice was done 7 days after the last injection and the different organs (liver, kidneys, spleen, lungs and brain) were extracted to be analyzed and a relative organ / body weight ratio (mg / g) for each was calculated.

Behavioral tests

Twenty four hours after the last injection, two behavioral tests were performed, to evaluate the effect of Fe₂O₃-NPs on emotional state, learning and memory in rats:

Elevated Plus Maze

The Elevated Plus Maze test was used as before [22,23]. Briefly, the maze consists of four arms of 50 cm long and 10 cm wide, opposite one another in pairs, and connected by a central platform of 100 cm². The device was raised to a height of 60 cm. The closed arms were surrounded by a 50 cm wall, while the edges of the open arms were 0.5 cm in order to favour entry into the open arms [24]. The duration of the test was 5 min and we started by placing a rat in the center of the labyrinth, facing an open arm. The rat explored the device freely. Thus, the number of entries and the time spent in the different parts of the labyrinth (the open arms, the closed arms and the central part) were recorded using a video camera placed above the device. The total activity in the labyrinth was evaluated by the total number of entries in the arms and the central part. A Percentage Reflecting Anxiety Status, also known as anxiety index, was calculated by the formula (time spent in closed arms x 100 / time spent in open and closed arms) [22]. The device was cleaned with 10% alcohol between each rat.

Morris Water Maze

To evaluate spatial reference memory in rats, we used the Morris Water Maze test [25]. The labyrinth was placed in a room with various additional visual cues such as geometric figures in different colors fixed on the outside part of the pool, which allow the animal to find its way into the space. The path taken by the animal in the pool is recorded using a video camera placed above it. The experimenter goes behind a curtain near the maze in the experiment room to control the recording of the video. The experiment was carried out for 4 consecutive days, each rat underwent a daily session of four tests (maximum 60s / test) with a 10 min delay between the tests during which the rat was dried and placed back in its cage. On the first day, the platform remained slightly visible above the surface of the water and then the next 3

days is immersed 1 cm below the surface. Each day, four starting points were possible (Northeast, South-East, North-West or South-West). Their sequence varied from one test to another and from one day to the next. At the beginning of each test, a rat was gently released into the pool facing the wall in one of the four starting positions (North, South, East, West). Once in the water, the rat swam to reach the platform and climbed above it for 10s before returning to its cage [26]. If the animal did not find the platform within 60s, it was guided to it by the experimenter and left there for 20 seconds. Then, the rat was lifted from the water and was moved to a new starting point [26]. On the fifth day, a 60s retention test called "probe test" was performed. The platform was removed from the pool and the time spent by the rat in NE quadrant containing the platform for the previous 4 days was calculated.

Study of hematological and biochemical parameters

Blood samples were collected in EDTA tubes for hematological analysis using HORIBA ABX Pentra XL80 cell counter. For biochemical analysis, blood samples were collected in heparin tubes. The parameters related to hepatic, renal, lipid and protein metabolisms and plasma iron measurement were measured using COBAS Integra 400 plus ROCHE®.

Quantitation of catecholamines by HPLC

The rats were sacrificed and the brains were taken away rapidly, washed with 0.9% NaCl, and then immediately stored at -80°C. Sample contents in catecholamines (dopamine, epinephrine and norepinephrine) were measured as previously described [27,28]. Briefly, brain samples were weighed and homogenized (1/10, w/v) in an extraction solution (20mM HEPES buffer, pH 7.2, containing 1mM EDTA and 0.1 M perchloric acid) using a hand-held sonicator (Sonics®). Yielded solutions were centrifuged at 15000g for 10 min at 4°C, and supernatants were kept at -80 °C until being assayed for catecholamines contents by HPLC with Coulometric Electrode Array Detector (ESA CoulArray®) using the ClinRep® HPLC Complete Kit for Catecholamines in Plasma. The limit of detection was 15 ng/L for dopamine and 8 ng/L for epinephrine and norepinephrine. Thirty five microliter samples were injected. The temperature applied on the system was 28°C. Tissue concentrations were determined by normalizing the quantified amounts of respective catecholamines to the corresponding weight of the individual tissue sample.

Tissue Iron contents

Iron levels in brain and liver were determined using a quadrupole ICP-MS Thermo X serie II (Thermo Electron, Bremen, Germany) equipped with quartz impact bead spray chamber and concentric nebulizer. The Xt interface and collision cell technology (CCT) options were used. Brain and liver were mineralized in HNO₃ and then diluted at 1:100 in water before the analysis. Standard solutions were prepared in nitric acid 1% (v/v). ⁵⁶Fe isotope was measured and ⁷¹Ga at 650 nmol/L was used as internal standard. The limit of detection and quantification was 10.2 nmol/L.

Histopathological study

For the histopathological examination, the tissue fragments of liver, lung and brain were washed with a 0.9% solution of sodium chloride. They were fixed with 10% formalin and then paraffin-included for histopathological analysis. The sections were cut about 5 μm thick, deparaffinized, hydrated, and stained with hematoxylin-eosin (H & E).

Statistical analysis

The study data were entered in a Microsoft Excel Spreadsheet. All the results are expressed as mean ± Standard Error to Mean (SEM). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests at a significance level of 5%.

Results

Fe₂O₃-NPs Characterization

Using TEM, Fe₂O₃-NPs show a spherical shape and an average size about 30 nm. Moreover, Energy dispersive X-ray (EDX) spectra of Fe₂O₃-NPs showed that there are no other elemental impurities present in these Fe₂O₃-NPs. In solution, the size of particles and their agglomerates were estimated by DLS, using Malvern Zetasizer Nano ZS and DTS Nano Software. This technique measures the Brownian motion of particles and relates it to the particle size. The mean hydrodynamic size was around 175 nm (Table 1).

No variation of catecholamines in rat brain following Fe₂O₃-NPs administration

Concentrations of monoamine neurotransmitters in brain homogenates were measured and are shown in Table 2. The differences between the two groups were not statistically significant.

Fe₂O₃-NPs sub-acute intravenous exposure does not impact iron content in liver but decreases iron content in brain

The determination of iron (Fe) in the liver showed no significant variations of the concentration of this element in the Fe₂O₃-NPs exposed group compared to the control. However, in the brain, the Fe₂O₃-NPs treatment significantly decreased the concentration of iron (Table 3).

Stable behavioral performances of rats following Fe₂O₃-NPs administration

Anxiety and emotional state

Anxiety and emotional state of rats were assessed using the elevated plus maze. The time spent inside the close arms or the open arms of the labyrinth (Figure 1.A) and the anxiety index (Figure 1.B) were not significantly affected by the Fe₂O₃-NPs exposure.

Spatial reference memory

We used the Morris water maze test to study the spatial reference memory. During the four training days, the averages of the performances obtained were calculated for control and Fe₂O₃-NPs groups. For each group, the escape latencies to reach the platform decreased over the course of acquisition training and there was not significantly different between the two groups (Figure 2.A). The probe test performed on the fifth day (seventh day after the last injection) of the Morris water maze showed no statistically significant differences in both groups (Figure 2.B).

Stable hematological and biochemical parameters except plasma iron level following Fe₂O₃-NPs administration

The measurements of hematological parameters in both groups showed that the concentration of white blood cells, red blood cells, hemoglobin and the percentage of hematocrit remained unchanged in Fe₂O₃-NPs group compared with control one (Table 4). Treated group by seven daily injections of Fe₂O₃-NPs (10 mg/kg, IV) did not show any changes of the transaminases and bilirubin, parameters related to the liver function. Interestingly, sub-acute exposure to Fe₂O₃-NPs did not modify the levels of iron, glucose, lipids, total proteins, urea and creatinine compared to control rats (Table 5).

No effects of Fe₂O₃-NPs on the body weight and the relative organ weight

No significant changes in the body weight gain and the relative organ weight were observed in the Fe₂O₃-NPs exposed rats compared to control group (Figure 3, Table 6). During the whole period of the experiment, the mean body weight of treated rats evolved similarly than the control group (Figure 3).

Fe₂O₃-NPs sub-acute intravenous exposure did not alter organ structure

The histopathological examination of the liver, lung and brain sections of control rats was normal. Sub-acute exposure to Fe₂O₃-NPs at 10 mg/kg did not affect the structure of any of the organs tested (Figure S1).

Discussion

With the increasing production and use of Fe₂O₃-NPs, human body may be voluntarily or involuntarily exposed to these nanoparticles via various possible routes among them the intravenous penetration [29]. Thus, Fe₂O₃-NPs may be distributed through the systemic circulation in several tissues including the brain. Interestingly, the intravenous pathway is considered as the most important route of administration to the body for the use of Iron Oxide Nanoparticles in Medicine. Young adult Wistar rats were intravenously injected daily with Fe₂O₃-NPs (10 mg/kg body weight) for seven successive days. Behavioral performances using neurobehavioral tests such as the elevated plus maze and Morris water maze, blood biochemistry, hematology, iron biodistribution, and histopathological modifications were investigated and no significant differences were observed in treated rats compared to controls. In addition, our findings indicated that Fe₂O₃-NPs exposure did not alter the general health of the animals during the experimental days. Fe₂O₃-NPs administration had no effect on the body weight or the relative weight of liver and kidney in comparison to control animals. In the conditions of our investigation, Fe₂O₃-NPs had no significant impact on anxiety-related behavior, spatio-temporal organization and memory. Those results are in concordance with our previous results that we found after intranasal instillations of the same type of NPs with the same dose and treatment duration. In contrast, Sheida et al. [30] showed that abdominal injection of Fe₂O₃-NPs increased rat's anxiety and fear, and decreased the locomotor activity of treated rats at dose of 14 mg/kg using the open field test. However, in Fe₂O₃-NPs treated rats; the distribution of iron in rat brain was altered. This finding disagree with the study of Sheida et al. as they reported significant increase of iron [30]. In our study, the decrease of

iron in the brain had no impact on rat behavior and cognitive capacities after Fe₂O₃-NPs injections. As a matter of interest, in 2014, Huang et al. [31] reported that iron in the brain could be a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. In 2018, Du et al. found that increased brain iron levels correlates with decreased cognitive function in Alzheimer's Disease [32]. Alteration of the normal expression of brain neurotransmitters is associated with human neurological disorders such as Parkinson's disease (PD) and depression [33]. Our results showed that sub-acute intravenous exposure to Fe₂O₃-NPs did not affect the cerebral content of catecholamines in the homogenate of rat brain. This suggests that in the conditions of our study, Fe₂O₃-NPs did not alter nor improve the neurotransmission that might explain the intact cognitive capacities of Fe₂O₃-NPs treated rats compared to controls. In contrast, in our last study using iron NPs by intranasal instillations, we observed a significant increase of dopamine and norepinephrine levels in treated rats, while the epinephrine level was not altered. Moreover, Umarao et al. [34] evidenced a neuroprotective effect of Fe₂O₃-NPs in 6-hydroxydopamine rat model of PD which is characterized by reduction in dopamine content. In fact, it has been reported that depression in PD is related to the loss of dopamine and norepinephrine innervations in the limbic system [35]. However, after exposure to very small size Fe₂O₃-NPs (10 nm), another team observed a significant decrease in striatal dopamine and its metabolites and dopaminergic terminal damage as well as damage to neuronal vasculature [36]. The disparities between these studies can be explained by the nanoparticle properties, the study design and the NPs administration route as underlined by Yarjanli et al. [7]. Blood cell count is used to monitor the hematological changes in the body caused by drugs or chemicals. In this study, seven days after the intravenous administration of Fe₂O₃-NPs, no changes were observed in hematological parameters. Thus our results suggest either Fe₂O₃-NPs safety or recovery after exposure arrest which somehow contrast with previous studies [14,20,37,38]. In our previous study, the major effect of those NPs on the hematological parameters was the increase of platelets count suggesting an inflammatory effect of those NPs. In particular, Park et al. [38] reported that a single intratracheal injection of Fe₂O₃-NPs in mice causes inflammatory responses, especially in the lung, manifested histologically by cell infiltration in the alveolar space and phagocytosis. Plasma bilirubin, ALP, ALT and AST levels increased in response to liver damage and are commonly evaluated in toxicity studies. Following Fe₂O₃-NPs intravenous administration, no changes were observed in these parameters. In contrast, Shirband et al. [19] noted a significant increase in the levels of liver enzymes (ALT, AST and ALP) suggesting destruction of liver cells and obstruction of biliary ducts. Sadeghi et al. [20]

also reported an increase in transaminases, but not in alkaline phosphatase activities after Fe₂O₃-NPs exposure. In our study, the other serum parameters such as protein and uric acid, glucose, triglycerides and cholesterol levels remained unchanged. Only the iron plasma level was decreased. This could be explained by the slight or transient inflammatory response of the rats after NP exposure. In fact it has been reported that in case of infection, there is stimulation of the immune system with macrophage activation which excessively use the plasma iron leading to iron sequestration in macrophages and decrease of plasma iron level [39–41]. The tissue organizations of the lung, liver and brain were not affected in our study. In contrast, after intranasal instillations of Fe₂O₃-NPs, we observed slight pathological liver modifications manifested by sinusoidal congestion and few lobular necro-inflammatory foci. Furthermore, Wang et al. demonstrated that inhalation of ferric oxide (Fe₂O₃) NPs at 8.5 mg/kg body weight caused histopathological damage to the rat lungs [17]. Similarly, Sadeghi et al. [20] reported nanoparticle dose-dependent pulmonary emphysema and inflammation in lungs after Fe₂O₃ NP administration. These discrepancies seem to be related to the particle's size and properties, to the aggregation/agglomeration behavior in the physiological medium as well as to the study designs and the measured parameters.

Conclusion

To conclude, the increasing production of NPs and their parallel increasing use in the industry, as well as their presence in foods, cosmetics and drugs, represent a research topic that is always growing and necessitate better evaluation of the risks to improve the safety of these NPs. In the conditions of our experiment, i.e. sub-acute intravenous administration of 10 mg/kg Fe₂O₃-NPs for 7 days followed by 7 days of washout appeared safe for Wistar rats as evidenced by the stability of blood cell count, liver function markers, neurotransmitter content in the brain, and iron distribution in liver. Interestingly, the neurobehavioral examination conducted shortly after the treatment arrest showed that intravenous exposure to Fe₂O₃-NPs did not affect the emotional status and the spatial reference memory. However, further studies are necessary to confirm the lack of side effects using other behavioral performance tests and/or longer exposure, and to identify potential biomarkers related to Fe₂O₃-NPs exposure in order to detect potential hazardous health effects. In addition, the use of Fe₂O₃-NPs as a drug delivery in the brain must be documented.

Declaration of interests

The authors report no conflicts of interest in this work.

Acknowledgments

We would like to thank Professor Lassaad El Mir for providing Iron Oxide Nanoparticles, Mr Abdessalem Kouki for the access to the Electron Microscopy and the equipex NanoID (ANR-10-EQPX-39) for the access to the nanoZS. Thanks also to Professor Nathalie Sturm and her team for their help in the histopathological examination.

Funding

This study was supported by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the Auvergne Rhone-Alpes Region (grant N° 16.007278.01 for Dalel Askri). Sylvia G. Lehmann received funding from Excellence Initiative of Aix-Marseille University – A*MIDEX, a French “Investissements d’Avenir” program, through its associated Labex SERENADE project”.

References

- [1] G. Oberdörster, Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: Concepts of nanotoxicology, in: *J. Intern. Med.*, 2010: pp. 89–105. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x.
- [2] V.A. Grover, J. Hu, K.E. Engates, H.J. Shipley, Adsorption and desorption of bivalent metals to hematite nanoparticles, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 86–92. doi:10.1002/etc.712.
- [3] Y.X.J. Wáng, J.-M. Idée, A comprehensive literatures update of clinical researches of superparamagnetic resonance iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging, *Quant. Imaging Med. Surg.* 7 (2017) 88–122. doi:10.21037/qims.2017.02.09.
- [4] I. Van Rooy, S. Cakir-Tascioglu, W.E. Hennink, G. Storm, R.M. Schiffelers, E. Mastrobattista, In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain, *Pharm. Res.* 28 (2011) 456–471. doi:10.1007/s11095-010-0291-7.
- [5] M. Simko, M.-O. Mattsson, Interactions Between Nanosized Materials and the Brain, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 4200–4214. doi:10.2174/0929867321666140716100449.
- [6] A.L. Cortajarena, D. Ortega, S.M. Ocampo, A. Gonzalez-García, P. Couleaud, R. Miranda, C. Belda-Iniesta, A. Ayuso-Sacido, Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings, *Nanobiomedicine*. 1 (2014) doi: 10.5772/58841. doi:10.5772/58841.
- [7] Z. Yarjanli, K. Ghaedi, A. Esmaeili, S. Rahgozar, A. Zarrabi, Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation, *BMC Neurosci.* 18 (2017) 51. doi:10.1186/s12868-017-0369-9.
- [8] Y. Kim, S.D. Kong, L.H. Chen, T.R. Pisanic, S. Jin, V.I. Shubayev, In vivo nanoneurotoxicity screening using oxidative stress and neuroinflammation paradigms, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9 (2013) 1057–1066. doi:10.1016/j.nano.2013.05.002.
- [9] Z. Sun, M. Worden, Y. Wroczynskyj, V. Yathindranath, J. van Lierop, T. Hegmann, D.W. Miller, Magnetic field enhanced convective diffusion of iron oxide nanoparticles in an osmotically disrupted cell culture model of the blood-brain barrier, *Int. J. Nanomedicine*. 9

(2014) 3013–3026. doi:10.2147/IJN.S62260.

[10] H.S. Huang, J.F. Hainfeld, Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia, *Int. J. Nanomedicine*. 8 (2013) 2521–2532. doi:10.2147/IJN.S43770.

[11] A. Elias, A. Tsourkas, Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles., *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. (2009) 720–726. doi:10.1182/asheducation-2009.1.720.

[12] M. Lu, M.H. Cohen, D. Rieves, R. Pazdur, FDA report: Ferumoxytol for intravenous iron therapy in adult patients with chronic kidney disease, *Am. J. Hematol.* 85 (2010) 315–319. doi:10.1002/ajh.21656.

[13] S. Announcement, FDA strengthens warnings and changes prescribing instructions to decrease the risk of serious allergic reactions with anemia drug Feraheme (ferumoxytol), (2015) 1–4.

[14] E. Kim, J.M. Kim, L. Kim, S.J. Choi, I.S. Park, J.Y. Han, Y.C. Chu, E.S. Choi, K. Na, S.-S. Hong, The effect of neutral-surface iron oxide nanoparticles on cellular uptake and signaling pathways, *Int. J. Nanomedicine*. Volume 11 (2016) 4595–4607. doi:10.2147/IJN.S110332.

[15] B. González-Flecha, Oxidant mechanisms in response to ambient air particles, *Mol. Aspects Med.* 25 (2004) 169–182. doi:10.1016/j.mam.2004.02.017.

[16] J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J.F. Heilier, M. Delos, M. Arras, A. Fonseca, J.B. Nagy, D. Lison, Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (2005) 221–231. doi:10.1016/j.taap.2005.01.008.

[17] L. Wang, L. Wang, W. Ding, F. Zhang, Acute Toxicity of Ferric Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Rats, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (2010) 8617–8624. doi:10.1166/jnn.2010.2483.

[18] S. Alarifi, D. Ali, S. Alkahtani, M.S. Alhader, Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line, *Biol. Trace Elem. Res.* 159 (2014) 416–424. doi:10.1007/s12011-014-9972-0.

[19] A. Shirband, H. Azizian, M. Pouretezari, M.E. Rezvani, M. Anvari, M.

Esmaeilidehaj, Dose-dependent effects of iron oxide nanoparticles on thyroid hormone concentrations in liver enzymes: Possible tissue destruction, *Glob. J. Med. Res. Stud.* 1 (2014) 28–31.

[20] L. Sadeghi, V. Yousefi Babadi, H.R. Espanani, Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue., *Bratisl. Lek. Listy.* 116 (2015) 373–8.

[21] O.M. Lemine, K. Omri, M. Iglesias, V. Velasco, P. Crespo, P. De La Presa, L. El Mir, H. Bouzid, A. Yousif, A. Al-Hajry, ??-Fe₂O₃by sol-gel with large nanoparticles size for magnetic hyperthermia application, *J. Alloys Compd.* 607 (2014) 125–131. doi:10.1016/j.jallcom.2014.04.002.

[22] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J. Neurosci. Methods.* 14 (1985) 149–167. doi:10.1016/0165-0270(85)90031-7.

[23] K. Maaroufi, M. Ammari, M. Jeljeli, V. Roy, M. Sakly, H. Abdelmelek, Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate., *Physiol. Behav.* 96 (2009) 343–349. doi:10.1016/j.physbeh.2008.10.019.

[24] D. Treit, J. Menard, C. Royan, Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44 (1993) 463–469. doi:10.1016/0091-3057(93)90492-C.

[25] R. Morris, Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat, *J. Neurosci. Methods.* 11 (1984) 7336–7336. doi:10.1016/016510270(84)9000714.

[26] J. Deguil, F. Chavant, C. Lafay-Chebassier, M.C. Pérault-Pochat, B. Fauconneau, S. Pain, Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP Parkinsonian mice, *Neurotox. Res.* 17 (2010) 142–155. doi:10.1007/s12640-009-9091-4.

[27] S. Amara, I. Ben-Slama, I. Mrad, N. Rihane, M. Jeljeli, L. El-Mir, K. Ben-Rhouma, W. Rachidi, M. Sève, H. Abdelmelek, M. Sakly, Acute exposure to zinc oxide nanoparticles does not affect the cognitive capacity and neurotransmitters levels in adult rats, *Nanotoxicology.* 8 (2014) 208–215. doi:10.3109/17435390.2013.879342.

[28] T. Enkel, S.M. Berger, K. Schöning, B. Tews, D. Bartsch, Reduced expression of nogo-

a leads to motivational deficits in rats., *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 1–7. doi:10.3389/fnbeh.2014.00010.

[29] C.S. Yah, S.E. Iyuke, G.S. Simate, A review of nanoparticles toxicity and their routes of exposures, *Iran. J. Pharm. Sci.* 8 (2012) 299–314. doi:10.5772/51230.

[30] E. Sheida, O. Sipailova, S. Miroshnikov, E. Sizova, S. Lebedev, E. Rusakova, S. Notova, The effect of iron nanoparticles on performance of cognitive tasks in rats, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 8700–8710. doi:10.1007/s11356-017-8531-6.

[31] X.T. Huang, Z.M. Qian, X. He, Q. Gong, K.C. Wu, L.R. Jiang, L.N. Lu, Z. jing Zhu, H.Y. Zhang, W.H. Yung, Y. Ke, Reducing iron in the brain: A novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*. 35 (2014) 1045–1054. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.004.

[32] M.G. Du L, Zhao Z, Cui A, Zhu Y, Zhang L, Liu J, Shi S, Fu C, Han X, Gao W, Song T, Xie L, Wang L, Sun S, Guo R, Increased Iron Deposition on Brain Quantitative Susceptibility Mapping Correlates with Decreased Cognitive Function in Alzheimer's Disease, *ACS Chem. Neurosci.* (2018). doi:10.1021/acscchemneuro.8b00194.

[33] A. Nieoullon, Dopamine and the regulation of cognition and attention, *Prog. Neurobiol.* 67 (2002) 53–83. doi:10.1016/S0301-0082(02)00011-4.

[34] P. Umarao, S. Bose, S. Bhattacharyya, A. Kumar, S. Jain, Neuroprotective Potential of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Along with Exposure to Electromagnetic Field in 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16 (2016) 261–269. doi:10.1166/jnn.2016.11103.

[35] P. Remy, M. Doder, A. Lees, N. Turjanski, D. Brooks, Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system, *Brain*. 128 (2005) 1314–1322. doi:10.1093/brain/awh445.

[36] S.Z. Imam, S.M. Lantz-McPeak, E. Cuevas, H. Rosas-Hernandez, S. Liachenko, Y. Zhang, S. Sarkar, J. Ramu, B.L. Robinson, Y. Jones, B. Gough, M.G. Paule, S.F. Ali, Z.K. Binienda, Iron Oxide Nanoparticles Induce Dopaminergic Damage: In vitro Pathways and In Vivo Imaging Reveals Mechanism of Neuronal Damage, *Mol. Neurobiol.* 52 (2015) 913–926. doi:10.1007/s12035-015-9259-2.

- [37] D.M. Hasan, M. Amans, T. Tihan, C. Hess, Y. Guo, S. Cha, H. Su, A.J. Martin, M.T. Lawton, E.A. Neuwelt, D.A. Saloner, W.L. Young, Ferumoxytol-Enhanced MRI to Image Inflammation Within Human Brain Arteriovenous Malformations: A Pilot Investigation, *Transl. Stroke Res.* 3 (2012) 166–173. doi:10.1007/s12975-012-0172-y.
- [38] E.-J. Park, H. Kim, Y. Kim, J. Yi, K. Choi, K. Park, Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice, *Toxicology*. 275 (2010) 65–71. doi:10.1016/j.tox.2010.06.002.
- [39] B.J. Cherayil, The role of iron in the immune response to bacterial infection, *Immunol. Res.* 50 (2011) 1–9. doi:10.1007/s12026-010-8199-1.
- [40] M.P. Soares, I. Hamza, Macrophages and Iron Metabolism, *Immunity*. 44 (2016) 492–504. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.016.
- [41] A. Willemetz, S. Beatty, E. Richer, A. Rubio, A. Auriac, R.J. Milkereit, O. Thibaudeau, S. Vaulont, D. Malo, F. Canonne-Hergaux, Iron- and hepcidin-independent downregulation of the iron exporter ferroportin in macrophages during *Salmonella* infection, *Front. Immunol.* 8 (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.00498.

Legends of Figures

Figure 1: Effects of Fe₂O₃-NPs injection (IV) for 7 consecutive days on time spent in the closed and open arms **(A)** and anxiety index **(B)** from the elevated plus maze. (The test was performed 24 hours after the last injection). Data expressed as means $\pm$ SEM, n=6 animals *per group*.

Figure 2: Effects of Fe₂O₃-NPs on the behavioral performances of rats evaluated by Morris water maze: **A)** Escape latency to reach the platform during acquisition after intravenous administration of Fe₂O₃-NPs and **B)** the percent of time spent in the area where the platform was located on the previous day. (The first test was performed 48 hours after the last injection). Data expressed as means $\pm$ SEM, n=6 animals *per group*.

Figure 3: Mean Body Weight changes of treated rats with Fe₂O₃-NPs at a dose of 10mg/kg (7 days of treatment and then 7 days after treatment). Data expressed as means $\pm$ SEM, n=6 animals *per group*.

Figure S1: Histopathology of brain (A, B), lung (C, D) and liver (E, F) tissues in rats treated intravenously with Fe₂O₃-NPs for 7 consecutive days compared to control rats. A, C and E represent control group showing normal structures. B, D and F represent treated group. Magnification: x200 for brain and liver; x100 for lung.

Legends of Tables

Table 1: Fe₂O₃-NPs characterization

Table 2: Effects of Fe₂O₃-NPs intravenous injection on the brain catecholamine content (nanomol/mg). Data expressed as means $\pm$ SEM with 6 animals *per group*.

Table 3: Effects of Fe₂O₃-NPs intravenous injection on iron contents in brain and liver. Data expressed as means $\pm$ SEM, n=6 animals *per group*.

Table 4: Effects of Fe₂O₃-NPs intravenous injection on hematological parameters. Data expressed as means $\pm$ SEM, n=6 animals *per group*. WBC white blood cells, RBC red blood

cells, MCV mean corpuscular volume, MCH mean corpuscular hemoglobin.

Table 5: Effects of Fe₂O₃-NPs intravenous injection on biochemical parameters. Data expressed as means ± SEM, n=6 animals *per* group. ALP alkaline phosphatase, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase.

Table 6: Relative Organ Weight changes in rats treated with Fe₂O₃-NPs at dose of 10mg/kg for seven consecutive days. Data obtained at day 14 expressed as means ± SEM, n=6 animals *per* group.

Figure 1

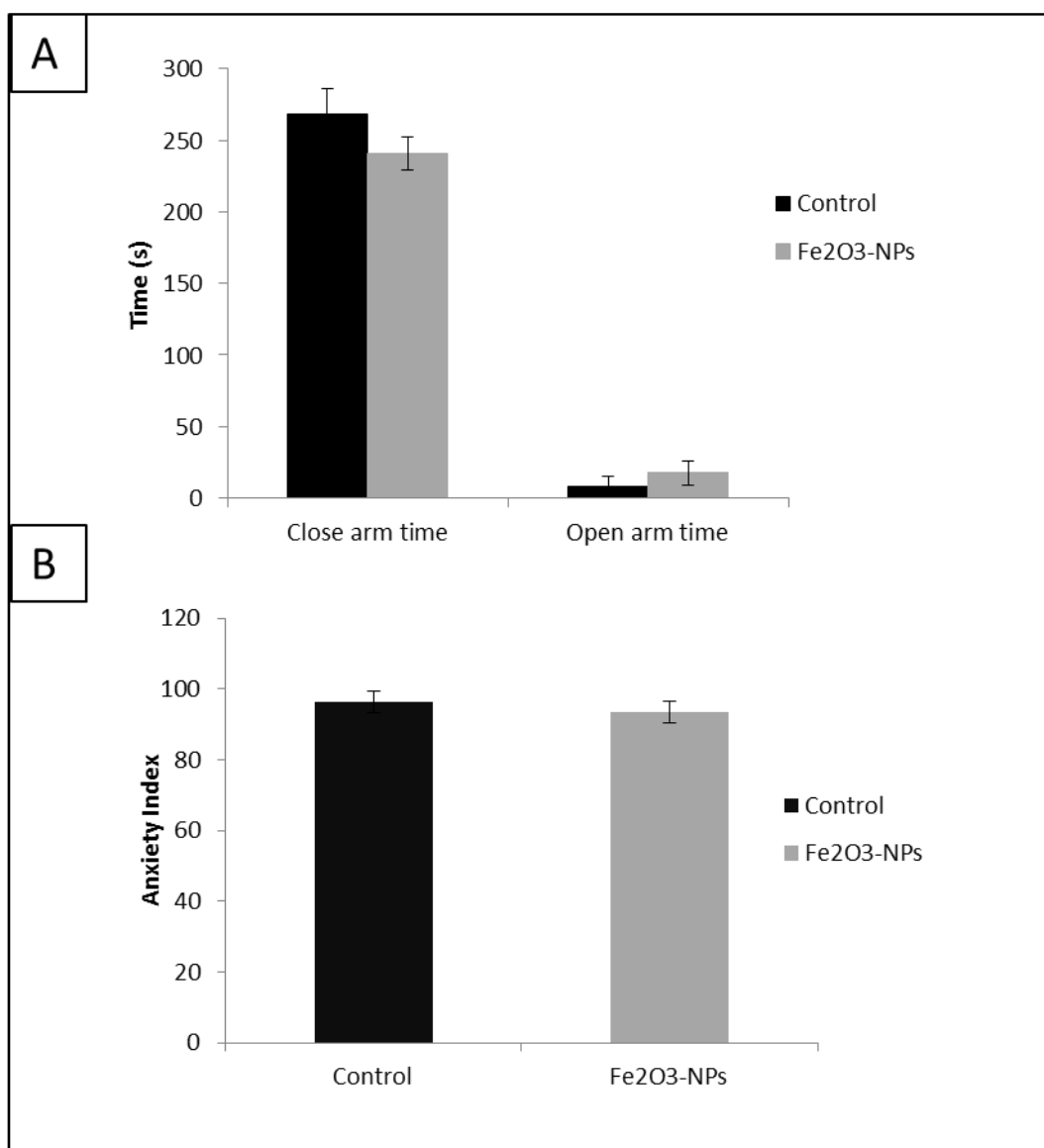


Figure 1: Effects of Fe₂O₃-NPs injection (IV) for 7 consecutive days on time spent in the closed and open arms (A) and anxiety index (B) from the elevated plus maze. (The test was performed 24 hours after the last injection). Data expressed as means ± SEM, n=6 animals *per group*

Figure 2

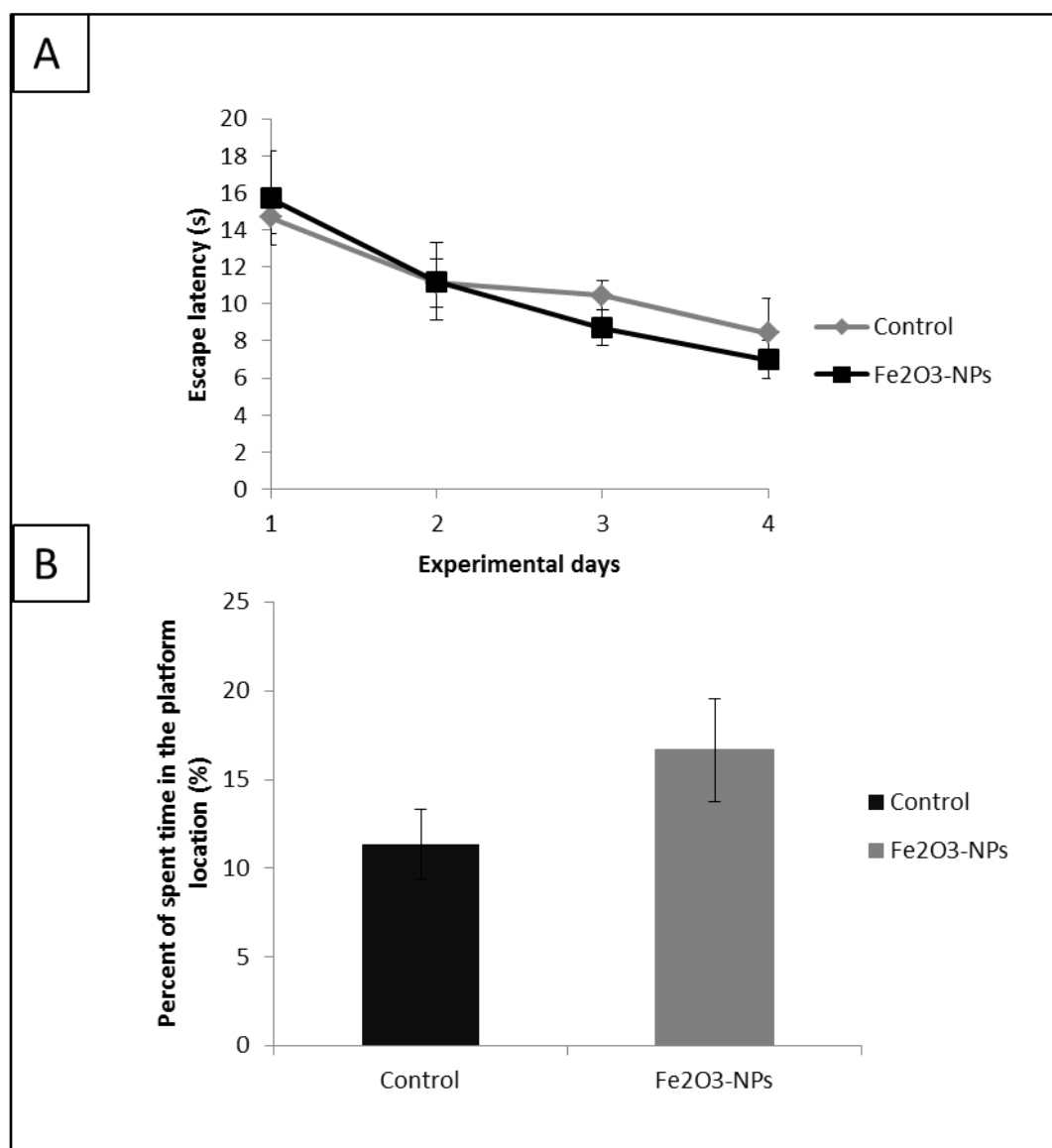


Figure 2: Effects of Fe₂O₃-NPs on the behavioral performances of rats evaluated by Morris water maze: **A)** Escape latency to reach the platform during acquisition after intravenous administration of Fe₂O₃-NPs and **B)** the percent of time spent in the area where the platform was located on the previous day. (The first test was performed 48 hours after the last injection). Data expressed as means $\pm$ SEM, n=6 animals *per group*

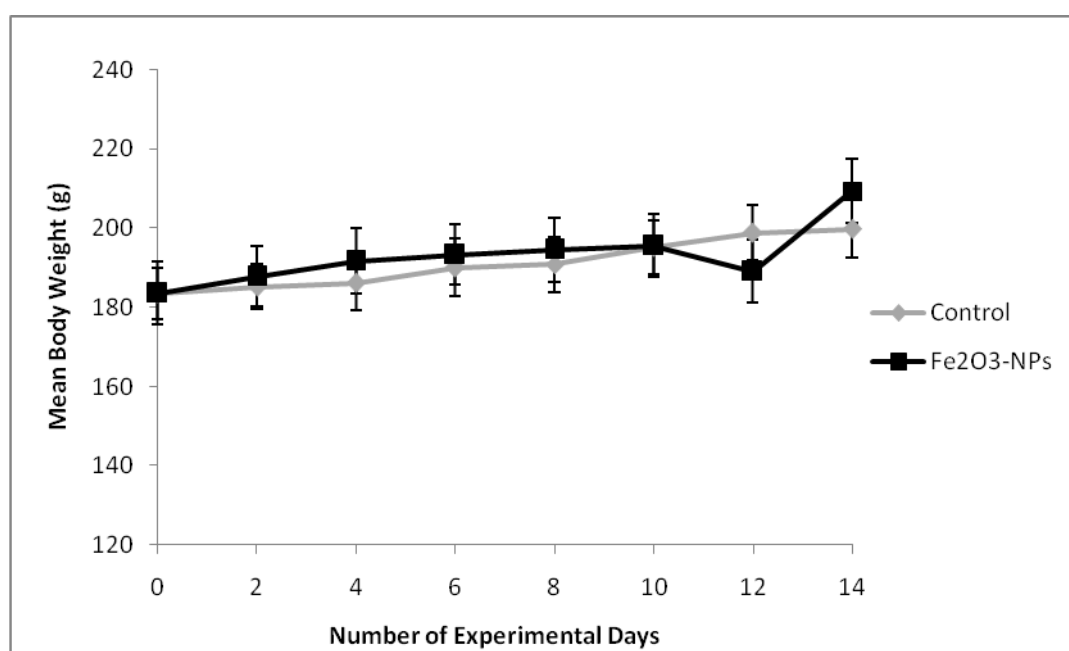
Figure 3

Figure 3: Mean Body Weight changes of treated rats with Fe₂O₃-NPs at dose of 10mg/kg (7 days of treatment and then 7 days after treatment). Data expressed as means $\pm$ SEM, n=6 animals *per* group

Figure S1

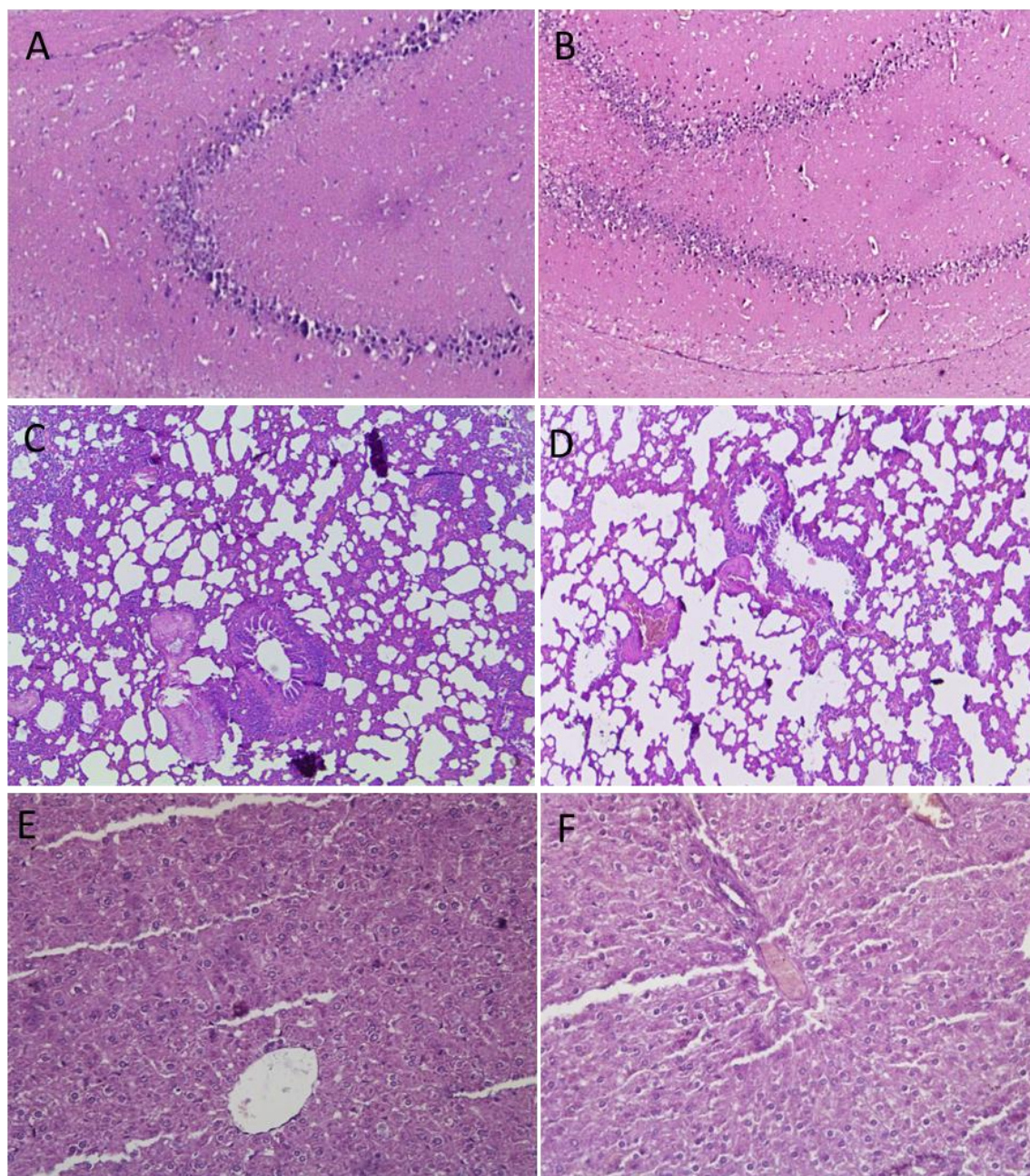


Figure S1: Histopathology of brain (A, B), lung (C, D) and liver (E, F) tissues in rats treated intravenously with Fe_2O_3 -NPs for 7 consecutive days compared to control rats. A, C and E represent control group showing normal structures. B, D and F represent treated group. Magnification: x200 for brain and liver; x100 for lung

Table 1

	Particle size (nm)	Hydrodynamic size (nm)	Pdl	Zeta Potential
Fe ₂ O ₃ -NPs	30	174.2	0.302	-10.6

Table 1: Fe₂O₃-NPs characterization

Table 2

	Dopamine (nanomol/mg)	Epinephrine (nanomol/mg)	Norepinephrine (nanomol/mg)
Control	120.48±21.98	11.13±1.69	601.43±105.64
Fe₂O₃-NPs	86.11±15.93	9.10±0.79	381.78±66.56
<i>p</i>-value	0.234	0.304	0.109

Table 2: Effects of Fe₂O₃-NPs intravenous injection on the brain catecholamine content (nanomol/mg). Data expressed as means ± SEM with 6 animals *per* group

Table 3

	Iron content (µg/g)	
	Brain	Liver
Control	83.6±4.34	275.0±33.20
Fe₂O₃-NPs	67.2±3.74	436.4±86.26
<i>p</i>-value	0.016*	0.111

Table 3: Effects of Fe₂O₃-NPs intravenous injection on iron contents in brain and liver. Data expressed as means ± SEM, n=6 animals *per* group

Table 4

	Control	Fe ₂ O ₃ -NPs	<i>p</i> -value
WBC 10 ⁹ /L	7.12±1.49	7.82±0.95	0.700
RBC 10 ¹² /L	7.33±0.43	7.43±0.23	0.842
Hemoglobing /dL	12.60±0.69	12.71±0.36	0.885
Hematocrit %	35.68±2.10	36.88±1.51	0.653
MCV fL	48.63±0.53	49.53±0.76	0.357
Platelets 10 ⁹ /L	654.83±117.5	763±74.53	0.454
Neutrophils %	1.51±0.42	1.58±0.21	0.905
Lymphocytes %	5.10±1.00	5.48±0.83	0.791
Monocytes %	0.27±0.11	0.33±0.08	0.672
Eosinophils %	0.20±0.05	0.20±0.05	0.982
Basophils %	0.020±0.007	0.013±0.004	0.555

Table 4: Effects of Fe₂O₃-NPs intravenous injection on hematological parameters. Data expressed as means ± SEM, n=6 animals *per* group. WBC white blood cells, RBC red blood cells, MCV mean corpuscular volume

Table 5

	Control	Fe ₂ O ₃ -NPs	<i>p</i> -value
ALP U/L	192.5±11.4	193.0±14.51	0.978
ALT U/L	64.50±3.64	65.66±5.35	0.860
AST U/L	173.5±27.75	216.0±28.04	0.306
Ironµmol/L	48.80±5.19	33.63±1.03	0.025*
Bilirubinµmol/L	0.66±0.21	0.50±0.22	0.599
Proteinsg/L	64±3.18	62±1.06	0.564
Triglyceridesmmol/L	1.30±0.17	1.23±0.24	0.818
Uricacid µmol/L	102.66±8.40	89.50±7.60	0.272
Ureammol/L	6.53±0.47	5.58±0.22	0.729
Cholesterolmmol/L	1.38±0.09	1.33±0.17	0.807
Creatinineµmol/L	17.33±0.84	16.16±1.01	0.397
Glucose mmol/L	8.75±0.52	10.37±0.97	0.174

Table 5: Effects of Fe₂O₃-NPs intravenous injection on biochemical parameters. Data expressed as means ± SEM, n=6 animals *per* group. ALP alkaline phosphatase, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase

Table 6

	Brain (mg/g)	Liver(mg/g)	Kidneys(mg/g)	Spleen (mg/g)	Lungs (mg/g)
Control	8.58±0.23	45.18±1.88	8.95±0.28	2.87±0.22	8.01±0.19
Fe₂O₃-NPs	8.94±0.42	46.50±0.95	8.40±0.23	2.89±0.12	7.53±0.41
p-value	0.476	0.544	0.162	0.938	0.311

Table 6: Relative Organ Weight changes in rats treated with Fe₂O₃-NPs at dose of 10mg/kg for seven consecutive days. Data obtained at day 14 expressed as means ± SEM, n=6 animals per group

4. Effets de l'administration orale des NPs de fer

Nous avons étudié l'effet d'une administration aiguë des NPs de fer par voie orale à deux doses différentes 100 et 200 mg/kg.

Les résultats de cette étude ont été soumis et sont en révision dans le journal : "Food and Chemical Toxicology"

a) Principaux résultats et discussion

D'après nos résultats, les NPs de fer n'ont aucun effet sur le poids des rats (Figure 34). En effet, le poids des rats traités par D1 et D2 évolue de la même façon que le poids des rats contrôles. Cependant, la variation du poids relatifs des organes est significativement différente par rapport aux témoins (Tableau 9). Les résultats obtenus suite à l'administration orale de point de vue effet sur le poids sont en accord avec les résultats qu'on a déjà obtenus avec l'administration par voie intraveineuse mais pas avec celle par voie intranasale. Ceci suggère l'élimination rapide des NPs de fer ingérées principalement par le foie ou le rein. La diminution du poids relatif des reins, des poumons et de l'estomac avec les deux doses de NPs de fer ingérées peut être expliquée par la perte des cellules ou bien l'hypotrophie de ces organes causée par les NPs de fer.

b) Conclusion

L'étude de la toxicité aiguë des NPs de fer a montré que celles-ci n'ont pas d'effets sur la cognition et l'émotion des rats, explorées par les tests de comportement. Cependant, au niveau hématologique et biochimique, l'administration par voie orale a induit des perturbations de certains paramètres dépendamment de la dose entre autre la polyglobulie et la diminution du fer plasmatique. La dose la plus faible (D1 à 100 mg/kg) semble avoir plus d'effets perturbateurs que la dose (D2 à 200 mg/kg). Ceci pourrait être expliqué par l'état d'agglomération ou d'agrégation lié à la quantité des NPs administrées et leur comportement dans le corps de l'animal. L'examen neurocomportemental mené le jour suivant le gavage a montré que l'exposition orale aux Fe_2O_3 -NPs n'affectait pas le statut émotionnel, exploratoire et la mémoire de référence spatiale. Ainsi, l'utilisation des NPs de fer dans les aliments devrait être plus étudiée pour mieux évaluer les risques toxiques de l'exposition orale aux NPs.

c) Article IV

Nanoparticles in foods? A Multiscale physiopathological investigation of Iron Oxide Nanoparticle effects on Rats after an acute oral exposure: trace element biodistribution and cognitive capacities

Dalel Askri^{1,2,3,4*}, Souhir Ouni⁴, Said Galai⁵, Benoit Chovelon^{3,6}, Josiane Arnaud^{2,3}, Nathalie Sturm⁷, Sylvia G. Lehmann^{1,2,3,8}, Mohsen Sakly⁴, Salem Amara⁴, and Michel Sève^{1,2,3}

1. Grenoble Alpes University, PROMETHEE Proteomic Platform, BEeSy, Grenoble, France
2. LBFA Inserm U1055, BEeSy, Grenoble, France
3. Institut de Biologie et Pathologie, CHU de Grenoble Alpes, France
4. Carthage University, College of Sciences of Bizerte, Unit of Research in Integrated Physiology, Bizerte, Tunisia
5. University of Tunis El Manar, Laboratory of Clinical Biology, National Institute of Neurology, Tunis, Tunisia
6. University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France
7. Department of Pathological Anatomy and Cytology, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France
8. Univ. Grenoble Alpes, Univ. Savoie Mont Blanc, CNRS, IRD, IFSTTAR, ISTerre, 38000 Grenoble, France

*Corresponding Author: Dr. Dalel Askri, Plateforme de Protéomique Promethee-IBP-CHU Grenobles Alpes-Grenoble-FRANCE, email address: dalel.askri@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) are used in several fields of application, mainly in the biomedical field for their magnetic properties and in food additive known as “E172” for their colour. In the present investigation, we focused on IONP effects on Wistar rat following acute oral exposure. We performed a multiscale physiopathological investigation in order to elucidate potential toxic effects linked to IONP ingestion, especially on cognitive capacities, trace element distribution, blood constituents, organ functions, organ structure and iron deposit. We demonstrated that oral exposure to IONPs induces disturbances of certain parameters depending on the dose. Interestingly, the histopathological examination evidenced inflammatory effects of IONPs in the liver with iron deposits in hepatocytes and Kupffer cells. Neurobehavioral examination showed that oral exposure to IONPs did not affect nor rat emotions, exploration and locomotion capacities, nor spatial reference memory status. Furthermore, oral administration of IONPs did not disrupt the trace element homeostasis nor in the liver neither in the stomach. All together, our study evidenced low signs of toxicity, but some effects lead us to a careful use of these NPs. Thereby, their use in foods should be further studied to better evaluate the potential toxic risks of the oral exposure to IONPs.

Keywords: Iron Oxide Nanoparticles; rat; oral gavage; physiopathology; toxicity

Highlights

- The study was conducted to evaluate the impact of acute oral exposure to Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) in rat
- Ingested IONPs induced haematological and biochemical disturbances
- No effects of ingested IONPs were evidenced on cognitive capacities
- Trace element homeostasis was maintained following IONP ingestion
- Ingested IONPs induced inflammatory response and iron deposits in the liver

Introduction

Nanoscience and nanotechnology present a scientific revolution that began in the 1960s (Yah, Iyuke and Simate, 2012). The "Nanoworld" includes any object of nanometric size with interesting physicochemical properties that can be used in various fields, including industrial food, cosmetics or electronics, environment and biomedicine (Cortajarena et al., 2014; Yoshioka et al., 2014; Gupta et al., 2018). The design of nanoparticles focused on therapeutic and diagnostic applications has increased exponentially for the treatment of several chronic diseases, particularly cancer. The NPs are smart carriers, able to diagnose, deliver and monitor the therapeutic response in real-time and appear as promising tools in medicine. Metal nanoparticles (NPs) are the most widely used and are of most interest in various applications, as in scientific research essentially because of their properties, in particular on their composition. Thus, some types, such as titanium dioxide (TiO₂) and zinc oxide (ZnO) NPs are used in sunscreens for their UV absorption properties (Raj et al., 2012). Silver NPs have been extensively studied and used in food industry and medicine because of their broad-spectrum antimicrobial activity against microorganisms (Huang et al., 2018). Iron oxide NPs (Fe₂O₃ and Fe₃O₄) are used in several fields of application, but mainly in the biomedical field for their magnetic properties that give them interesting properties for fighting against cancer or in food additive known as "E172" for their colour. This additive is used worldwide for cake and dessert mixes, meat paste, salmon and shrimp paste preparations. Therefore, these NPs could be found everywhere, in the air, in drinking water, in food, in products for everyday use. They can be inhaled, ingested or absorbed by the body through the skin and mucous membranes (Ai et al., 2011). Not only humans can be impacted by nanotechnology, but the environment too. The nanoparticles can be released into the air, water, and soil systems as waste and therefore contaminate all the food chain (Gupta et al., 2018). Since their emergence, nanotechnologies, especially NPs uses, have raised many questions about their risks. Indeed, due to their high reactivity, NPs pose a potential risk to human health. Several products and medicines in the global market contain "nano" ingredients, mainly metallic NPs (Titanium, Silica, Iron...). Several investigations reported that these NPs have the ability to cross the barriers of the skin and biological membranes to reach the level of vital organs, including the brain (Lashof-Sullivan et al., 2014; Maher et al., 2016). Similarly, several deleterious effects have been reported, such as inflammatory syndrome, oxidative stress, DNA damage and cognitive disturbances (Babadi et al., 2012; Barhoumi and Dewez, 2013; Huang et al., 2014; Sadeghi, Yousefi Babadi and Espanani, 2015; Sheida et al., 2017). However, to date, and despite

numerous investigations by worldwide researchers, the effects of NPs or the mechanisms by which NPs can interact in the body are not fully understood. Interestingly, in 2015, the European Food Safety Authority (EFSA) published a report on “the scientific opinion on the re-evaluation of iron oxides and hydroxides (E172) as food additives”. They concluded that an adequate assessment of the safety of E172 could not be carried out because a sufficient biological and toxicological database was not available (Opinion, 2015). In this context, new multiscale surveys and new advanced studies are necessary to evaluate the "nano" risk of the "nano products" ingested, whose presence in the food and medication markets increases from one year to another. In this way, the Lowest Observed Effect Level (LOEL) dose must be urgently defined. Therefore, we conducted a new *in vivo* study, taking the Wistar Rat as a model, to evaluate the potential acute toxicity of IONPs at different scales: Rat health and body weight, cognitive capacities, metal biodistribution, blood count, and organ function and structure.

Material and Methods

- Iron Oxide Nanoparticle synthesis

For the present study, IONPs were kindly provided by Pr. Lassaad El Mir from the Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials applied to the Environment at the Faculty of Sciences of Gabès, Tunisia. The modified sol-gel method described previously (Lemine et al., 2014) was used to prepare the suspensions of IONPs, precisely maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), under supercritical conditions of ethyl alcohol, in which the hydrolysis proceeded slowly to release water mixture by an esterification reaction in order to control the size of the nanoparticles formed. An amount of 6 g of iron (III) acetylacetonate [$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FeO}_6$] was used as a precursor of the synthesis and was dissolved in 36 mL of methanol. The solution was incubated and dried in an autoclave after magnetic agitation under supercritical conditions of ethyl alcohol: $T_c = 243\text{ }^\circ\text{C}$ and $P_c = 63.3\text{ bar}$. Autoclave heating was provided by a furnace controlled by a temperature controller. The particle size could be adjusted by variation of magnetic stirring time.

- Iron Oxide Nanoparticle characterization

Before performing any nanotoxicological study, nanoparticle characterization represents a primordial step to understand their effects on the studied organism. To characterize the IONPs, we used three different techniques: Transmission Electron Microscopy (TEM) and X-

ray diffraction (XRD) for the powder and Dynamic Light Scattering (DLS) for the suspension. The XRD provides information on size and crystallized structure of the NPs. This technique was performed using the PANalytical Xpert Pro diffractometer with Cu k radiation ($k = 1.54178 \text{ \AA}$) in the range of $2\theta = 20\text{-}70\%$ at the 0.02 degree. The size and shape of IONPs were determined by a JEOL transmission electron microscope (JEM-2100F) operating at 200 keV .

For the suspension characterization, a stock solution of 5 mg / mL of IONPs in sterile water was prepared to make a range of cell treatment concentrations. In suspension, IONPs were sonicated by the sonicator Sonics® for 60 min with 1 min ON and 1 min OFF and then dispersed in an ultrasonic bath for 60 min immediately before use. This suspension was diluted $1:100$ in water to characterize the IONPs in suspension by the Dynamic Light Scattering (DLS) technique using a Zetasizer Nano (Malvern)™. This technique allows us to measure the hydrodynamic diameter and the z-potential of the NPs in solution and to study their dispersion state.

- Animal housing and exposure route

Young adult Wistar rats (9 weeks old) used in this study were purchased from SIPHAT (Ben Arous, Tunisia) and weighed $120\text{-}130 \text{ g}$ at the beginning of the experiment. They were randomly divided into 3 groups, one control and two treated with $n=7$ each. The two treated groups received 100 and 200 mg/kg of $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NPs}$ respectively once by oral gavage. IONPs were suspended in pure water and then sonicated for 60 min in a hand-held sonicator (Sonics®). Before each administration, the solution was also vortexed for 1 min . Control rats received water. The animals were housed under suitable conditions of temperature (25°C) and light ($12:12$ hours light / dark cycle) and they received water and food ad libitum. The experimental protocols were approved by the Medical Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of Pasteur Institute of Tunis and the Faculty of Sciences of Bizerte (approval number: LNFP/Pro 152012). Before being sacrificed, the rats were anesthetised. The sacrifice was performed 10 days after the oral gavage and different organs (liver, kidneys, spleen, lungs and brain) were extracted for analyses and calculation of relative organ / body weight ratio (mg / g).

- Cognitive capacities investigation

Twenty four hours after the acute oral administration of IONPs, three behavioural tests were performed to evaluate the effects of these NPs on emotional state, locomotion and exploration, learning and memory performances in rats:

Elevated Plus Maze

The first test was the elevated plus maze and was used as described before (Pellow et al., 1985; Maaroufi et al., 2009). Briefly, the maze consists of four arms of 50 cm long and 10 cm wide, opposite one another in pairs, and connected by a central platform. The device was raised to a height of 60 cm. The closed arms were surrounded by a 50 cm wall, while the edges of the open arms were 0.5 cm in order to favour entry into the open arms (Treit, Menard and Royan, 1993). The test was of 5 min and we started by placing a rat in the centre of the labyrinth, facing an open arm. The rat explored the device freely. Thus, the number of entries and the time spent in the different parts of the labyrinth (the open arms, the closed arms and the central part) were recorded using a video camera placed above the device. The percentage reflecting anxiety status of the rats, also known as anxiety index, was calculated by the following formula (time spent in closed arms x 100 / time spent in open and closed arms) (Pellow et al., 1985). Between each rat, the device was cleaned with 10% alcohol.

Open Field

Exploratory behaviour, motor activity and anxiety were evaluated by the open field test. Control rats and rats treated with IONPs were tested for a daily observation session of 5 min for three consecutive days with a 24-hour interval. The device was a metal-gray colored enclosure with a circular shape. It was divided into seven sectors: a central sector and six peripheral sectors that were all of equal size. Three identical objects were placed in the same position in the peripheral part during the 3 days. At the beginning of the test, the rat was placed in a peripheral part. Different behavioural parameters were measured such as the number of sectors crossed and the time spent in the peripheral part and the central part, the total immobility time, the number of contacts with an object. Between each rat, the device and the objects were cleaned with 10% alcohol.

Morris Water Maze

The Morris water maze test (Morris, 1984) was performed to evaluate the spatial reference memory in rats. The experimental device of the test was a circular pool filled to a depth of 30 cm with water ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) which was rendered opaque by the addition of 2 kg of black plastic pellets (Maaroufi et al., 2014). A polystyrene platform (diameter 10 cm) was placed in the centre of the Northeast quadrant inside the device. The pool was placed in a room with various additional visual cues such as geometric figures in different colours fixed on the outside part of the pool, which helped the animal to find its way into the space. The trajectory taken by the animal in the pool was recorded using a video camera placed above it. The experimenter stayed behind a curtain near the maze in the experiment room to control the recording of the video. The experiment of the Morris Water Maze was carried out for 4 consecutive days, each rat underwent a daily session of four tests (maximum 60s / test). A 10 min delay was applied between the tests. During it the rat was dried and placed back in its cage. During the first day assays, the platform remained slightly visible above the surface of the water and then the next 3 days was immersed 1 cm below the surface. Each day, four starting points were possible (Northeast, South-East, North-West or South-West). Their sequence varied from one test to another and from one day to the next. At the beginning of each test, a rat was gently released into the pool facing the wall in one of the four starting positions (North, South, East, and West). Once in water, the rat swam to reach the platform and climbed above it for 10s before returning to its cage (Deguil et al., 2010). If the animal did not find the platform for 60s, it was guided to it by the experimenter and left there for 20 seconds. Then, the rat was lifted from the water and was moved to a new starting point. Twenty four hours after the 4th day, a 60s retention test called "probe test" was performed. During this test, the platform was removed from the pool and the time spent by the rat in Northeast quadrant containing the platform for the previous 4 days was calculated.

- Trace element biodistribution

Different trace elements, Iron (Fe), Copper (Cu), Manganese (Mn) and Zinc (Zn) were determined using a quadrupole ICP-MS Thermo X serie II (Thermo Electron, Bremen, Germany) equipped with quartz impact bead spray chamber and concentric nebulizer. The Xt interface and collision cell technology options were used. Liver and stomach were mineralized in HNO_3 and then diluted at 1:100 in water before the analysis. Standard solutions were prepared in nitric acid 1% (v/v). ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{55}Mn , ^{64}Zn , and ^{66}Zn

isotopes were measured and ^{71}Ga at 650 nmol/L was used as internal standard. The limits of detection and quantification of the apparatus were 10.2 nmol/L for Fe, 32.7 nmol/L for Cu, 0.96 nmol/L for Mn, and 15.5 nmol/L for Zn.

- Blood count and biochemistry assays

Blood count is used by several scientists to evaluate the toxic effects of a product or a medicine at the level of blood cells and contents. Blood samples were collected in tubes for haematological analysis containing EDTA as anticlot using HORIBA ABX Pentra XL80 cell counter. Biomarkers of organ functions inform also about dysfunction or activity following exposure to any chemicals or products that could affect the organism. For biochemical analysis and iron plasma measurement, blood samples were also collected in heparinised tubes. The parameters related to hepatic and renal functions, and to lipid and protein metabolisms as well as the iron levels were measured using COBAS Integra 400 plus ROCHE®.

- Histopathological examination

For the histopathological examination, the tissue fragments of liver were washed with a 0.9% solution of sodium chloride. They were fixed with 10% formalin and then paraffin-included for histopathological analysis. The sections were cut about 5µm thick, deparaffinised, hydrated, and stained with haematoxylin-eosin (H & E).

- Perl's stain for iron deposit detection

Iron deposit in the liver was assigned by the specific iron staining known as Perl's blue stain.

We used the same preparation protocol as for the histopathological examination. The sections were stained with Perl's blue.

- Statistical analyses

All results were entered in a Microsoft Excel Spreadsheet. In the present paper, the results are expressed as mean $\pm$ Standard Error to Mean (SEM). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests at a significance level of 5%.

Results

- Characteristics of IONPs used in the study

The techniques we used for the characterisation gave us different required information about the IONPs as mentioned in Table 1. As powder, they had a spherical shape with an average size of 30 nm. However, the DLS showed that these NPs had a hydrodynamic size much higher than 30 nm when they were in suspension (~175nm). The z-potential was negative and the PDI (Polydispersity Index) was inferior to 0.5.

- Effects on the average weight of rats and the relative weight of organs

Our results showed that IONPs had no effect on rat weight (Figure 1). Indeed, the weight of the rats treated with D1 (100 mg/ kg) and D2 (200 mg/ kg) evolved in the same way as the weight of the control rats. However, the variation of the relative weight of the organs was significantly different compared to the controls except for spleen (Table 2). In fact, oral administration of IONPs at 200 mg/ kg (D2) decreased significantly the relative organ weight of brain, kidneys, lung, and stomach compared to control group. The lowest dose decreased only the relative weights of kidneys, lung, and stomach.

- Effects on haematological and biochemical parameters

The study of haematological and biochemical parameters showed that single doses of 100 and 200 mg / kg of IONPs significantly impacted these parameters. The lower dose (100 mg / kg) induced, on the one hand, an increase in red blood cell, haemoglobin, haematocrit and eosinophil levels and, on the other hand, a decrease in the number of neutrophils (Table 3). Following the dose of 200 mg/kg, we noted an elevation in haemoglobin and haematocrit levels. Similarly, IONPs slightly modified the biochemical parameters of rats (Table 4). Following exposure to D1, we evidenced a decrease in iron levels with an increase in urea level. However, D2 induced an increase in alanine aminotransferase (ALT) and a decrease in iron concentrations compared to control.

- Effects on behaviour

No effects on rat emotions and anxiety

The behavioural performances measured by the elevated plus maze test showed that both rat groups exposed to IONPs showed no significant changes in comparison to the control group. Indeed, the time spent in the closed arms, the time spent in open arms and the number of entry into these arms were similar to those of the control group. Thus, the treated groups had an anxiety index similar to that of the control rats (Figures 2 and 3).

No effects on rat exploration and locomotion capacities

The Open field was used to evaluate the exploratory behaviour of rats during 3 sessions. Following acute exposure to IONPs, no significant effects were found (Tables 5 and 6). This proves that IONPs had no impact on exploratory behaviour, locomotion or anxiety in the rat.

Stable learning and memory capacities

The performances of rats related to learning and memory were studied by the Morris water maze test. This test showed that there was no difference in learning between control and exposed rats (to D1 and D2). Indeed the swimming time to reach the platform was not significantly different between both treated groups and the untreated group. Swimming time in the area where the platform was deposited for the first 4 days remained also unchanged. This shows that iron NPs did not induce disturbances in memory or learning of rats (Figure 4).

- Effects on homeostasis of trace elements in the liver and stomach

The trace element Fe, Mn, Zn and Cu were measured in the liver (Table 7) and in the stomach (Table 8) by ICP-MS. The results showed that the acute oral exposure to IONPs had no impact on the distribution of Fe, Mn, Zn and Cu elements neither at the hepatic nor stomach level since there was no increase or decrease in their respective levels.

- Modification of liver structure and iron deposit

The histopathological examination showed several aspects of liver inflammation and necrosis following the acute oral administration of IONPs at both doses of 100 and 200 mg/kg (Figure 5). Perl's blue staining revealed deposits of iron in the Kuppfer cells and in hepatocytes' nuclei (Figure 6).

Discussion

The effects of nanoparticles (NPs) have been the subject of several *in vivo* toxicological studies. The effects on the nervous system have been investigated recently after administration of some types of NPs (Valdiglesias et al., 2016; Patel et al., 2017; Liu et al., 2018). In fact, data on nanoparticle effects on the nervous system, including brain trace elements levels, as well as cognition capacities, attracted the attention of scientists and civil society. Thus, we took into account these parameters to establish a new overall pathophysiological study following an acute exposure to IONPs at two doses 100 and 200

mg/kg. Those doses were fixed according to a large research in literature. We selected a dose largely under the lethal oral dose 2000 mg/kg as mentioned by Yun et al., (Yun et al., 2015). as we aimed to study metabolic and functional effects and not the mortality of the rats.

The techniques used to characterise the IONPs administered to Wistar rats in the present work showed that our nanoparticles were pure; no other elements were found as contamination with iron. The hydrodynamic size of the IONPs was higher than the powder size (30 vs 174.2 nm). This could be explained by the agglomeration for IONPs as they exhibit magnetic forces and they tend to agglomerate. Nevertheless, the measurement of z-potential and the PdI prove the good dispersity status of the particles in water. Moreover, it is quite difficult to estimate the agglomeration of the IONPs once they are in the body.

Our results indicated that acute oral exposure to iron NPs by gavage did not affect the overall health of the animals as no signs of toxicity or mortality were observed. Furthermore, no effects were observed on rats' body weight. The results obtained after unique oral administration in terms of effect on weight are in agreement with our previous results obtained with intravenous administration (Askri et al., 2018 (2)) but not with intranasal administration (Askri et al., 2018 (1)). Nevertheless, the IONPs administered by the oral route significantly decreased the relative weight of certain organs such as brain, liver, kidneys, lungs, and stomach following the ingestion of iron NPs. These results are consistent with those obtained by Szalay et al., (Szalay et al., 2012). This decrease in organ coefficients indicates a systemic action of iron NPs and may reflect a potential toxicity of these NPs. The reduction in the relative weight of the kidneys, lungs and stomach with the two doses of ingested IONPs could be explained by the loss of cells or the hypotrophy of these organs caused by the administered NPs.

The increase in blood constituents suggests a systemic effect of iron oxide NPs mainly in the bone marrow during the process of haematopoiesis following iron overload. According to the biochemical assays, administration of IONPs induced ALT disruption depending on the dose used without modification of other enzymes. This result was unexpected since it is known that following exposure to NPs, liver enzymes are usually over-expressed. The same result was, however, reported by Abdelhakim et al., in 2013 (Abdelhalim and Moussa, 2013) after intraperitoneal administration of gold NPs (50 nm) for 3 successive days. In our experiments, ALT activity was unchanged using D1 whereas D2 increased ALT activity. This suggests that the administration of oral NPs of iron disrupts liver function only at the highest dose or that

the delay between iron NPs and ALT measurement was sufficient to restore the enzyme activities. The effects of IONPs on liver had been demonstrated earlier with other routes by biochemical tests and histopathological examination. In the present study, the histopathological examination showed liver inflammation and necrosis following the acute oral administration of IONPs at both administered doses. These findings are in concordance with our previous observations after a subacute intranasal administration of IONPs (Askri et al., 2018 (1)). Interesting, we evidenced iron deposits in the Kupffer cells and in hepatocytes' nuclei using Perl's blue staining with both doses. This proves that even after a unique exposure at a dose largely lower than the lethal dose, IONPs could induce inflammation and necrosis and could be accumulated locally in the liver without significant overall increase in hepatic iron concentration as demonstrated by ICP-MS measurements.

Regarding the distribution of trace elements in the organs, we found a stability of Mn, Zn, Cu and Fe in the liver and stomach. Similarly, Chua and Morgan reported no change in manganese levels in the liver after oral iron overload (Chua and Morgan, 1996). Our results disagree with those of Vayenas et al., who reported an increase in Fe, Mn and Zn levels in the liver after iron overload (Vayenas et al., 1998). In addition, in the study performed by Sheida et al., intraperitoneal injection of iron NPs was accompanied by significant changes in trace element concentrations in the brain, 7 days after injection (Sheida et al., 2017). The increase in iron was associated with a decrease in Zn, Cu and Mn relative to controls. The effects on trace element biodistribution depend mostly on the dose, the duration of overload, the study design as well as the administration route as underlined by our previous studies (Askri et al., 2018 (1, 2)).

To explore the cognitive function and cerebral effects of IONPs, we performed various behaviour tests that cover anxiety, locomotion, exploration, learning, and memory. Iron Oxide NPs had no impact on the cognitive performance of Wistar rats. Indeed, using the elevated plus maze no significant effect was found on behaviour related to emotions or more specifically to anxiety. This result has already been evidenced by two other routes of IONPs administration (Askri et al., 2018 (1, 2)) and has been demonstrated with other NPs (Amara et al., 2014, 2015; Slama et al., 2015; Younes et al., 2015). In contrast, Sheida et al., using the "Open field" test, showed that intraperitoneal administration of IONPs increased anxiety and fear in rats and decreased locomotor activity in rats treated at a dose of 14 mg/kg (Sheida et al., 2017). In addition, experiments with Morris water maze test demonstrated that rats' exposure to IONPs did not alter spatial learning and memory. Control and treated rats were

able to improve their performance during tests in the same way, suggesting similar cognitive flexibility. Interestingly, in 2018, Du et al., evidenced that increased levels of brain iron correlated with decreased cognitive function in Alzheimer's disease (Du et al., 2018). Thus, the unchanged cognitive capacity observed in the present study could be related to the stability of iron in the brain following the acute oral administration of IONPs. Moreover, it has been reported that a decrease in Zn levels in brain may be considered as one of the mechanisms of disorders related to higher nerve activity, namely cognitive decline, impaired memory and changes in motor activity (Sheida et al., 2017). To sum up, we may hypothesize that the stability of behaviour and cognitive abilities of rats after exposure to iron NPs observed in our study might be related to the stable concentration of this trace element in the brain.

As a mineral, iron is known to be more toxic when administered intravenously. Intramuscular injections are less toxic, and oral iron is the least toxic, probably because the amount of iron absorbed orally is not equal to 100% of the ingested dose. However, we showed that when iron is in nanoparticulate form, the intravenous route seems to be safer than oral and intranasal administrations (Askri et al., 2018 (1, 2)). Additionally, in the case of oral administration, the effects of NPs were more pronounced at the hepatic and stomach levels compared to intranasal administration.

Conclusions

Our findings contribute to an accumulating body of evidence showing that used NPs are not completely safe. The unique oral administration of IONPs has shown that they have no major effects on Wistar rats' health. The neurobehavioral examination conducted the day after gavage showed that oral exposure to IONPs did not affect nor rat emotions, exploration and locomotion, nor the spatial reference memory status. However, at the haematological and biochemical levels, oral administration of IONPs induces disturbances of certain parameters depending on the dose, among others polycythaemia and the decrease in plasma iron concentrations. The lowest dose (D1 at 100 mg/kg) appears to have more disruptive effects than the highest dose (D2 at 200 mg/kg). This could be explained by the state of agglomeration or aggregation related to the amount of NPs administered and their behaviour in the body of the animal. The histopathological examination evidenced inflammatory effects of IONPs on the liver with iron deposits in hepatocytes and Kupffer cells 10 days after the administration. Finally, oral administration of IONPs did not disrupt the trace element

homeostasis. Although the effects remain of relative toxicity, some hematological and hepatic effects are to be studied over a longer (chronic) duration of exposure and could be responsible for much more serious long-term toxic effects. Thus, the oral ingestion of iron NPs should be further studied and well documented to better evaluate both the acute and chronic toxic risks of oral exposure to NPs by nutrition, medication and intoxication and to define the LOEL and NOEL (No Observed Effect Level) doses for Human.

Declaration of interests

The authors report no conflicts of interest in this work.

Acknowledgments

Thanks to Professor Lassaad El Mir for providing Iron Oxide Nanoparticles, Mr Abdessalem Kouki for the access to the Electron Microscopy and the equipex NanoID (ANR-10-EQPX-39) for the access to the nanoZS.

Funding

This study was supported by research grants for Dr. Dalel Askri from the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research, the Auvergne Rhone-Alpes Region (grant N° 16.007278.01) and the French Embassy in Tunisia-Campus France. The project leading to this publication has also received funding for Dr. Sylvia G. Lehmann from Excellence Initiative of Aix-Marseille University-A*MIDEX, a French “Investissements d’Avenir” program, through its associated Labex SERENADE project.

References

- Abdelhalim, M. A. K. and Abdelmottaleb Moussa, S. A. (2013) ‘The gold nanoparticle size and exposure duration effect on the liver and kidney function of rats: In vivo’, *Saudi Journal of Biological Sciences*. King Saud University, 20(2), pp. 177–181. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.01.007.
- Ai, J. et al. (2011) ‘Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs.’, *International journal of nanomedicine*, 6, pp. 1117–1127. doi: 10.2147/IJN.S16603.
- Amara, S. et al. (2014) ‘Acute exposure to zinc oxide nanoparticles does not affect the cognitive capacity and neurotransmitters levels in adult rats’, *Nanotoxicology*, 8(sup1), pp. 208–215. doi: 10.3109/17435390.2013.879342.

Amara, S. et al. (2015) 'Effects of nanoparticle zinc oxide on emotional behavior and trace elements homeostasis in rat brain', *Toxicology and Industrial Health*, 31(12), pp. 1202–1209. doi: 10.1177/0748233713491802.

Askri, D., Ouni, S., Galai, S., Arnaud, J., et al. (2018) 'Intranasal instillation of iron oxide nanoparticles induces inflammation and perturbation of trace elements and neurotransmitters, but not behavioral impairment in rats', *Environmental Science and Pollution Research*. *Environmental Science and Pollution Research*, pp. 1–11. doi: 10.1007/s11356-018-1854-0.

Askri, D., Ouni, S., Galai, S., Chovelon, B., et al. (2018) 'Sub-acute intravenous exposure to Fe₂O₃nanoparticles does not alter cognitive performances and catecholamine levels, but slightly disrupts plasma iron level and brain iron content in rats', *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Elsevier GmbH., 50, pp. 73–79. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.06.006.

Babadi, V. Y. et al. (2012) 'Evaluation of iron oxide nanoparticles effects on tissue and enzymes of liver in rats', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Science*, 23(4), pp. 67–69.

Barhoumi, L. and Dewez, D. (2013) 'Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on green alga *Chlorella vulgaris*', *BioMed Research International*, 2013. doi: 10.1155/2013/647974.

Chua, a C. and Morgan, E. H. (1996) 'Effects of iron deficiency and iron overload on manganese uptake and deposition in the brain and other organs of the rat.', *Biological trace element research*, 55(1–2), pp. 39–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971353>.

Cortajarena, A. L. et al. (2014) 'Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings', *Nanobiomedicine*, 1(2), p. doi: 10.5772/58841. doi: 10.5772/58841.

Deguil, J. et al. (2010) 'Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP Parkinsonian mice', *Neurotoxicity Research*, 17(2), pp. 142–155. doi: 10.1007/s12640-009-9091-4.

Gupta, R., Xie, H. and Sciences, H. (2018) 'HHS Public Access', 37(3), pp. 209–230. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026009.Nanoparticles.

Huang, C. Y. et al. (2014) 'Compare analysis for the nanotoxicity effects of different amounts of endocytic iron oxide nanoparticles at single cell level', PLoS ONE, 9(5). doi: 10.1371/journal.pone.0096550.

Huang, Y. et al. (2018) 'Recent Developments in Food Packaging Based on Nanomaterials', pp. 1–29. doi: 10.3390/nano8100830.

Du L, Zhao Z, Cui A, Zhu Y, Zhang L, Liu J, Shi S, Fu C, Han X, Gao W, Song T, Xie L, Wang L, Sun S, Guo R, M. G. (2018) 'Increased Iron Deposition on Brain Quantitative Susceptibility Mapping Correlates with Decreased Cognitive Function in Alzheimer's Disease', ACS Chemical Neuroscience. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00194.

Lashof-Sullivan, M. M. et al. (2014) 'Intravenously administered nanoparticles increase survival following blast trauma', Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(28), pp. 10293–10298. doi: 10.1073/pnas.1406979111.

Lemine, O. M. et al. (2014) 'Fe₂O₃ by sol-gel with large nanoparticles size for magnetic hyperthermia application', Journal of Alloys and Compounds. Elsevier B.V., 607, pp. 125–131. doi: 10.1016/j.jallcom.2014.04.002.

Liu, A. Y. et al. (2018) 'SC', Toxicology Letters. Elsevier Ireland Ltd. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.04.033.

Maaroufi, K. et al. (2009) 'Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate.', Physiology & behavior, 96(2), pp. 343–349. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.10.019.

Maaroufi, K. et al. (2014) 'Spatial learning, monoamines and oxidative stress in rats exposed to 900MHz electromagnetic field in combination with iron overload', Behavioural Brain Research. Elsevier B.V., 258, pp. 80–89. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.016.

Maher, B. A. et al. (2016) 'Magnetite pollution nanoparticles in the human brain', Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(39), pp. 10797–10801. doi: 10.1073/pnas.1605941113.

Morris, R. (1984) 'Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat', Journal of Neuroscience Methods, 11, pp. 7336–7336. doi: 10.1016/016510270(84)9000714.

Opinion, S. (2015) 'Scientific Opinion on the re-evaluation of iron oxides and hydroxides', 13(12), pp. 1–57. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4317.

Patel, S. et al. (2017) 'Toxicity evaluation of magnetic iron oxide nanoparticles reveals neuronal loss in chicken embryo', *Drug and Chemical Toxicology*. Informa Healthcare USA, Inc, 0(0), pp. 1–8. doi: 10.1080/01480545.2017.1413110.

Pellow, S. et al. (1985) 'Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat', *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), pp. 149–167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7.

Raj, S. et al. (2012) 'Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges', *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(3), p. 186. doi: 10.4103/0975-7406.99016.

Sadeghi, L., Yousefi Babadi, V. and Espanani, H. R. (2015) 'Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue.', *Bratislavske lekarske listy*, 116(6), pp. 373–8.

Sheida, E. et al. (2017) 'The effect of iron nanoparticles on performance of cognitive tasks in rats', *Environmental Science and Pollution Research*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), pp. 8700–8710. doi: 10.1007/s11356-017-8531-6.

Slama, I. Ben et al. (2015) 'Sub-Acute Oral Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles in Male Rats', *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6(3). doi: 10.4172/2157-7439.1000284.

Szalay, B. et al. (2012) 'Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro experiments', *Journal of Applied Toxicology*, 32(6), pp. 446–453. doi: 10.1002/jat.1779.

Treit, D., Menard, J. and Royan, C. (1993) 'Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze', *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 44(2), pp. 463–469. doi: 10.1016/0091-3057(93)90492-C.

Valdiglesias, V. et al. (2016) 'Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives', *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, pp. 53–63. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.03.017.

Vayenas, D. V et al. (1998) 'Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper concentration in rat tissues in vivo: study of liver, spleen, and brain', *Int J Clin Lab Res*, 28(3), pp. 183–186. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801930>.

Yah, C. S., Iyuke, S. E. and Simate, G. S. (2012) 'A Review of Nanoparticles Toxicity and Their Routes of Exposures', IRANIAN jOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE, 8(1), pp. 299–314.

Yoshioka, Y. et al. (2014) 'Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application', pp. 259–271. doi: 10.1007/978-4-431-55139-3.

Younes, N. R. Ben et al. (2015) 'Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination', Environmental Science and Pollution Research, 22(11), pp. 8728–8737. doi: 10.1007/s11356-014-4002-5.

Yun, J. et al. (2015) 'Comparative toxicity of silicon dioxide , silver and iron oxide nanoparticles after repeated oral administration to rats', (December 2014), pp. 681–693. doi: 10.1002/jat.3125.

Legends of Figures & Tables

Figure 1. Mean body weight evolution following acute oral exposure to IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2). Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

Figure 2. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on time spent in the closed and open arms from the elevated plus maze. (The test was performed 24 hours after the oral gavage). Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

Figure 3. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on anxiety index from the elevated plus maze. (The test was performed 24 hours after the oral gavage). Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

Figure 4. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on the cognitive capacities of Wistar rats evaluated by Morris water maze: **A)** Escape latency to reach the platform during acquisition after oral administration of IONPs and **B)** the spent time in the area where the platform was located on the previous day of the test. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

Figure 5. Histopathological modifications of rat liver tissues following acute oral exposure to IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) compared to control rats using H&E stain

Figure 6. Iron deposits of rat liver tissues following acute oral exposure to IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) compared to control rats using Perl's blue stain

Table 1. Iron Oxide Nanoparticle characterisation as powder and in suspension

Table 2. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on relative organ weight in rats. Data obtained at day 10 expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*. * *p-value* < 0.05 using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests

Table 3. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on hematological parameters. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*. WBC white blood cells, RBC red blood cells, MCV mean corpuscular volume, MCH mean corpuscular haemoglobin. * *p-value* < 0.05 using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests

Table 4. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on biochemical parameters. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*. ALP alkaline phosphatase, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase.

* *p-value* < 0.05 using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests

Table 5. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on locomotion and exploration assessed with the Open field behaviour test (Sessions 1 and 2). Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

Table 6. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on locomotion and exploration assessed with the Open field behaviour test (Session 3). Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

Table 7. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on trace element contents in liver. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*.

* *p-value* < 0.05 using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests

Table 8. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on trace element contents in stomach. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*. * *p-value* < 0.05 using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests

Figures & Tables

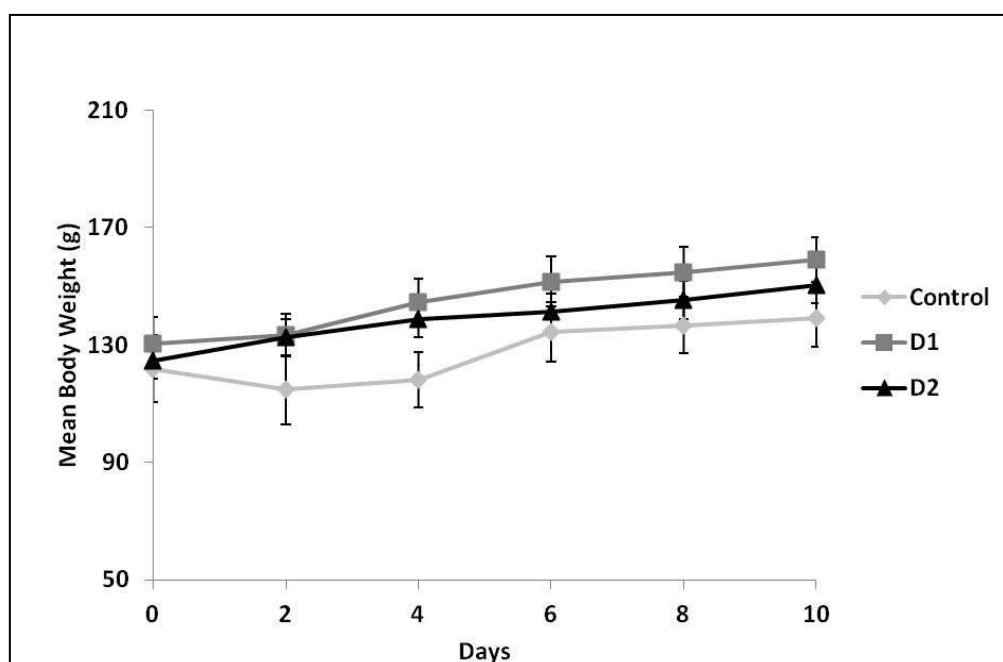


Figure 1. Mean body weight evolution following acute oral exposure to IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2). Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

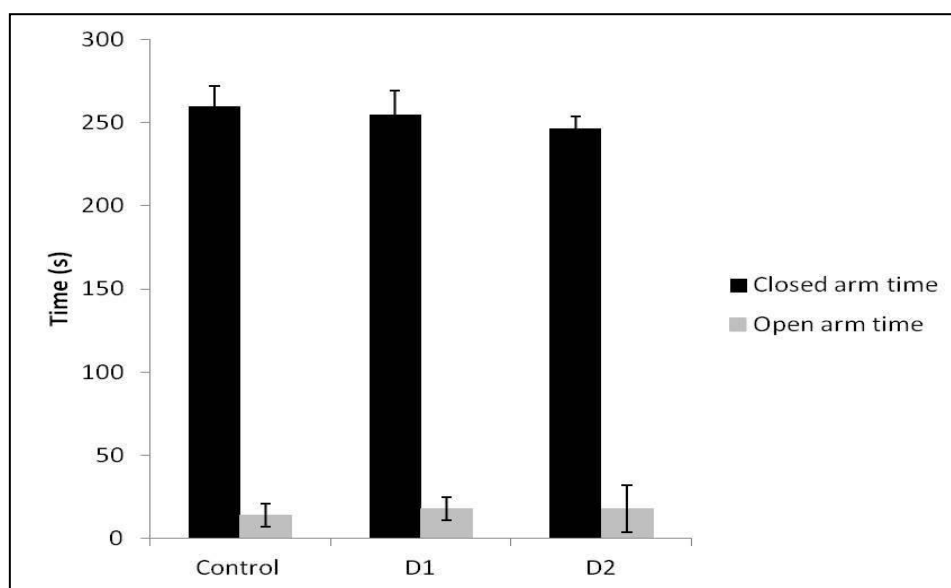


Figure 2. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on time spent in the closed and open arms from the elevated plus maze. (The test was performed 24 hours following the oral gavage). Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=7$ animals *per group*

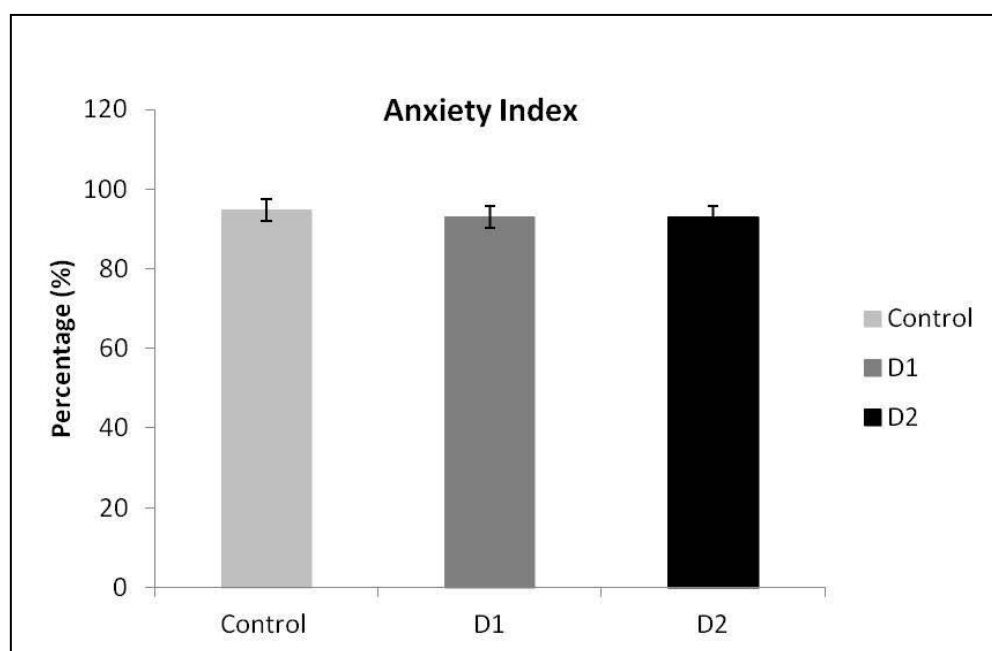


Figure 3. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on anxiety index from the elevated plus maze. (The test was performed 24 hours following the oral gavage). Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

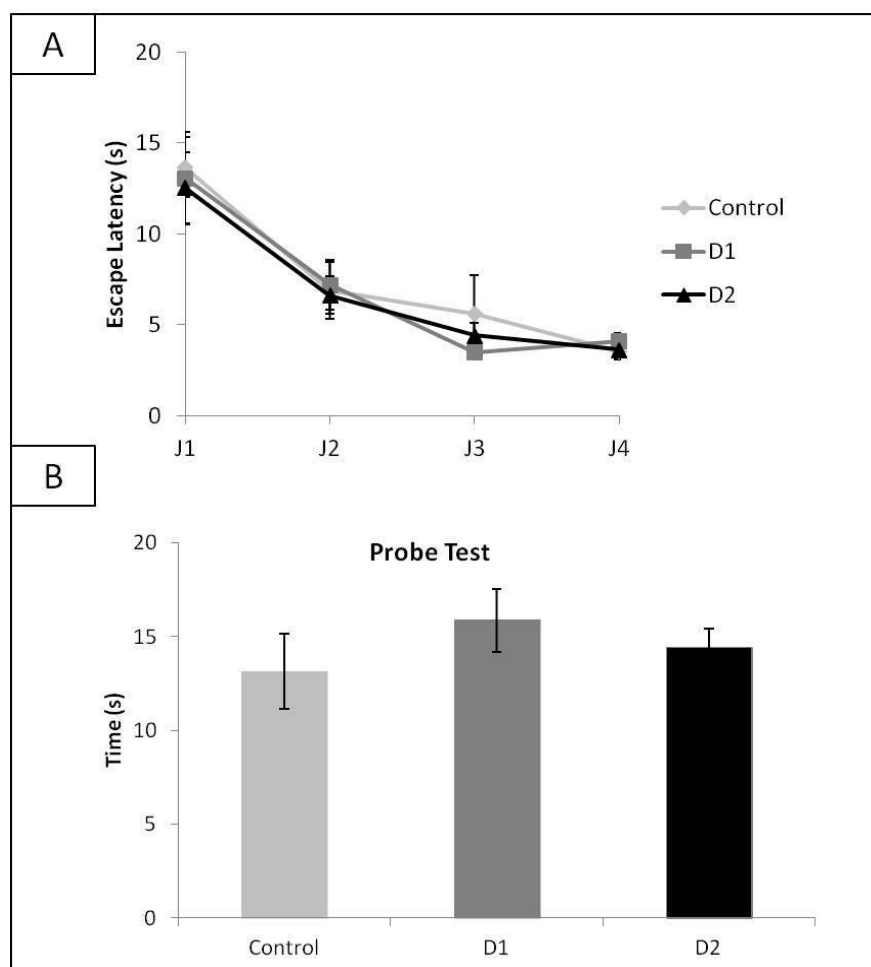


Figure 4. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on the cognitive capacities of Wistar rats evaluated by Morris water maze: **A)** Escape latency to reach the platform during acquisition after oral administration of IONPs and **B)** the spent time in the area where the platform was located on the previous day of the test. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=7$ animals *per group*

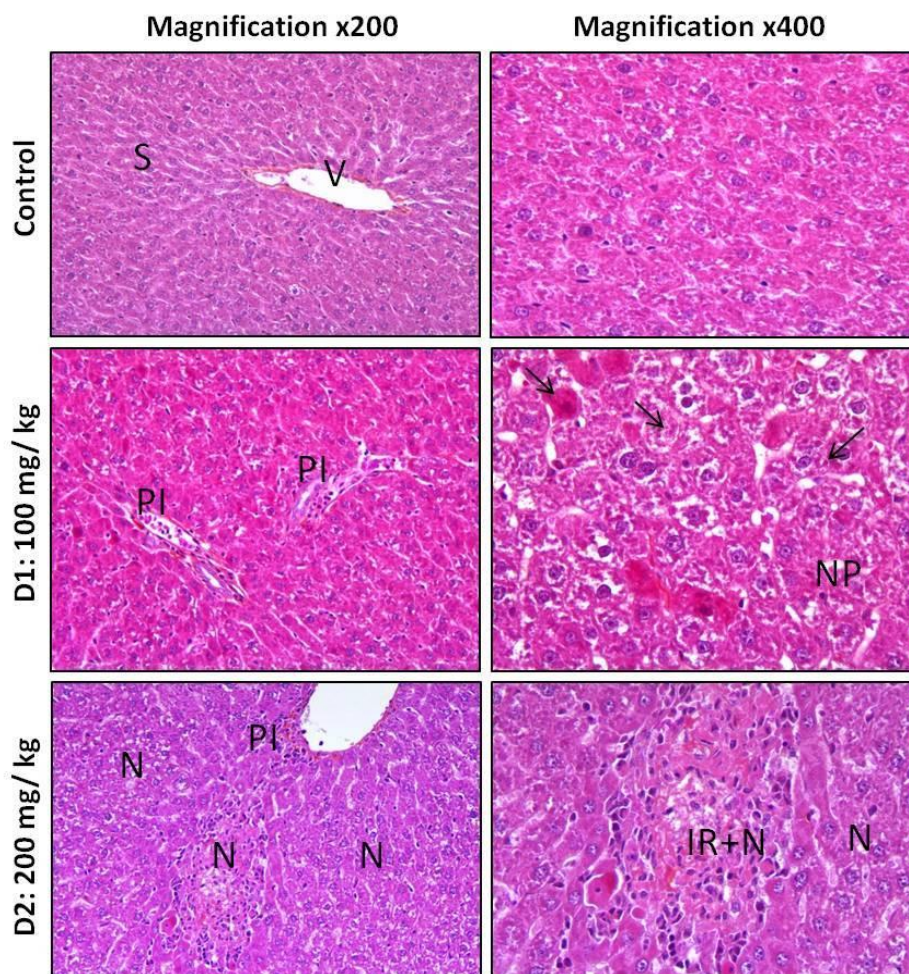


Figure 5. Histopathological modifications of rat liver tissues following acute oral exposure to IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) compared to control rats using H&E stain. S: Sinusoid, V: Vein, PI: Portal Inflammatory Infiltrate, NP: Nuclear Pyknosis, arrows indicate hepatocytes with abundant eosinophilic granular cytoplasm and cytoplasm condensation. N: Necrosis and IR: Inflammatory Response

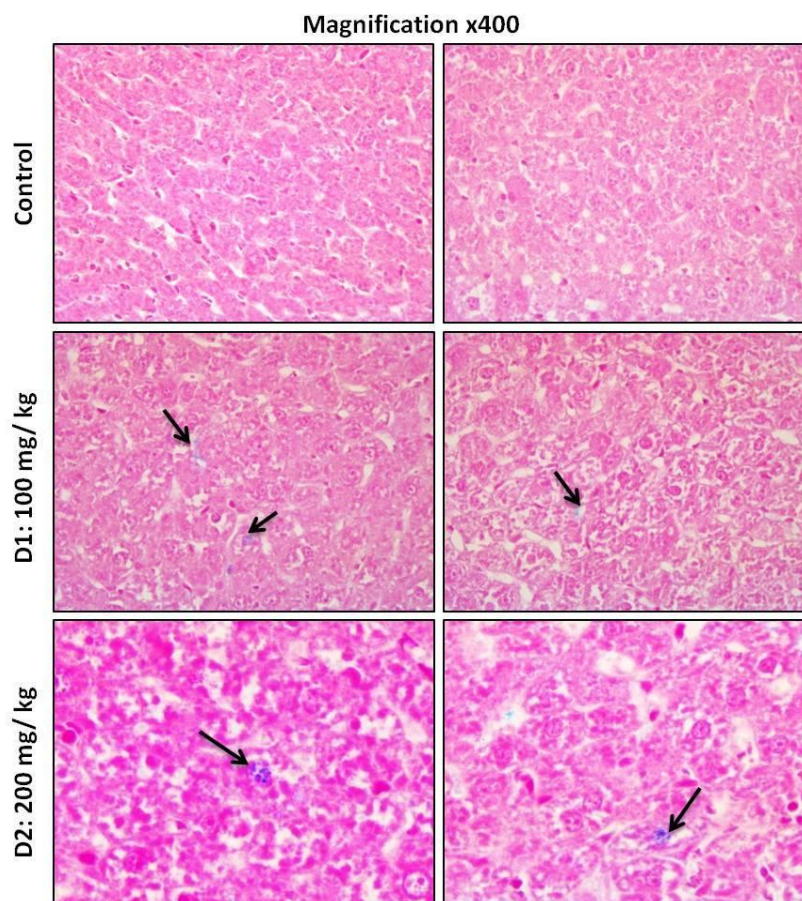


Figure 6. Iron deposits of rat liver tissues following acute oral exposure to IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) compared to control rats using Perl's blue stain. Arrows indicate iron deposit in blue

Table 1. Iron Oxide Nanoparticle characterisation as powder and in suspension

Used technique	Transmission Electron Microscopy	Dynamic Light Scattering		
Parameter	Particle size (nm)	Hydrodynamic size (nm)	Pdl	Zeta Potential
IONPs (γ -Fe ₂ O ₃)	30	174.2	0.302	-10.6

Table 2. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on relative organ weight in rats. Data obtained at day 10 expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*. * *p-value* < 0.05 using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests

	Brain	Liver	Kidneys	Spleen	Lungs	Stomach
Control	13.1 $\pm$ 1.00	57.64 $\pm$ 1.98	12.83 $\pm$ 0.73	5.69 $\pm$ 0.91	12.61 $\pm$ 1.07	14.52 $\pm$ 1.13
D1	11.11 $\pm$ 0.84	50.55 $\pm$ 3.10	9.2 $\pm$ 0.84*	3.73 $\pm$ 0.43	8.71 $\pm$ 0.70*	10.2 $\pm$ 0.86*
D2	10.14 $\pm$ 0.53*	51.71 $\pm$ 1.40	8.64 $\pm$ 0.20*	3.66 $\pm$ 0.46	9.47 $\pm$ 0.63*	9.31 $\pm$ 0.50*

Table 3. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on hematological parameters. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*. WBC white blood cells, RBC red blood cells, MCV mean corpuscular volume, MCH mean corpuscular haemoglobin. * *p-value* < 0.05 using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests

	Control	D1	D2
WBC 10⁹ /L	4.98 $\pm$ 0.58	5.73 $\pm$ 0.57	6.97 $\pm$ 0.51
RBC 10¹² /L	5.31 $\pm$ 0.65	6.82 $\pm$ 0.23*	6.60 $\pm$ 0.15
Haemoglobin g/d	9.38 $\pm$ 0.95	11.86 $\pm$ 0.32*	11.50 $\pm$ 0.20*
Hematocrit %	27.35 $\pm$ 3.08	35.00 $\pm$ 1.03*	34.17 $\pm$ 0.56*
MCV fL	52.00 $\pm$ 0.96	51.29 $\pm$ 0.64	51.71 $\pm$ 0.60
Platelets 10⁹ /L	615 $\pm$ 112	842 $\pm$ 44	818. $\pm$ 49
Neutrophil %	24.93 $\pm$ 3.67	13.21 $\pm$ 0.85*	18.79 $\pm$ 1.84
Lymphocyte %	70.00 $\pm$ 3.29	76.70 $\pm$ 1.43	71.01 $\pm$ 3.12
Monocyte %	2.97 $\pm$ 0.87	4.11 $\pm$ 0.55	5.70 $\pm$ 0.96
Eosinophile %	1.20 $\pm$ 0.55	5.14 $\pm$ 1.32*	3.31 $\pm$ 0.83
Basophile %	0.90 $\pm$ 0.09	0.83 $\pm$ 0.13	1.19 $\pm$ 0.17

Table 4. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on biochemical parameters. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*. ALP alkaline phosphatase, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase.

* *p-value* < 0.05 using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests

	Control	D1	D2
ALP U/L	245.57 $\pm$ 24.07	239.83 $\pm$ 20.41	250.85 $\pm$ 10.09
ALT U/L	55 $\pm$ 3.71	49.57 $\pm$ 2.82	62.71 $\pm$ 3.33*
AST U/L	174.28 $\pm$ 25.66	142.42 $\pm$ 13.34	156.85 $\pm$ 11.64
Cholesterol mmol/L	1.32 $\pm$ 0.06	1.3 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.14
Creatinin μmol/L	13.57 $\pm$ 0.86	12.85 $\pm$ 0.55	13 $\pm$ 0.81
Glucose mmol/L	11.06 $\pm$ 1.08	9.8 $\pm$ 0.46	10.12 $\pm$ 0.66
HDL mmol/L	1.05 $\pm$ 0.06	0.85 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.05
Iron μmol/L	53.38 $\pm$ 6.31	32.13 $\pm$ 3.96*	37.04 $\pm$ 2.88*
Protein g/L	56.14 $\pm$ 0.82	60 $\pm$ 1.51	59.57 $\pm$ 0.81
Triglyceride mmol/L	0.59 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.05
Uric acid μmol/L	101.28 $\pm$ 16.40	84.71 $\pm$ 8.05	85.85 $\pm$ 22.19
Urea mmol/L	5.87 $\pm$ 0.19	7.28 $\pm$ 0.46*	5.91 $\pm$ 0.18

Table 5. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on locomotion and exploration assessed with the Open field behaviour test (Sessions 1 and 2).

Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

	Session 1			Session 2		
	Control	D1	D2	Control	D1	D2
Locomotion in the peripheral part (s)	300 $\pm$ 0.00	299.42 $\pm$ 0.57	298.85 $\pm$ 0.85	298.71 $\pm$ 0.64	298.71 $\pm$ 0.71	299.42 $\pm$ 0.29
Locomotion in the central part (s)	0.00 $\pm$ 0.00	0.57 $\pm$ 0.57	1.14 $\pm$ 0.85	1.28 $\pm$ 0.64	1.28 $\pm$ 0.71	0.57 $\pm$ 0.29
Immobility time (s)	179 $\pm$ 29.01	111.00 $\pm$ 30.12	101.85 $\pm$ 16.63	101.14 $\pm$ 25.37	96.57 $\pm$ 11.07	149.57 $\pm$ 37.81
Time of contact with objects (s)	9.71 $\pm$ 2.24	24.14 $\pm$ 5.65	23.57 $\pm$ 4.37	33.85 $\pm$ 9.58	46.85 $\pm$ 5.96	30.57 $\pm$ 8.47
Number of contacts with objects	3.57 $\pm$ 0.92	8.71 $\pm$ 1.76	8.42 $\pm$ 1.06	9.71 $\pm$ 1.80	12.57 $\pm$ 1.25	7.71 $\pm$ 1.40

Table 6. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on locomotion and exploration assessed with the Open field behaviour test (Session 3). Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

Session 3			
	Control	D1	D2
Locomotion in the peripheral part (s)	295.42 $\pm$ 1.57	298.28 $\pm$ 0.99	298.42 $\pm$ 1.06
Locomotion in the central part (s)	4.57 $\pm$ 1.57	1.71 $\pm$ 0.99	1.57 $\pm$ 1.06
Immobility time (s)	109.85 $\pm$ 19.74	131.28 $\pm$ 24.44	122.42 $\pm$ 18.85
Time of contact with objects (s)	33.57 $\pm$ 6.97	26.85 $\pm$ 4.25	31.42 $\pm$ 4.74
Number of contacts with objects	11.28 $\pm$ 1.83	8.28 $\pm$ 1.32	9.85 $\pm$ 2.31

Table 7. Effects of acute oral administration of IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on trace element contents in liver. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

	Liver		
	Control	D1	D2
Fe ($\mu\text{g/g}$)	199.41 $\pm$ 17.67	238.38 $\pm$ 19.52	182.72 $\pm$ 12.33
Mn ($\mu\text{g/g}$)	6.97 $\pm$ 0.53	6.53 $\pm$ 0.41	6.09 $\pm$ 0.16
Zn ($\mu\text{g/g}$)	86 $\pm$ 3.5	81 $\pm$ 2.1	87 $\pm$ 1.7
Cu ($\mu\text{g/g}$)	10.6 $\pm$ 0.54	10.55 $\pm$ 0.49	10.64 $\pm$ 0.34

Table 8. Effects of acute oral administration IONPs at 100 (D1) and 200 mg/kg (D2) on trace element contents in stomach. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=7 animals *per group*

	Stomach		
	Control	D1	D2
Fe ($\mu\text{g/g}$)	64.46 $\pm$ 5.04	80.59 $\pm$ 9.72	65.27 $\pm$ 5.46
Mn ($\mu\text{g/g}$)	10.07 $\pm$ 2.12	15.35 $\pm$ 4.67	8.28 $\pm$ 1.52
Zn ($\mu\text{g/g}$)	98 $\pm$ 5.5	103 $\pm$ 9.7	98 $\pm$ 8.3
Cu ($\mu\text{g/g}$)	7.91 $\pm$ 0.61	9.92 $\pm$ 1.08	8.8 $\pm$ 0.41

5. Etude protéomique des extraits protéiques du foie, poumon et cerveau suite à l'exposition intranasale

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels les nanoparticules peuvent agir, nous avons réalisé une étude protéomique « Bottom-up » basée sur la spectrométrie de masse et le marquage isotopique iTRAQ suivi du fractionnement OFFGEL comme décrit précédemment par Lehmann et al. 2017. Le foie, le poumon et le cerveau ont été choisis pour étudier leurs protéomes respectifs suite à l'exposition intranasale aux NPs de fer pendant 7 jours successifs à une dose journalière de 10 mg/kg. En effet, après l'instillation intranasale, les paramètres biochimiques ont varié ce qui nous a sollicité à analyser les variations protéiques au niveau du foie. Quand on dit instillation intranasale, on dit système nerveux et système respiratoire : en effet, il a été reporté que les NPs peuvent se transloquer au cerveau à travers le nerf olfactif et se transloquer aux poumons par les voies respiratoires ayant comme porte d'entrée le nez. Ainsi, nous avons choisi d'étudier les protéomes du cerveau et du poumon.

Le marquage isotopique iTRAQ est bien adapté aux biomarqueurs de protéines et aux études de découverte de médicaments spécifiques à une maladie ou à un profil bien déterminé. Il permet à la fois l'identification et la quantification de protéines dans un multiplexage efficace d'échantillons ; en mettant en évidence des protéines différentiellement exprimées de chaque échantillon correspondant à chaque condition. Les peptides issus de ce type de digestion ont été marqués par les étiquettes iTRAQ ce qui permettra de quantifier les protéines qui varient en réponse à l'exposition aux NPs de fer. Le schéma ci-dessous illustre les différents marquages réalisés :

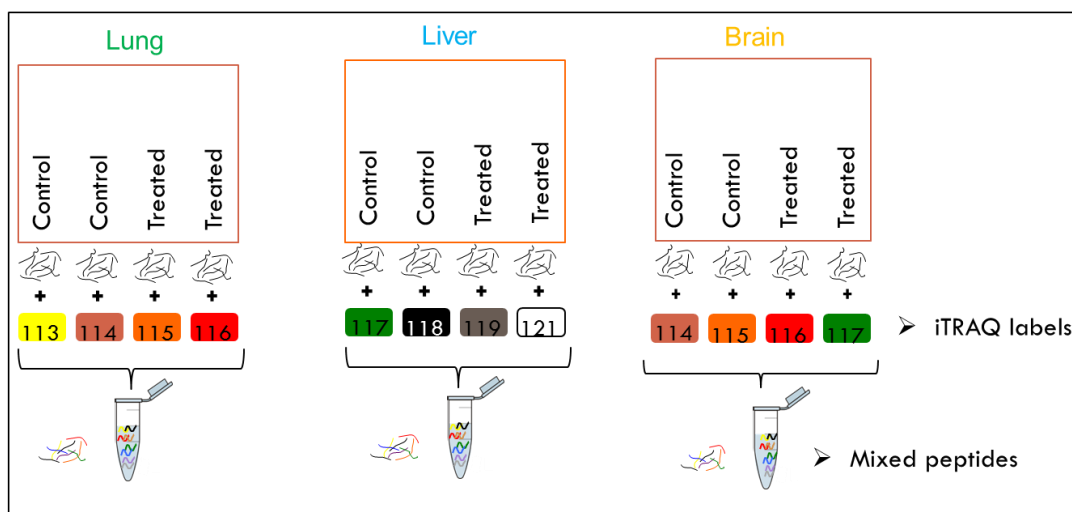


Figure 34 : Différents marquages réalisés des peptides du poumon, foie et cerveau

Ainsi, les rapports entre les organes issus des rats traités et ceux des rats témoins indiquent l'abondance relative des protéines dans les différentes conditions d'échantillon.

Notre criblage protéomique ainsi que l'analyse par le « Package isobar » ont permis d'identifier 1565 protéines et de quantifier 1541 protéines au niveau du cerveau, d'identifier 1135 protéines et de quantifier 1125 protéines au niveau du foie et enfin, d'identifier 1161 protéines et de quantifier 1128 protéines au niveau du poumon. Parmi ces protéines, 127 étaient significativement différentiellement exprimées (DEP) entre les rats traités et témoins au niveau cérébral avec 67 régulées à la baisse et 60 régulées à la hausse (Annexe 2), 66 DEP au niveau du foie avec 35 sous-régulées et 31 sur-régulées (Annexe 2) et 84 DEP au niveau des poumons avec 30 régulées à la baisse et 54 régulées à la hausse (Annexe 2).

Les DEP précédemment identifiées au niveau de chaque organe ont été analysées à l'aide d'outils bioinformatiques tels que TargetMine [177] and PANTHER [178]. Les protéines sous ou sur-exprimées ont été analysées par le logiciel « PANTHER » et « TargetMine » pour étudier les voies et les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées.

Intéressant, l'analyse des protéomes pulmonaires et cérébraux par PANTHER a montré que les protéines dérégulées sont impliquées dans des voies de signalisation liées principalement au système nerveux telles que les voies indiquées dans le tableau ci-après :

Tableau 9 : Les voies de signalisation liées au système nerveux identifiées suite à la dérégulation des protéines pulmonaires et cérébrales

-5HT1 type receptor mediated signaling pathway (P04373)	-Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)
-Alzheimer disease-amyloid secretase pathway (P00003)	-Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction (P00028)
-Beta1 adrenergic receptor signaling pathway (P04377)	-Metabotropic glutamate receptor group I pathway (P00041)
-Beta2 adrenergic receptor signaling pathway (P04378)	-Metabotropic glutamate receptor group II pathway (P00040)
-Dopamine receptor mediated signaling pathway (P05912)	-Metabotropic glutamate receptor group III pathway (P00039)
-Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	-Huntington disease (P00029)
-Enkephalin release (P05913)	-Nicotine pharmacodynamics pathway (P06587)
-GABA-B receptor II signaling (P05731)	-Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway (P00044)
-Gamma-aminobutyric acid synthesis (P04384)	-Parkinson disease (P00049)
-Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)	

Les protéines sur-exprimées sont aussi impliquées dans les voies de signalisation des processus inflammatoires, immunitaires, apoptotiques et cancéreux (tableau 10):

Tableau 10 : Les voies de signalisation liées aux processus inflammatoires, immunitaires, apoptotiques et cancéreux identifiées suite à la dérégulation des protéines pulmonaires et cérébrales

-Apoptosis signaling pathway (P00006)	-Histamine H2 receptor mediated signaling pathway (P04386)
-Toll receptor signaling pathway (P00054)	-PDGF signaling pathway (P00047)
-B cell activation (P00010)	-Ras Pathway (P04393)
-T cell activation (P00053)	-CCKR signaling map (P06959)
-Oxidative stress response (P00046)	-Cytoskeletal regulation by Rho GTPase (P00016)
-Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)	-De novo purine biosynthesis (P02738)
-Integrin signalling pathway (P00034)	-De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis (P02739)
-Interferon-gamma signaling pathway (P00035)	-De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis (P02740)

L'impact des NPs de fer sur les différentes voies liées avec l'activité et le fonctionnement cérébral suggère certaines toxicités de ces NPs qui peuvent se manifester probablement d'une manière plus claire avec la durée d'exposition ou avec l'augmentation de la dose.

L'effet des NPs sur la fonction hépatique était plus de type réponse au stress oxydatif mais principalement métabolique car les effets les plus remarquables étaient sur les voies métaboliques telles que la voie de la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le métabolisme du pyruvate et la synthèse d'ATP et des acides aminés (arginine, glycine et serine).

Les protéines DEP sont impliquées dans divers processus biologiques. Les processus les plus touchés sont le processus cellulaire, le métabolisme, l'organisation cellulaire ou la biogenèse et aussi le système immunitaire selon l'organe étudié. Les « Top 10 » processus biologiques les plus affectés par l'exposition aux NPs de fer ont été identifiés par une analyse d'ontologie des gènes « gene ontology » en utilisant PANTHER et sont illustrés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 11 : Les processus biologiques dans lesquels les DEP sont impliquées au niveau du cerveau

Biological process	Brain (%)
Cellular process (GO:0009987)	48.8
Metabolic process (GO:0008152)	39.7
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	17.4
Response to stimulus (GO:0050896)	14.0
Biological regulation (GO:0065007)	13.2
Localization (GO:0051179)	10.7
Multicellular organismal process (GO:0032501)	9.1
Developmental process (GO:0032502)	6.6
Biological adhesion (GO:0022610)	6.6
Locomotion (GO:0040011)	0.8

Tableau 12 : Les processus biologiques dans lesquels les DEP sont impliquées au niveau du foie

Biological process	Liver (%)
Metabolic process (GO:0008152)	47.7
Cellular process (GO:0009987)	43.1
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	13.8
Biological regulation (GO:0065007)	10.8
Response to stimulus (GO:0050896)	7.7
Localization (GO:0051179)	7.7
Multicellular organismal process (GO:0032501)	4.6
Immune system process (GO:0032501)	3.1
Biological adhesion (GO:0022610)	1.5

Tableau 13 : Les processus biologiques dans lesquels les DEP sont impliquées au niveau du poumon

Biological process	Lung (%)
Metabolic process (GO:0008152)	35.7
Cellular process (GO:0009987)	26.8
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	20.2
Biological regulation (GO:0065007)	13.1
Localization (GO:0051179)	14.3
Response to stimulus (GO:0050896)	9.5
Developmental process (GO:0032502)	9.5
Biological adhesion (GO:0022610)	8.3
Multicellular organismal process (GO:0032501)	6.0
Immune system process (GO:0032501)	3.6

L'analyse des processus biologiques dans lesquels les DEP sont impliquées au niveau du cerveau, foie et poumon a montré certaines ressemblances entre les réponses cellulaires des différents organes. Ainsi, le processus le plus touché est le métabolisme pour le foie et le poumon. Il est en deuxième position pour le cerveau. Les pourcentages des autres processus sont plus ou moins de la même grandeur entre les trois organes étudiés tels que les processus cellulaires, l'organisation cellulaire, la régulation biologique et la réponse aux stimuli. La réponse immunologique est minime par rapport aux processus biologiques cités précédemment mais elle n'apparaît qu'au niveau du foie et du poumon.

Au niveau de chaque organe, nous nous sommes concentrés sur les processus biologiques qui sont en rapport avec les réponses connues aux NPs en général. L'analyse des protéines et des processus a été faite avec le logiciel « TargetMine » et les résultats sont exprimés dans les tableaux ci-dessous pour les protéomes du cerveau, du foie et du poumon successivement.

Tableau 14 : Exemples des protéines dérégulées au niveau du cerveau suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants

Biological process	Accession Number	Ratio Tr/ctr	p-value
Response to oxidative stress			
Glutathione S-transferase Yb-3	P08009	1.62	<0.001
NADH dehydrogenase	BOBNE6	2.30	0.027
Inflammation process			
Annexin A5	P14668	1.37	0.02
Cancer: angio/lymphangiogenesis			
Ezrin	P31977	1.31	0.0038
Malignant T-cell-amplified sequence 1	Q4G009	1.30	0.012
Neuronal damage related to Alzheimer Disease			
Neuronal pentraxin-1	P47971	1.36	0.009
Adherence, neuronal differentiation and signal transduction			
Disks large homolog 1	Q62696	0.56	0.025
Cell cycle exit and neuronal differentiation protein1	Q5FVI4	0.73	0.015

Au niveau hépatique, les protéines dérégulées à la hausse sont impliquées dans les processus biologiques connus comme la réponse « Nano » tels que la réponse au stress oxydatif et la stimulation du système immunitaire. Via le sang, les NPs de fer arrivent au niveau du foie et induisent des réactions oxydantes. L'organisme tend à se défendre ce qui induit forcément l'augmentation des biomarqueurs antioxydants. Le tableau ci-dessous résume les

principales protéines hépatiques surexprimées suite à l'administration des NPs par voie intranasale.

Tableau 15 : Exemples des protéines sur-exprimées au niveau du foie suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants

Biological process	Accession Number	Ratio Tr/ctr	p-value
Response to oxidative stress			
Carbonic anhydrase 3	P14141	2.07	<0.001
Glutathione S-transferase alpha-1	P00502	1.30	<0.001
Glutathione S-transferase Mu 2	P08010	1.30	0.005
Catalase	P04762	1.26	0.015
Isocitrate dehydrogenase	P41562	1.20	0.012
Immune system			
Ig gamma-1 chain C region	P20759	1.56	0.029
Cancer metabolism			
Sulfotransferase 1C1	P50237	1.66	<0.001
Hepatic lipid metabolism			
Vigilin	Q9Z1A6	1.47	0.012

Cependant, les protéines sous-exprimées sont plutôt impliquées dans le métabolisme. Voici quelques exemples dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Exemples des protéines sous-exprimées au niveau du foie suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants

Biological process	Accession Number	Ratio Tr/ctr	p-value
Fatty Acid Metabolism			
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	O88813	0.73	0.022
Fatty acid synthase	P12785	0.63	<0.001
Glycolysis/ Gluconeogenesis			
ATP-citrate synthase	P16638	0.59	<0.001
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04797	0.79	0.025
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P05370	0.60	0.008
Pyruvate kinase	P12928	0.66	<0.001
Cytochrome C1	D3ZFQ8	0.82	0.043
Oxidative Phosphorylation			
Cytochrome c oxidase COX 7B	P80431	0.65	0.046

Très intéressant, au niveau du poumon, les protéines sur-exprimées sont impliquées dans les réponses au stress oxydatif, la stimulation du système immunitaire et la réponse à

l'inflammation. Ces processus sont connus d'être impliqués dans les réponses aux NPs tels est le cas pour les NPs de cuivre [179,180] et d'argent [181]. L'effet au niveau pulmonaire semble être plus intense qu'au niveau hépatique. Ceci peut être expliqué par le fait que les NPs de fer ont été administrées par voie intranasale. Les NPs de fer peuvent se transloquer directement via la circulation sanguine aux poumons et induire des effets potentiellement toxiques d'où la stimulation de la réponse antioxydante et anti-inflammatoire.

Tableau 17 : Exemples des protéines sous-exprimées au niveau du poumon suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants

Biological process	Accession Number	Ratio Tr/ctr	p-value
Response to oxidative stress			
Superoxide dismutase	P07895	1.48	0.005
Peroxiredoxin-6	O35244	1.26	0.049
Redox-regulatory protein FAM213A	Q6AXX6	1.22	0.013
Immune system stimulation and response to inflammation			
Annexin	Q5XI77	1.54	0.021
Histone H1.5	D3ZBN0	1.35	0.025
Histone H2A	Q6I8Q6	1.75	0.021
Protein S100-A8	P50115	1.30	0.009
Protein S100-A9	P50116	1.65	<0.001
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	P04157	1.71	0.004
Redox-regulatory protein FAM213A	Q6AXX6	1.22	0.013
Cell death			
Programmed cell death 6	G3V7W1	1.23	0.045
Iron metabolism			
Ferritin heavy chain	P19132	1.36	<0.001
Cell adhesion and cancer progress			
Podocalyxin	Q9WTQ2	1.96	0.002

Les protéines dérégulées à la baisse au niveau du poumon sont plutôt impliquées dans le métabolisme, le transport d'oxygène, l'hémostase ainsi que la différenciation et la prolifération cellulaire. Quelques exemples sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 18 : Exemples des protéines sous-exprimées au niveau du poumon suite à l'exposition aux NPs de fer et les processus biologiques correspondants

Biological process	Accession Number	Ratio Tr/ctr	p-value
Metabolism			
Succinate dehydrogenase	P21913	0.71	0.005
Phosphoglycerate kinase 1	P16617	0.79	0.044
Oxygen transport (lung to tissues)			
Hemoglobin subunit alpha-1/2	P01946	0.37	<0.001
Hemoglobin subunit beta-1 and beta-2	P02091	0.77	<0.001
Hemostasis			
Fibrinogen gamma chain	P02680	0.79	0.008
Fibrinogen beta chain	P14480	0.81	0.017
Cell proliferation and differentiation			
Thymosin beta-4	P62329	0.61	<0.001

Comme dans l'étude *in vitro*, les résultats de l'étude des protéomes du cerveau, du foie et du poumon ont montré une déstabilisation du cytosquelette essentiellement au niveau du cerveau. Le tableau suivant illustre les différentes protéines dérégulées et qui sont impliquées dans le remodelage de cytosquelette. Plus que ça, aucune de ces protéines n'est commune entre deux ou trois organes ce qui prouve la spécificité des protéines dérégulées. La perturbation du cytosquelette suite aux traitements avec des NPs a été déjà rapportée par d'autres études réalisées *in vitro* [182–189]. Cependant, à notre connaissance, celle-ci c'est la première étude *in vivo* qui rapporte l'atteinte de cytosquelette suite à l'exposition aux NPs de fer chez l'animal.

DISCUSSION GENERALE

VI. DISCUSSION GENERALE

1. Cytotoxicité et génotoxicité des Nanoparticules de Fer

Les nanomatériaux ont attiré beaucoup d'attention pour leur utilisation et en ont bénéficié dans plusieurs domaines. Parmi ceux-ci, les nanoparticules d'oxyde de fer (NPs de fer) ont été utilisées dans le domaine biomédical comme agents de contraste pour l'imagerie des cellules cancéreuses tel que dans le cas du cancer du pancréas. Cependant, plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont rapporté la toxicité potentielle de ces nanoparticules dans différents modèles en particulier dans les cellules en culture. Les études *in vitro* présentent plusieurs avantages en recherche de point de vue rapidité, haut débit, multiplicité des analyses, prédiction des effets des NPs, et plus important de point de vue éthique.

Par conséquent, dans notre étude actuelle, nous avons étudié les effets des NPs de fer sur la lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y. Nous avons mené des études cytotoxiques et génotoxiques pour évaluer les effets phénotypiques des NPs de fer sur les cellules, et une étude protéomique pour évaluer les effets moléculaires et les mécanismes par lesquels ce type de NPs pourrait induire une toxicité ou une perturbation au niveau cellulaire. Le modèle cellulaire choisi est en relation avec le but de nos études réalisées *in vivo* qui était d'évaluer la toxicité des NPs de fer sur le cerveau, les fonctions cognitives ainsi que les catécholamines chez le rat. En effet la lignée cellulaire SH-SY5Y est devenue un modèle cellulaire neuronal commun en neurologie et plus précisément pour les recherches sur la maladie de Parkinson.

Par ailleurs, cette lignée cellulaire possède plusieurs de nombreuses caractéristiques notamment son origine humaine, ses propriétés essentiellement les caractéristiques des neurones catécholaminergiques (et pas uniquement dopaminergiques) et de sa facilité de mise en culture et d'entretien. Ces caractéristiques ont été largement discutées dans des revues scientifiques [81,190,191]. Les SH-SY5Y sont de morphologie neuroblastique sont positives pour la tyrosine hydroxylase et la dopamine- β -hydroxylase caractéristique des neurones catécholaminergiques, alors que les cellules homologues épithéliales manquaient de ces activités enzymatiques comme souligné par Ross et al., il y a plus de 30 ans [192]. Les cellules SH-SY5Y expriment aussi le transporteur de la dopamine. De plus, cette lignée cellulaire peut être différenciée en un phénotype neuronal fonctionnellement mature en présence de divers agents. Après différenciation, les cellules SH-SY5Y cessent de proliférer et un nombre de cellules constant est par la suite maintenu. Cependant, différents agents de

différenciation induisent différents phénotypes neuronaux et changements biochimiques tels que les NPs de fer dans notre étude.

En ce qui concerne la caractérisation des NPs de fer, nous avons utilisé des méthodes pour la caractérisation de la poudre de nano et aussi des NPs dispersées dans les différentes solutions utilisées telles que l'eau pure, le milieu de culture avec et sans sérum de veau fœtal et la solution de NaCl à 0.9%. Les mesures de la taille moyenne des NPs en tant que poudre étaient de 14, 22 et 30 nm pour les trois NPs nommées F1, F2 et F3. Cependant, en suspension, les NPs de fer avaient des tailles plus importantes que lorsqu'elles étaient en poudre. L'équipe de Costa en 2016 [193] a rapporté que lors d'une étude réalisée *in vitro* que les NPs de fer dispersées dans des milieux de culture cellulaire présentaient une taille plus grande et une stabilité plus faible que celles dispersées dans l'eau, ce qui est en concordance avec nos résultats. Par ailleurs, cette augmentation de taille a été montrée dans des études antérieures, et elle est principalement due à la formation d'agglomérats à pH physiologique et à la concentration d'électrolytes comme souligné par Bihari *et al.*, en 2008 [194].

Dans l'eau, les NPs ont aussi un diamètre beaucoup plus grand en DLS que celui déterminé par le TEM (en tant que NP en poudre), indiquant que ces particules ne sont pas particulièrement assez stables. Ce caractère est probablement lié aux NPs en général car même d'autres types de NPs (cuivre, zinc et titane) avaient des tailles plus grandes en suspension. Ceci pourrait être expliqué par la grande réactivité des NPs et aussi des caractéristiques magnétiques des NPs de fer particulièrement en présence des autres constituants des milieux dans lesquels elles sont dispersées. Dans notre étude, les résultats obtenus en comparant les mesures de DLS avec ou sans sérum ont révélé l'importance de la présence de sérum pour éviter une forte agglomération de NPs. Diverses études ont montré l'importance du sérum en tant que produit dispersant pour améliorer la dispersion et la stabilité des particules. Cependant, ils ont signalé, simultanément, que le sérum est responsable de l'augmentation de la taille en formant des protéines corona autour des particules, ce qui empêche les NP de s'agglomérer en fournissant un encombrement stérique. D'après ce que nous avons observé dans notre étude, le sérum de veau fœtal favorise la dispersion des NPs de fer dans le milieu de culture.

Nos principaux résultats ont montré que l'utilisation de trois tailles différentes des NPs de fer (14, 22 et 30 nm) induit un détachement cellulaire, des changements morphologiques cellulaires, une internalisation des NPs de fer et une mortalité cellulaire d'une manière

dépendante de la taille et de la concentration des NPs de fer dans les milieux de culture. Les NPs de fer ont induit de légers dommages génotoxiques testés par un test de comète modifié sans affecter le cycle cellulaire, la fonction mitochondriale, l'intégrité de la membrane, le niveau de calcium intracellulaire et la génération de ROS. Dans tous les tests qu'on a réalisés, nous avons utilisé le FeCl_3 pour comparer également les effets des NPs de fer et du fer ferrique en incubant les cellules dans les mêmes conditions dans les deux cas. Dans tous les essais, les NPs présentaient plus de toxicité que le fer ferrique.

Le fer en tant qu'ions ferriques ou ferreux est connu pour jouer un rôle important dans la production des ROS. En effet, il a été reporté que l'augmentation du fer entraîne un déséquilibre oxydatif via la stimulation de la production des ROS médiée principalement par les ions Fe^{2+} . Or, dans notre étude l'effet des ions Fe^{3+} issus de la dissolution du FeCl_3 n'ont induit aucune toxicité au niveau des cellules SHSY-5Y. Ce résultat peut être dû à la gamme de concentrations choisies pour exposer les cellules, qui pourrait être non toxique en raison de sa faiblesse pour être au niveau de la gamme de concentration généralement utilisée pour évaluer les effets de NPs. Effectivement, notre but était de comparer les effets des NPs de fer et du fer ferrique aux mêmes concentrations avec plus d'attention aux effets des NPs de fer qui sont au cœur de notre étude.

Hohnholt *et al.*, ont reporté en 2011 que les NPs de fer revêtues de DMSA sont efficacement absorbées dans les cellules oligodendrogiales vivantes et réduisent la prolifération cellulaire à des doses élevées telles que $1000\mu\text{M}$ mais sans changement de la viabilité cellulaire et l'intégrité membranaire [195]. Ces observations sont plus ou moins en accord avec nos résultats, vu que les NPs de fer utilisées lors de notre étude induisaient une diminution significative de la viabilité qui atteint uniquement 46 % comparé à la fraction F3 (30 nm) et non pas avec les autres fractions. De même, le test de bleu de trypan a montré que les NPs de fer diminuaient la prolifération mais pas de manière très prononcée et que la prolifération reste supérieure à 60%. Néanmoins, selon la même étude de Hohnholt, malgré les grandes quantités de fer accumulées, les cellules OLN-93 n'induisaient pas de production de ROS importante ou une altération du potentiel de réduction du thiol cellulaire. Suite à cela, ils ont rapporté que la forte régulation à la hausse de la ferritine a permis aux cellules de stocker en toute sécurité l'excès de fer libéré des NPs qui n'est pas nécessaire à la prolifération, empêchant ainsi la formation de ROS par la réaction de Fenton médiée par le fer. Ils suggèrent aussi que les cellules neurales sont capables de libérer le fer des NPs accumulées.

Dans notre étude, on n'a pas réalisé un dosage de la ferritine ce qui serait intéressant pour confirmer les résultats obtenus par Hohnholt et ses collaborateurs.

En 2013, Luther et ses collaborateurs ont étudié l'absorption par endocytose des NPs de fer par les cellules microgliales cérébrales [196]. L'étude a montré que l'exposition des cellules microgliales aux NPs de fer entraînait une augmentation de la teneur en fer cellulaire qui est dépendante du temps et de la concentration, tandis que la teneur en fer des cellules microgliales incubées sans NPs restait inchangée. En effet, selon leur étude, les fortes concentrations en NPs de fer ou bien les longues incubations ont conduit à des teneurs cellulaires en fer spécifiques plus élevées compromettant la viabilité cellulaire. Cette constatation est conforme à l'opinion selon laquelle les cellules microgliales absorbent les particules jusqu'à leur mort [197]. Ces explications peuvent justifier la mort cellulaire des SH-SY5Y qui est indépendante de tous les processus de mortalité connus pour d'autres cellules. En effet, la perte de viabilité cellulaire suite à l'exposition à des concentrations élevées de NPs de fer pourrait être une conséquence d'une libération rapide d'ions de fer toxiques des particules accumulées, car le fer de faible poids moléculaire a été reporté comme agent toxique pour les cellules de type neuronale [198,199] et induire le détachement des cellules [200].

De plus, des études antérieures ont indiqué que suite à l'exposition des cellules aux NPs de fer, celles-ci sont stockées par la suite dans des lysosomes où elles se décomposent en fer libre [201,202]. Les ions de fer libres peuvent affecter les mitochondries et/ou augmenter la concentration des radicaux. De plus, les NPs de fer peuvent également endommager directement les mitochondries en provoquant des altérations morphologiques ou une diminution du potentiel membranaire mitochondrial [203]. Or, l'étude de Geppert *et al.*, en 2013 a montré que sept jours après l'exposition des astrocytes aux NPs, la plupart des NPs de fer accumulées restent déposées sous la forme d'agrégats de NPs de fer dans les vésicules cellulaires. Peu de fer, uniquement, a été libéré par les NPs de fer accumulées [204]. Ainsi, en se basant sur ce résultat, on pourrait expliquer nos résultats concernant l'augmentation de la teneur en fer intracellulaire sans avoir affecter le potentiel de la membrane mitochondriale.

Plusieurs études *in vitro* ont été menées pour investiguer les effets toxiques potentiels des NPs de fer et ont démontré une toxicité faible ou nulle de ces NPs, ce qui suggère la biocompatibilité des NPs fer [205]. En effet, Les NPs de fer montrent généralement une faible toxicité lorsqu'ils se dégradent en Fe^{2+} et Fe^{3+} [206]. Cependant, les NPs de type magnétite et

de maghémite présentent des toxicités différentes [207]. La magnétite s'est avérée présenter une cytotoxicité car elle peut se dégrader via la réaction de Fenton :

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}^\bullet$ générant un radical libre réactif. Egalement, un excès de fer dans le corps est indésirable (comme signalé par plusieurs études) et est associé à un certain nombre de maladies; par exemple, dans le cerveau, le fer peut induire des troubles neurodégénératifs principalement les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [208]. La modification de surface joue aussi un rôle dans la toxicité des NPs et la présence d'un revêtement polymère, tel que le PEG, peut également induire une toxicité des NPs de fer, comme cela a été démontré pour les fibroblastes humains [207,209].

En considérant tous les résultats et interprétations des études *in vitro*, les NPs de fer utilisées lors de ces dernières étaient de faible toxicité et n'ont pas induit de grands changements phénotypiques ou morphologiques au niveau des cellules. Néanmoins, l'effet génotoxique observé pourrait être mieux évalué avec tous les points déjà faits sur une longue période d'exposition d'une semaine, de 14 jours ou bien de 30 jours. Ce genre d'expérience permettra d'évaluer les effets des NPs de fer à long terme. Cependant, des études *in vivo* ont montré que les NPs de fer sont relativement sûrs car ils ne s'accumulent pas dans les organes vitaux et sont rapidement éliminés du corps. En fait, les études *in vitro* présentaient quelques limites principalement l'environnement cellulaire vu que les cellules ne sont pas dans leur environnement normal c'est-à-dire en contact avec le sang, les nutriments et les tissus. De même, il est un peu difficile de simuler de façon correcte les effets qui peuvent être observés *in vivo* d'où l'intérêt d'utiliser un modèle d'étude *in vivo* en complémentarité pour mieux interpréter les résultats des études *in vitro*.

2. Analyse protéomique sur les cellules SH-SY5Y

L'analyse protéomique globale de l'effet des NPs de fer et du fer ionique a permis de quantifier près de 700 protéines parmi lesquelles 14 % ont été dérégulées soit à la baisse soit à la hausse. Ceci suggère que la dose LD10 utilisée lors du traitement des cellules a été bien choisie pour induire des faibles variations qui sont liées uniquement aux traitements par les NPs ou bien l'ion et non pas à la mort cellulaire.

En utilisant la même dose des NPs de fer ou de fer ionique, le protéome de cellules semble agir de manière différente. En effet, l'analyse montre que les ions fer induisent plus de variations de point de vue nombre par rapport aux NPs de fer. Or, les résultats des tests de

cytotoxicité et de génotoxicité soulignent clairement que les NPs de fer sont plus toxiques que les ions ferriques. Les protéines dérégulées de manière spécifique liées aux NPs sont impliquées dans l'apoptose, le stress oxydatif et le processus cancéreux. Cependant, les protéines dérégulées suite à l'exposition au fer ionique sont impliquées principalement dans le métabolisme des acides aminées et des protéines, le développement biologique, le métabolisme d'ARN et la traduction, etc. La classification fonctionnelle de ces protéines pourrait justifier le très faible taux de mortalité des cellules en contact avec les ions ferriques. On peut dire ici que la différence importante de réponse cellulaire entre les NPs de fer et le fer est probablement liée au rôle physiologique que le fer joue dans plusieurs réactions et processus sous la forme ionique en tant que cofacteur généralement. Effectivement, les ions ferriques sont reconnus immédiatement comme agents toxiques et redox potentiels, les transporteurs correspondants, qui nécessitent eux-mêmes de l'énergie pour fonctionner, sont bloqués. Ainsi, ceci empêche les ions de pénétrer dans les cellules, on pourrait donc expliquer la présence d'effets moléculaires et le faible taux de mortalité observés. L'effet cellulaire de la forme nanoparticulaire est plus toxique pour les cellules. Ceci est en faveur de l'hypothèse que les effets de l'accumulation des NPs de fer et/ou la faible libération de la fraction ionique sont plus toxiques que la libération des ions ferreux.

Dans ce cas, les NPs de fer accumulées aux niveaux des lysosomes et/ou la petite fraction ionique libérée interagissent en premier lieu avec les constituants des cellules, ensuite perturbent lentement l'homéostasie des cellules sans forcément induire des fortes variations moléculaires et protéiques, et induisent finalement à la mort des cellules. Ce genre de résultats a été démontré par Triboulet *et al.*, en 2013 [72] sur la lignée des macrophages RAW 264.7 avec les NPs de cuivre et le cuivre ionique. Toutefois, les auteurs ont reporté que les NPs de zinc et les ions de zinc n'avaient pas les mêmes effets comme pour le cuivre nano ou ionique.

La liste des différentes protéines dérégulées à l'issue de notre étude a été comparée à la liste des protéines publiée par Petrak *et al.*, en 2009 [210] connue sous le terme « déjà vu », et les listes des protéines dérégulées à l'issue des études réalisées par Triboulet *et al.*, en 2013, Triboulet *et al.*, 2015, et Dalzonet *al.*, en 2017. L'étude comparative a montré que certaines protéines telles que les kératines, annexines, peroxyredoxines, tropomyosines, enolases et tubulines ont été déjà rapportées comme les protéines les plus perturbées suite à l'exposition aux métaux et plus précisément aux NPs métalliques telles que les NPs de cuivre, de zinc ou minérales telles que les NPs de silice. En 2015, Vogt *et al.*, ont étudié la composition des protéines « corona » suite aux traitements des macrophages RAW 264.7 avec des NPs de fer

couplées aux dextrane. Leurs résultats montrent que les protéines les plus abondantes sont liées à l'hémostase notamment le fibrinogène et les facteurs de coagulation.

Le stress oxydatif, la perturbation de cytosquelette et de l'activité mitochondriale ainsi que la variation du métabolisme protéique et nucléaire sont les principaux effets des NPs reportés par les études protéomiques. Nos résultats protéomiques ont mis en évidence l'effet des NPs de fer sur le cytosquelette par la variation des protéines actine, tubuline et tropomyosine. L'effet trouvé sur le cytosquelette n'est pas purement spécifique aux NPs car c'est déjà trouvé avec le fer ionique. Néanmoins, ces résultats concordent avec les résultats de Soenen *et al.*, [184] qui ont étudié l'effet des NPs de fer en utilisant des outils de fluorescence. Dans leur article, les auteurs ont rapporté que Resovist, Endorem et MLs (médicaments à base d'IONPs) ont induit des altérations transitoires des fibres d'actine dans les cellules endothéliales de l'excroissance du sang humain (hBOECS). De plus, ils ont découvert que ces médicaments abrogeaient la formation de microtubules longs et étendus conduisant à un réseau de microtubules compact et élevé plus proche du noyau cellulaire.

Par ailleurs, la protéine « Barrier-to-autointegration factor » a été reportée lors d'une étude publiée en 2014 d'être perturbée suite à l'exposition des cellules pulmonaires humaines de type BEAS-2B aux NPs de cuivre. D'autres protéines étaient aussi affectées et sont impliquées dans les voies de signalisation de cytosquelette, du remodelage épithélial, ILK, EIF2 et RhoA... Ces protéines avaient comme fonction moléculaire : la mort et la survie cellulaire, la synthèse des protéines, les modifications post-traductionnelles, repliement des protéines, développement et prolifération cellulaire, cycle cellulaire et morphologie cellulaire.

Ici, nous reportons pour la première fois, à notre connaissance, que par l'étude protéomique nous avons pu déduire que les NPs de fer ont des effets non seulement sur le cytosquelette mais aussi sur la viabilité cellulaire par la dérégulation des protéines nano spécifiques « Barrier-to-autointegration factor, Histone H2A type 1-A et Homeoboxprotein aristal-less-like 3 ». Cela fait de ces trois protéines des biomarqueurs d'exposition aux NPs de fer à l'issue de l'étude sur les cellules SH-SY5Y.

Pour résumer, l'investigation protéomique suite aux traitements des cellules par les NPs de fer ou par le fer ionique a permis d'étudier le profil protéique global suite à ce genre d'exposition. L'étude a montré que le point commun entre la réponse aux ions ferriques et aux NPs de fer est la perturbation du cytosquelette. Cependant la réponse spécifique était de type métabolique

et développement biologique pour les ions ferriques, par contre elle est de type apoptotique pour les NPs de fer.

3. Effets physiopathologiques sur le rat

a) Effet sur la santé générale

Nos résultats ont indiqué que l'exposition aux NPs de fer par les trois voies d'administration (intranasale, intraveineuse et orale) n'a pas altéré la santé générale des animaux pendant la durée du traitement car aucun signe de toxicité ou de mortalité n'a été observé. Cependant, l'exposition intranasale a augmenté significativement le poids corporel et pas les autres voies. Les voies intranasale et orale ont diminué significativement le poids relatif de certains organes tels que le foie, les reins, les poumons, ou encore l'estomac et le cerveau suite à l'ingestion des NPs de fer. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Szalay *et al.*, [211]. Cette diminution des coefficients d'organe indique une action systémique des NPs de fer et peut refléter une toxicité potentielle de ces NPs.

En tant que minéral, le fer est connu d'être le plus toxique lorsqu'il est administré par voie intraveineuse. Les injections intramusculaires sont moins toxiques, et le fer administré par voie orale est le moins toxique, probablement parce que la quantité de fer absorbée par voie orale n'est pas égale à 100% de la dose ingérée. Or, dans nos trois études nous avons mis en évidence que lorsque le fer est sous forme nanoparticulaire, la voie intraveineuse semble être la moins toxique vu que les rats n'étaient pas aussi affectés comme lors de l'administration par voie intranasale ou orale. Par ailleurs, dans le cas de l'administration orale, les effets des NPs étaient plus prononcés aux niveaux hépatique et stomacal.

b) Effet sur le cerveau et la cognition

Pour l'exploration de la fonction cognitive et de l'effet cérébral des NPs de fer, nous avons réalisé différents tests de comportement qui couvrent l'anxiété, la locomotion, l'exploration, l'apprentissage, la mémoire, ainsi que le dosage des neurotransmetteurs et l'examen histologique du cerveau. Ces tests sont spécifiques, bien adaptables aux rongeurs et aboutissent à des résultats fiables et interprétables. D'après les trois études réalisées sur les différents groupes de rats et avec les trois voies d'administration différentes, les NPs de fer n'ont aucun impact sur les performances cognitives des rats Wistar et l'organisation tissulaire

du cerveau qui est restée inchangée. En effet, en utilisant le labyrinthe en croix surélevé aucun effet significatif n'a été trouvé concernant le comportement lié aux émotions ou plus précisément à l'anxiété. A l'inverse, Sheida *et al.*, [120] ont montré que l'administration intrapéritonéale des NPs de fer augmentait l'anxiété et la peur des rats et diminuait l'activité locomotrice des rats traités à la dose de 14 mg / kg en utilisant le test « Open field ». De plus, le test de la piscine de Morris montre que l'exposition des rats aux NPs de fer n'altère pas l'apprentissage spatial et la mémoire. De plus, l'analyse des résultats de ce test ont montré que les rats témoins et traités ont pu améliorer leurs performances au cours des essais pratiquement de la même façon, suggérant une flexibilité cognitive similaire.

Nos résultats ont révélé que la capacité cognitive inchangée des rats traités aux NPs de fer pourrait être liée à la stabilité du fer dans le cerveau dans le cas de l'administration des NPs de fer par les voies intranasale et orale. En effet, l'organisation tissulaire du cerveau est restée inchangée et les concentrations en éléments traces sont restées similaires dans les deux groupes. Nos résultats sont en accord avec ceux de Vayenas *et al.*, [212] qui n'ont rapporté aucun changement dans les niveaux de Fe, Cu, Mn et Zn dans le cerveau après une surcharge en fer. En revanche, dans l'étude de Sheida *et al.*, [120] l'injection intrapéritonéale des NPs de fer s'est accompagnée de changements significatifs des concentrations d'éléments traces dans le cerveau 7 jours après l'injection. L'augmentation du fer était associée à une diminution de Zn, Cu et Mn par rapport aux témoins. Notre résultat de l'étude intraveineuse est en désaccord avec celui décrit par cette étude. En effet, l'injection des NPs de fer par voie intraveineuse en subaiguë, induisait la diminution significative du taux de fer cérébral.

En 2014, Huang *et al.*, [213] ont rapporté que la diminution du taux de fer dans le cerveau pourrait être un nouveau mécanisme pharmacologique de l'huperzine A dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. En 2018, Du *et al.*, [214] ont constaté que l'augmentation des niveaux de fer cérébral est corrélée avec la diminution de la fonction cognitive dans la maladie d'Alzheimer. Ainsi, la stabilité ou la diminution du taux de fer cérébral suite aux trois types d'exposition pourrait justifier la stabilité du comportement des rats. Plus intéressant, il a été reporté qu'une diminution remarquable des taux de Zn au niveau cérébral peut être considérée comme l'un des mécanismes des troubles de l'activité nerveuse supérieure, à savoir le déclin cognitif, l'altération de la mémoire et les changements dans l'activité motrice [120]. Dans notre étude, la concentration stable de cet oligo-élément dans le cerveau pourrait expliquer aussi la stabilité du comportement et des capacités cognitives des rats après l'exposition aux NPs de fer.

Les divergences entre les études de la littérature en général peuvent s'expliquer par les propriétés des nanoparticules et la conception de l'étude, comme souligné par Yarjanli et al., qui ont étudié l'effet des NPs de fer sur les cellules neurales. Les auteurs de cette étude ont conclu que les NPs de fer peuvent générer un stress oxydatif et une agrégation des protéines, mais que ces effets dépendent largement des propriétés physiques, de la dose des NPs, du temps d'exposition et de la voie d'administration.

La dopamine, l'épinéphrine et la norépinéphrine sont des neurotransmetteurs qui se trouvent dans les neurones de tous les animaux. L'altération de l'expression normale de ces catécholamines est associée à des troubles neurologiques humains tels que la maladie de Parkinson et la dépression. Nos résultats ont montré que l'exposition intraveineuse aux NPs de fer n'avait aucun effet sur les concentrations des catécholamines au niveau du cerveau. Cependant, l'exposition subaiguë aux NPs de fer par voie intranasale affecte significativement la teneur cérébrale de la dopamine et de la norépinephrine dans l'homogénat de cerveau de rat en augmentant leur expression. Ceci suggère un effet neuroprotecteur des NPs de fer contre les maladies neurodégénératives et les altérations cognitives confirmées par les capacités cognitives inchangées des rats traités aux NPs de fer par rapport aux rats témoins. Umarao *et al.*, ont mis en évidence un tel effet des NPs de fer sur un modèle de maladie de Parkinson chez le rat, caractérisé par une réduction de la teneur en dopamine [215]. De plus, il a été rapporté que la dépression dans la maladie de Parkinson est liée à la perte d'innervation de la dopamine et de la norépinephrine dans le système limbique [216]. Cependant, après une exposition à des NPs de fer de très petite taille (10 nm), une autre équipe a observé une diminution significative de la dopamine striatale et de ses métabolites ainsi que les lésions terminales dopaminergiques ainsi qu'une altération des vaisseaux neuronaux [217].

L'augmentation de la dopamine dans le cerveau pourrait s'expliquer par l'état de stress induit chez le rat par le traitement avec les NPs, ce qui provoque une augmentation de la sécrétion de corticostérone, hormone connue par son action stimulatrice de la dopamine dans le système nerveux central. L'augmentation de la noradrénaline dans le cerveau peut également résulter de l'état de stress induit par l'administration de nanoparticules. En effet, on pense que l'hyperactivité du système norépinephrine est impliquée dans l'activation sympathique. Globalement, l'augmentation de la dopamine et de la noradrénaline dans le cerveau conduit normalement à des conditions d'attention et d'éveil. Les différences entre les résultats semblent être liées à la taille et aux propriétés de la particule, puis au comportement

d'agrégation / agglomération dans le milieu physiologique qui est conditionné par tous les constituants à l'intérieur de l'organisme.

Avec tous les résultats qu'on a pu tirer en utilisant ces tests d'évaluation de l'effet sur le cerveau, une étude par structure cérébrale (par exemple bulbe, cervelet et hippocampe) pourrait être intéressante aussi pour étudier de manière plus précise les effets des NPs sur le cerveau.

De même, suite à l'exposition orale, on aurait pu faire aussi le dosage des neurotransmetteurs au niveau du cerveau. Au fait, par cette étude nous nous sommes concentrés sur les effets physiopathologiques au niveau du foie et de l'estomac et nous avons fait les tests de comportement pour comparer avec les autres voies intranasale et intraveineuse. L'étude intraveineuse présente aussi quelques limites en ce qui concerne l'évaluation de la biodistribution des NPs de fer et les effets sur l'homéostasie des éléments traces par mesure du l'élément trace « Fe » uniquement et pas les autres éléments (Mn, Zn, et Cu) comme dans les études d'administration orale et intranasale.

c) Effet sur la formule sanguine et l'inflammation

La numération de formule sanguine (ou l'hémogramme) est utilisée pour surveiller les changements hématologiques dans le corps, qui sont causés par des produits médicamenteux ou bien chimiques. Nos résultats ont montré que la formule sanguine pourrait être influencée par l'exposition aux NPs de fer. L'exposition intranasale pendant sept jours entraîne une augmentation significative du nombre de plaquettes. Le mécanisme exact de l'augmentation du nombre de plaquettes après l'administration de NPs n'est pas connu. Le taux des plaquettes augmente habituellement dans les réactions inflammatoires et les réponses immunitaires. La thrombocytose réactive semble alors être l'effet le plus remarquable sur l'hématopoïèse des rats traités. Cette découverte est probablement liée à la diminution du taux plasmatique de fer et de la saturation de la transferrine détectée dans le groupe des rats traités. En effet, il est bien connu qu'en cas de processus inflammatoires, il y a une augmentation des macrophages qui utilisent le fer plasmatique pour compenser l'inflammation comme sorte de défense de l'organisme.

De plus, un examen histopathologique a montré que les NPs de fer provoquaient une réponse inflammatoire dans le foie. De ce fait, nos résultats de l'étude par voie intranasale confirment l'inflammation induite par l'exposition aux NPs de fer rapportée dans des études antérieures

[66,218–220]. Au contraire de la voie intranasale, les voies intraveineuse et orale varient légèrement les taux des cellules sanguines mais pas celui des plaquettes. Par conséquent, ces deux voies entraînent plutôt un effet transitoire au niveau de la composition sanguine en concordance avec l'observation histologique et la non-accumulation du fer, aux niveaux des organes cibles.

L'effet inflammatoire des NPs de fer était découvert suite à la réalisation de l'hémogramme. Suite à cela, on aurait pu avancer plus dans l'exploration de l'inflammation en réalisant des dosages des cytokines pro-inflammatoires principalement les interleukines IL1, IL6 et TNF- α .

d) Effet sur le foie et les enzymes hépatiques

Les enzymes hépatiques ALP, ALAT et ASAT augmentent en réponse aux lésions hépatiques et sont couramment évaluées dans les études de toxicité. D'ailleurs, le foie est considéré parmi les organes cibles des NPs et aussi de toute substance étrangère à l'organisme. L'étude par voie intranasale a montré une diminution significative de l'ALP avec des changements histologiques du foie. Nous avons également montré que les concentrations de Mn et de Cu diminuaient significativement dans le foie après 7 injections intranasales, mais la concentration de Fe et de Zn restait inchangée. Les interactions entre Fe-Mn et Fe-Cu sont complexes. Les résultats obtenus ne sont pas en accord avec ceux de Vayenas *et al.*, qui ont rapporté une augmentation des niveaux de Mn et de Zn après une surcharge en fer [212]. Les auteurs n'ont pas utilisé de NPs et ont attribué cette augmentation à une augmentation de l'absorption intestinale et de l'absorption cellulaire. À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui a rapporté l'effet des NPs de fer sur la concentration des éléments traces au niveau du foie et notre observation peut être liée à l'utilisation du fer sous la forme nanoparticulaire.

Les NPs de fer administrées par voie orale ont induit une perturbation de l'ALAT selon la dose utilisée sans modifications des autres enzymes. Concernant la distribution des NPs de fer au niveau des organes, nous avons constaté une stabilité du Mn, Zn et Fe au niveau du foie et de l'estomac avec une augmentation du Cu au niveau de l'estomac. Pareil, Chua et Morgan n'ont signalé aucune modification des concentrations de manganèse dans le foie après une surcharge en fer par voie orale [221]. Néanmoins, l'administration intraveineuse n'avait aucun effet sur les enzymes hépatiques. Ainsi, cette voie d'administration semble être la moins toxique par rapport aux autres voies de point de vue perturbation des paramètres hématologiques et biochimiques et de la physiologie du rat en général.

e) Effet sur les poumons

L'organisation tissulaire du poumon est restée inchangée suite à l'administration par les trois voies. En revanche, Wang *et al.*, [64] ont démontré que les NPs de fer causaient des dommages histopathologiques aux poumons. Dans leur étude, les auteurs ont étudié les effets toxiques de l'exposition par inhalation à des NPs d'oxyde ferrique (Fe_2O_3) chez des rats à 8,5 mg / kg de poids corporel. De même, Sadeghi *et al.*, [66] ont rapporté un emphysème pulmonaire dose-dépendante des nanoparticules, une hyperémie interstitielle et une inflammation des poumons. Des neutrophiles, des lymphocytes et des éosinophiles étaient présents dans le tissu pulmonaire. Les différences de résultats obtenus entre nos études et les autres peuvent être expliquées par les différences de dose, de taille et de voie d'administration même si les NPs utilisées sont de même nature.

L'utilisation de trois voies d'exposition aux NPs de fer afin d'évaluer la toxicité de ce type de NPs a permis de tirer des conclusions pertinentes en étudiant les différences entre ces voies. Cependant, pour l'administration orale, nous avons utilisé deux doses élevées par rapport à la dose utilisée pour l'évaluation des voies intranasale et intraveineuse et en une seule fois. Pour avoir plus de résultats homogènes, nous aurions pu utiliser la même dose et la même période de traitement que pour les deux autres voies étudiées.

4. Analyse protéomique sur les organes de rat

L'étude protéomique basée sur le marquage isotopique iTRAQ suivi par le fractionnement OFF-Gel et la spectrométrie de masse MS/MS est une bonne stratégie pour étudier les effets des NPs qui sont dans notre étude les NPs de fer. Ces dernières années plusieurs études ont été réalisées pour investiguer les mécanismes d'action des NPs et les processus biologiques qu'elles peuvent perturber au niveau cellulaire en utilisant des outils protéomiques dans des études *in vitro* ou *in vivo*.

Dans ce présent travail de recherche, l'analyse protéomique non ciblée de l'effet des NPs de fer sur les protéomes du cerveau, du foie et du poumon a permis de quantifier au niveau du cerveau 1541 protéines parmi lesquelles près de 8% ont été dérégulées soit à la baisse soit à la hausse. Au niveau du foie, nous avons quantifié 1125 parmi lesquelles 6% ont été dérégulées. Au niveau du poumon, nous avons quantifié 1128 protéines parmi lesquelles près de 8% ont été dérégulées. Ceci suggère que la dose utilisée de 10 mg/mL pendant 7 jours successifs utilisée a été bien choisie pour induire des faibles variations au niveau des protéomes étudiés. L'analyse des différentes voies de signalisation et de processus biologiques a montré que les protéomes des organes étudiés cerveau, foie et poumon ont des similitudes et des divergences dans la façon d'interagir en vers les NPs de fer. En fait, suite à l'administration intranasale des NPs de fer, le cerveau semble être impacté de façon plus ou moins équivalente à celle des poumons. Cette observation pourrait être tout à fait correcte car la voie intranasale est liée directement au cerveau par le nerf olfactif et aux poumons par le système respiratoire.

Comme dans la réponse cellulaire aux NPs de fer par le traitement de 24h des cellules SH-SY5Y, les processus biologiques les plus prononcés sont la réponse au stress oxydatif, l'inflammation, l'apoptose, la perturbation du cytosquelette, l'induction du système immunitaire et le développement du cancer. De ce fait, la réalisation des études protéomiques *in vitro* et *in vivo* présente un grand intérêt pour la compréhension des effets et l'évaluation de la toxicité dans deux systèmes biologiques différents. Un seul point qui pourrait être discutable est le fait que les cellules utilisées dans l'étude *in vitro* venaient de l'Homme alors que l'étude *in vivo* a été faite sur le rat Wistar. Malgré l'origine différente des modèles utilisés dans ces travaux de thèse. Le résultat montre bien la similitude entre les deux. D'ailleurs, cette différence pourrait être aussi enrichissante pour l'évaluation de la toxicité des NPs de fer.

D'après la littérature, les investigations de la toxicité des NPs sur les modèles animaux ne sont pas assez nombreuses que les études réalisées *in vitro*. Ceci pourrait être dû en premier lieu à l'éthique, à la difficulté de la réalisation des expériences *in vivo* par rapport aux expériences *in vitro*, en plus des différences physiologiques entre les animaux et l'Homme. Néanmoins, les études *in vivo* présentent toujours un passage obligatoire essentiellement pour le test de tout produit pharmaceutique ou médical avant de passer aux essais sur l'Homme.

Au niveau cérébral, lors de l'étude physiopathologique on a détecté une perturbation de la teneur cérébrale des catécholamines à savoir la dopamine et la norépinephrine dans l'homogénat de cerveau en augmentant leur expression. Cette variation n'a pas été accompagnée d'une perturbation des concentrations des oligo-éléments notamment Fe, Zn, Cu et Mn au niveau du cerveau. Par contre, l'étude protéomique a montré que les observations physiopathologiques ont été plus prononcées au niveau moléculaire par la perturbation de plusieurs protéines au niveau du cerveau. Effectivement, les voies de signalisation perturbées comportent principalement la voie de signalisation de la sérotonine (5HT), la voie « amyloid secretase » de la maladie d'Alzheimer, la voie de la maladie de Parkinson, et la voie de la dopamine et de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). De ce fait, ces résultats de la protéomique suggèrent un dosage complémentaire d'autres neurotransmetteurs à savoir la sérotonine et le GABA, ce qui serait intéressant pour avoir une vision globale sur l'effet des NPs de fer sur l'homéostasie des neurotransmetteurs au niveau cérébral.

Les processus inflammatoires ainsi que la réponse à l'inflammation et au stress oxydatif étaient parmi les processus biologiques les plus apparents suite à l'administration des NPs de fer. Au niveau hépatique, nous avons observé une stimulation de l'inflammation mise en évidence par l'augmentation du taux des plaquettes dans le sang, la diminution de taux de fer sérique et le syndrome inflammatoire au niveau de la structure hépatique. L'analyse protéomique était complémentaire pour ces observations. En effet, l'étude protéomique montre que les protéines connues comme anti-oxydantes en réponse au stress oxydatif ont été surexprimées par l'organisme à savoir l'anhydrase carbonique 3 [222,223], les Glutathion S-transférase alpha-1 et Mu2 [224–226], la catalase [63,181,227–229] et l'isocitrate déshydrogénase [230–232] pour lutter contre le stress oxydatif et se remettre dans les conditions normales d'homéostasie.

Les résultats de l'étude protéomique des protéomes cérébral, hépatique et pulmonaire sont en concordance avec nos résultats de l'étude physiopathologique. En effet, les voies de signalisation trouvées comme perturbées sont liées aux effets trouvés avec les tests

biochimiques, hématologiques et histologiques ainsi que le dosage des neurotransmetteurs et du contenu de fer dans le cerveau suite à l'administration intranasale des NPs de fer. Même si au niveau du poumon, l'examen histologique n'a pas mis en évidence la réponse inflammatoire comme pour le foie, l'étude approfondie du protéome pulmonaire suggère une réponse inflammatoire et stimulation du système immunitaire par la surexpression des protéines impliquées dans ces phénomènes notamment l'annexine [233–235], les histones H1.5 et H2A [236,237], et les protéines S100-A8 et S100-A9 [238]. La dérégulation de ces protéines n'a pas induit d'effet sur le phénotype du poumon. Des doses supérieures ou une plus longue exposition peuvent élucider l'impact sur le poumon.

L'effet sur le cytosquelette a été marqué par la variation des protéines de cytosquelette principalement l'actine et la tubuline. Cet effet a été déjà reporté par plusieurs études réalisées sur des modèles cellulaires. A notre connaissance, notre étude est la première à mettre cet effet en évidence sur les cellules de neuroblastome SH-SY5Y et chez l'animal. L'impact sur le cytosquelette pourrait être expliqué par les effets que peuvent induire les NPs au moment de leur internalisation dans les cellules. Ainsi, selon la taille, la forme, la charge et la composition de surface, les NPs induisent des perturbations morphologiques plus ou moins importantes au niveau des cellules et des tissus. Néanmoins, même l'adsorption des NPs au niveau des membranes cellulaires peut aussi induire des effets sans que les NPs pénètrent dans les cellules.

Pour résumer, l'étude protéomique approfondie des protéomes du cerveau, du foie et du poumon a permis d'évaluer la toxicité des NPs de fer au niveau protéique et moléculaire. Les résultats obtenus présentent un support très important pour l'estimation et la compréhension des effets potentiellement toxiques de ces NPs. De cette étude, on pourrait dire que les NPs de fer présentent une certaine toxicité non négligeable de point de vue moléculaire et physiopathologique. Ainsi, leur utilisation dans le domaine biomédical doit être « prise avec des pincettes » et d'autres études approfondies doivent être menées pour éviter au maximum tout risque lié à l'exposition à ces NPs de fer, d'améliorer leur biocompatibilité et ainsi d'augmenter leurs avantages.

**CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

VII. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif des travaux de recherche de ma thèse était d'évaluer la toxicité des nanoparticules de fer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ par des tests *in vitro* et *in vivo*.

Dans la première partie, *in vitro*, nous avons utilisé la lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y comme modèle d'étude. Une gamme de concentration de NPs de fer ou de FeCl_3 (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 and 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$) a été effectuée pour étudier la toxicité de ces NPs ou des ions ferriques sur la viabilité cellulaire, la prolifération, le stress oxydatif, l'ADN et l'homéostasie du fer. Pour se faire, plusieurs techniques ont été utilisées telles que la culture cellulaire, la cytométrie en flux, la microscopie à fluorescence et le test des comètes et la spectrométrie de masse à plasma induit ICP-MS. Les effets ont été recherchés aussi sur le plan moléculaire et les variations protéiques par les outils de la protéomique quantitative basée sur la spectrométrie de masse.

Nos principaux résultats ont montré que l'utilisation de trois tailles différentes des NPs de fer (14, 22 et 30 nm) induit un détachement cellulaire, des changements morphologiques cellulaires, une internalisation des NPs de fer et une mortalité cellulaire d'une manière dépendante de la taille et de la concentration des NPs de fer dans les milieux de culture. Les NPs de fer ont induit de légers dommages génotoxiques testés par un test de comète modifié sans affecter le cycle cellulaire, la fonction mitochondriale, l'intégrité de la membrane, le niveau de calcium intracellulaire et la génération de ROS. Nous avons utilisé le FeCl_3 pour comparer également les effets des NPs de fer et du fer ferrique en incubant les cellules dans les mêmes conditions dans les deux cas. Dans tous les essais réalisés, les NPs de fer présentaient plus de toxicité que le fer ferrique. Le dosage du fer intracellulaire par l'ICP-MS et la microscopie à fluorescence « Darkfield » nous ont montré l'internalisation et l'accumulation des NPs de fer au niveau des cellules SH-SY5Y sous forme de petits amas de particules de taille nanométrique et des agglomérats de taille micrométrique. Ceci suggère que cette internalisation est très probablement faite par l'intermédiaire de la pinocytose et la phagocytose. Les tests des comètes et de la 8-oxoguanidine ont montré que les NPs de fer ont un effet génotoxique par fragmentation de l'ADN. Cependant, le test de cytométrie en flux n'a pas montré d'effets sur le cycle cellulaire avec la dose la plus élevée 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

L'analyse protéomique globale de l'effet des NPs de fer et du fer ionique a permis de quantifier près de 700 protéines parmi lesquelles 14 % ont été dérégulées soit à la baisse soit à la hausse. Ceci suggère que la dose LD10 utilisée lors du traitement des cellules a été bien choisie pour induire des faibles variations qui sont liées uniquement aux traitements par les NPs ou bien l'ion et non pas à la mort cellulaire. Suite à l'analyse du protéome cellulaire, nous reportons pour la première fois, à notre connaissance, que les NPs de fer ont des effets non seulement sur le cytosquelette mais aussi sur la viabilité cellulaire par la dérégulation des protéines nano spécifiques « Barrier-to-autointegration factor, Histone H2A type 1-A et Homeoboxprotein aristaleless-like 3 ». Cela ferait de ces trois protéines des biomarqueurs d'exposition aux NPs de fer à l'issue de l'étude sur les cellules SH-SY5Y.

Pour conclure, les investigations cytotoxique, génotoxique et protéomique suite aux traitements des cellules par les NPs de fer ou par le fer ionique ont permis d'étudier le profil global suite à ce genre d'exposition. Les études de cytotoxicité et de génotoxicité ont montré que les NPs de fer sont plus toxiques pour les cellules SH-SY5Y que les ions ferriques. L'étude protéomique a montré que le point commun entre la réponse aux ions ferriques et aux NPs de fer est la perturbation de cytosquelette. Cependant la réponse spécifique était de type métabolique et développement biologique pour les ions ferriques, par contre elle est de type apoptotique pour les NPs de fer.

Dans la deuxième partie, *in vivo*, nous avons étudié les effets des NPs de fer sur la physiopathologie du rat Wistar adulte par trois voies d'administration : intranasale, intraveineuse et orale. Pour les deux premières, les rats ont été instillés par les narines ou injectés par la veine caudale pendant 7 jours consécutifs à une dose de 10 mg / kg de poids corporel. L'administration orale a été sous forme de dose unique à deux concentrations différentes de NPs de fer 100 et 200 mg / kg de poids corporel. Plusieurs paramètres ont été évalués y compris la cognition, la composition sanguine, les paramètres biochimiques, l'histologie des organes (foie, poumon et cerveau), et l'homéostasie des éléments traces. Globalement, les tests du labyrinthe en croix surélevé, de l'open field et de la piscine de Morris ont démontré que les NPs de fer n'induisent pas de modification concernant l'anxiété, la locomotion, l'apprentissage et la mémoire chez le rat. En effet, aucun effet significatif n'a été observé suite à l'administration des NPs de fer par les trois voies. Cependant, ces NPs provoquent une perturbation des niveaux des catécholamines et des éléments traces au niveau cérébral sans forcément être accumulées dans le cerveau. Les effets les plus marqués ont été observés suite à l'instillation intranasale des NPs. De même, les NPs de fer administrées par

voie intranasale sont à l'origine de l'inflammation mise en évidence par la diminution de taux du fer sérique, la thrombocytose et les foyers inflammatoires au niveau hépatique. L'analyse comparative des trois voies d'administration a montré que la voie intraveineuse et la « plus sûre » par rapport à la voie orale et intranasale.

Sur le plan moléculaire, l'analyse protéomique non ciblée basée sur la spectrométrie de masse des effets des NPs de fer sur les protéomes du cerveau, du foie et du poumon a permis de quantifier plus que 1500 protéines. Au niveau du cerveau, nous avons quantifié 1541 protéines parmi lesquelles près de 8% ont été dérégulées soit à la baisse soit à la hausse. Au niveau du foie, nous avons quantifié 1125 parmi lesquelles 6% ont été dérégulées. Au niveau du poumon, nous avons quantifié 1128 protéines parmi lesquelles près de 8% ont été dérégulées. Ceci suggère que la dose utilisée de 10 mg/mL pendant 7 jours successifs utilisée a été bien choisie pour induire des faibles variations au niveau des protéomes étudiés sans induire un taux élevé de dommages cellulaires ou de mortalité. L'analyse des différentes voies de signalisation et de processus biologiques a montré que les protéomes des organes étudiés cerveau, foie et poumon ont des similitudes et des divergences dans la façon d'interagir en vers les NPs de fer. Les processus inflammatoires et la réponse à l'inflammation et au stress oxydatif étaient parmi les processus biologiques les plus apparents suite à l'administration des NPs de fer. L'effet sur le cytosquelette a été marqué par la variation des protéines de cytosquelette principalement l'actine et la tubuline.

En conclusion, l'étude protéomique approfondie des protéomes du cerveau, du foie et du poumon a permis d'évaluer la toxicité des NPs de fer au niveau protéique et moléculaire. Les résultats obtenus présentent un support très important pour l'estimation et la compréhension des effets potentiellement toxiques de ces NPs. De cette étude, on pourrait dire que les NPs de fer présentent une certaine toxicité non négligeable de point de vue moléculaire et physiopathologique. Ainsi, leur utilisation dans le domaine biomédical doit être prise avec beaucoup de précaution et d'autres études approfondies sont nécessaires pour éviter au maximum tout risque lié à l'exposition à ces NPs de fer afin d'améliorer leur biocompatibilité et ainsi augmenter leurs avantages.

Comme tous les travaux de recherche, nos études présentent des limites. Pour cela, les recherches sur les NPs de fer vont continuer et d'autres expériences se trouvent nécessaires pour mieux évaluer les effets de ces NPs avant toute application sur l'Homme. Parmi les expériences que nous suggérons, nous pouvons citer :

- L'exposition à long terme pour évaluer la toxicité chronique *in vitro* et *in vivo*,
- Le marquage des NPs de fer avec des fluorochromes pour pouvoir les localiser avec précision aux niveaux des organes des rats par l'Imagerie par Résonance Magnétique ou au niveau des organites cellulaires par imagerie confocale,
- L'étude la possibilité du passage des NPs de fer à travers la barrière hémato-encéphalique,
- L'étude les effets des NPs de fer sur les différentes structures cérébrales,
- Etendre la validation des protéines dérégulées au niveau des cellules SH-SY5Y pour valider d'autres candidats,
- Valider par les techniques de Western Blot et ELISA les protéines d'intérêt dérégulées au niveau des organes de rat (cerveau, foie et poumon),
- Enfin, l'étude les protéomes des différents organes suite à l'administration intraveineuse serait intéressante vu que c'est la voie la plus utilisée en Biomédecine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. Baek, H.E. Chung, J. Yu, J.A. Lee, T.H. Kim, J.M. Oh, W.J. Lee, S.M. Paek, J.K. Lee, J. Jeong, J.H. Choy, S.J. Choi, Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles, *Int J Nanomedicine*. 7 (2012) 3081–3097. doi:10.2147/IJN.S32593.
- [2] M. Pitkethly, Nanotechnology: past, present, and future, *Nano Today*. 3 (2008) 6. doi:10.1016/S1748-0132(08)70029-X.
- [3] S. Bhatia, Natural polymer drug delivery systems: Nanoparticles, plants, and algae, 2016. doi:10.1007/978-3-319-41129-3.
- [4] A.L. Cortajarena, D. Ortega, S.M. Ocampo, A. Gonzalez-García, P. Couleaud, R. Miranda, C. Belda-Iniesta, A. Ayuso-Sacido, Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings, *Nanobiomedicine*. 1 (2014) 2. doi:10.5772/58841.
- [5] K. Gajanan, S.N. Tijare, Applications of nanomaterials, in: *Mater. Today Proc.*, 2018: pp. 1093–1096. doi:10.1016/j.matpr.2017.11.187.
- [6] C. Santhosh, V. Velmurugan, G. Jacob, S.K. Jeong, A.N. Grace, A. Bhatnagar, Role of nanomaterials in water treatment applications: A review, *Chem. Eng. J.* 306 (2016) 1116–1137. doi:10.1016/j.cej.2016.08.053.
- [7] S. Raj, U. Sumod, S. Jose, M. Sabitha, Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4 (2012) 186. doi:10.4103/0975-7406.99016.
- [8] P.A. Schulte, D.B. Trout, Nanomaterials and worker health: Medical surveillance, exposure registries, and epidemiologic research, *J. Occup. Environ. Med.* 53 (2011). doi:10.1097/JOM.0b013e31821b1b28.
- [9] J. Ai, E. Biazar, M. Jafarpour, M. Montazeri, A. Majdi, S. Aminifard, M. Zafari, H.R. Akbari, H.G. Rad, Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs., *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 1117–1127. doi:10.2147/IJN.S16603.
- [10] A. Seaton, L. Tran, R. Aitken, K. Donaldson, Nanoparticles, human health hazard and regulation., *J. R. Soc. Interface*. 7 Suppl 1 (2010) S119–S129. doi:10.1098/rsif.2009.0252.focus.
- [11] G. Oberdörster, A. Elder, A. Rinderknecht, Nanoparticles and the Brain: Cause for Concern?, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009) 4996–5007. doi:10.1166/jnn.2009.GR02.
- [12] C.D. Klaassen, Casarett and Doull's Toxicology-The Basic Science of Poisons, 2008. doi:10.1036/0071470514.
- [13] M. Skocaj, M. Filipic, J. Petkovic, S. Novak, Titanium dioxide in our everyday life; Is it safe?, *Radiol. Oncol.* 45 (2011) 227–247. doi:10.2478/v10019-011-0037-0.
- [14] Y. Yoshioka, K. Higashisaka, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application, (2014) 259–271. doi:10.1007/978-4-431-55139-3.
- [15] F. Larese Filon, M. Mauro, G. Adami, M. Bovenzi, M. Crosera, Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72 (2015) 310–322. doi:10.1016/j.yrtph.2015.05.005.
- [16] F.F. Larese, F. D'Agostin, M. Crosera, G. Adami, N. Renzi, M. Bovenzi, G. Maina, Human skin

- penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin, *Toxicology*. 255 (2009) 33–37. doi:10.1016/j.tox.2008.09.025.
- [17] F. Larese Filon, M. Crosera, G. Adami, M. Bovenzi, F. Rossi, G. Maina, Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin, *Nanotoxicology*. 5 (2011) 493–501. doi:10.3109/17435390.2010.551428.
- [18] F. Larese Filon, M. Crosera, E. Timeus, G. Adami, M. Bovenzi, J. Ponti, G. Maina, Human skin penetration of cobalt nanoparticles through intact and damaged skin, *Toxicol. Vitro*. 27 (2013) 121–127. doi:10.1016/j.tiv.2012.09.007.
- [19] M. Senzui, T. Tamura, K. Miura, Y. Ikarashi, Y. Watanabe, M. Fujii, Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro, *J. Toxicol. Sci*. 35 (2010) 107–113. doi:10.2131/jts.35.107.
- [20] R.D. Brohi, L. Wang, H.S. Talpur, D. Wu, F.A. Khan, D. Bhattarai, Z.U. Rehman, F. Farmanullah, L.J. Huo, Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: A review, *Front. Pharmacol*. 8 (2017) 1–22. doi:10.3389/fphar.2017.00606.
- [21] V.E. Kagan, N. V. Konduru, W. Feng, B.L. Allen, J. Conroy, Y. Volkov, I.I. Vlasova, N.A. Belikova, N. Yanamala, A. Kapralov, Y.Y. Tyurina, J. Shi, E.R. Kisin, A.R. Murray, J. Franks, D. Stolz, P. Gou, J. Klein-Seetharaman, B. Fadeel, A. Star, A.A. Shvedova, Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation, *Nat. Nanotechnol*. 5 (2010) 354–359. doi:10.1038/nnano.2010.44.
- [22] A.S. Arbab, L.B. Wilson, P. Ashari, E.K. Jordan, B.K. Lewis, J.A. Frank, A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: Implications for cellular magnetic resonance imaging, *NMR Biomed*. 18 (2005) 383–389. doi:10.1002/nbm.970.
- [23] M. Lévy, F. Lagarde, V.A. Maraloiu, M.G. Blanchin, F. Gendron, C. Wilhelm, F. Gazeau, Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: Follow-up of magnetic, structural and chemical properties, *Nanotechnology*. 21 (2010). doi:10.1088/0957-4484/21/39/395103.
- [24] Wahajuddin, S. Arora, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 3445–3471. doi:10.2147/IJN.S30320.
- [25] E.S. Gurzau, C. Neagu, A.E. Gurzau, Essential metals - Case study on iron, *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 56 (2003) 190–200. doi:10.1016/S0147-6513(03)00062-9.
- [26] R.M. Cornell, U. Schwertmann, The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses, in: Wiley-Vch, 2003: p. ISBN: 3-527-30274-3. doi:10.1002/3527602097.
- [27] G. Dura, B. Szalay, Particle exposure through the indoor air environment, in: NATO Secur. through Sci. Ser. C Environ. Secur., 2007: pp. 271–276. doi:10.1007/978-1-4020-6076-2_2.
- [28] K.S. Galea, C. Mair, C. Alexander, F. De Vocht, M. Van Tongeren, Occupational Exposure to Respirable Dust, Respirable Crystalline Silica and Diesel Engine Exhaust Emissions in the London Tunnelling Environment, *Ann. Occup. Hyg*. 60 (2015) 263–269. doi:10.1093/annhyg/mev067.
- [29] C.T. Wang, S.H. Ro, Nanocluster iron oxide-silica aerogel catalysts for methanol partial oxidation, *Appl. Catal. A Gen*. 285 (2005) 196–204. doi:10.1016/j.apcata.2005.02.029.

- [30] T. Naseem, M.A. Farrukh, Antibacterial activity of green synthesis of iron nanoparticles using lawsonia inermis and gardenia jasminoides leaves extract, *J. Chem.* 2015 (2015). doi:10.1155/2015/912342.
- [31] S.-N. Sun, C. Wei, Z.-Z. Zhu, Y.-L. Hou, S.S. Venkatraman, Z.-C. Xu, Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications, *Chinese Phys. B.* 23 (2014) 37503. doi:10.1088/1674-1056/23/3/037503.
- [32] A. Ali, H. Zafar, M. Zia, I. ul Haq, A.R. Phull, J.S. Ali, A. Hussain, Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 9 (2016) 49–67. doi:10.2147/NSA.S99986.
- [33] G. Ennas, A. Musinu, G. Piccaluga, D. Zedda, D. Gatteschi, C. Sangregorio, J.L. Stanger, G. Concas, G. Spano, Characterization of Iron Oxide Nanoparticles in an Fe₂O₃–SiO₂ Composite Prepared by a Sol–Gel Method, *Chem. Mater.* 10 (1998) 495–502. doi:10.1021/cm970400u.
- [34] S.G. Ullattil, P. Periyat, Sol-Gel Materials for Energy, Environment and Electronic Applications, (2017) 271–283. doi:10.1007/978-3-319-50144-4.
- [35] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, W.S. Kim, Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2015). doi:10.1088/1468-6996/16/2/023501.
- [36] E. Umut, Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications, *Mod. Surf. Eng. Treat.* (2013) 185–208. doi:10.5772/52807.
- [37] T. Stueckle, J. Antonini, Y. Rojanasakul, V. Castranova, Y. Yang, L. Wang, Potential Toxicity and Underlying Mechanisms Associated with Pulmonary Exposure to Iron Oxide Nanoparticles: Conflicting Literature and Unclear Risk, *Nanomaterials.* 7 (2017) 307. doi:10.3390/nano7100307.
- [38] I. Van Rooy, S. Cakir-Tascioglu, W.E. Hennink, G. Storm, R.M. Schiffelers, E. Mastrobattista, In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain, *Pharm. Res.* 28 (2011) 456–471. doi:10.1007/s11095-010-0291-7.
- [39] H. Jing, J. Wang, P. Yang, X. Ke, G. Xia, B. Chen, Magnetic fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapy agents interact synergistically to induce apoptosis in lymphoma cells, *Int. J. Nanomedicine.* 5 (2010) 999–1004. doi:10.2147/IJN.S14957.
- [40] Z. Sun, M. Worden, Y. Wroczynskyj, V. Yathindranath, J. van Lierop, T. Hegmann, D.W. Miller, Magnetic field enhanced convective diffusion of iron oxide nanoparticles in an osmotically disrupted cell culture model of the blood-brain barrier, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 3013–3026. doi:10.2147/IJN.S62260.
- [41] A. Elias, A. Tsourkas, Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles., *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* (2009) 720–726. doi:10.1182/asheducation-2009.1.720.
- [42] M. Lu, M.H. Cohen, D. Rieves, R. Pazdur, FDA report: Ferumoxytol for intravenous iron therapy in adult patients with chronic kidney disease, *Am. J. Hematol.* 85 (2010) 315–319. doi:10.1002/ajh.21656.
- [43] C. Hoskins, The Use of Iron Oxide Nanoparticles for Pancreatic Cancer Therapy, *J. Nanomedicine Res.* 1 (2014) 1–17. doi:10.15406/jnmr.2014.01.00004.

- [44] Y. Kim, S.D. Kong, L.H. Chen, T.R. Pisanic, S. Jin, V.I. Shubayev, In vivo nanoneurotoxicity screening using oxidative stress and neuroinflammation paradigms, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9 (2013) 1057–1066. doi:10.1016/j.nano.2013.05.002.
- [45] S. Shin, I. Song, S. Um, Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity, *Nanomaterials*. 5 (2015) 1351–1365. doi:10.3390/nano5031351.
- [46] a R. Gliga, S. Skoglund, I.O. Wallinder, B. Fadeel, H.L. Karlsson, Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release, *Part Fibre Toxicol.* 11 (2014) 11. doi:10.1186/1743-8977-11-11.
- [47] H. Qiao, W. Liu, H. Gu, D. Wang, Y. Wang, The transport and deposition of nanoparticles in respiratory system by inhalation, *J. Nanomater.* 2015 (2015). doi:10.1155/2015/394507.
- [48] H.M. Braakhuis, F.R. Cassee, P.H.B. Fokkens, L.J.J. De La Fonteyne, A.G. Oomen, P. Krystek, W.H. De Jong, H. Van Loveren, M.V.D.Z. Park, Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study, *Nanotoxicology*. 10 (2016) 63–73. doi:10.3109/17435390.2015.1012184.
- [49] M. Zhu, G. Nie, H. Meng, T. Xia, A. Nel, Y. Zhao, Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 622–631. doi:10.1021/ar300031y.
- [50] K. Murugan, Y.E. Choonara, P. Kumar, D. Bijukumar, L.C. du Toit, V. Pillay, Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures, *Int. J. Nanomedicine*. 10 (2015) 2191–2206. doi:10.2147/IJN.S75615.
- [51] S. Zhang, H. Gao, G. Bao, Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis, *ACS Nano*. 9 (2015) 8655–8671. doi:10.1021/acsnano.5b03184.
- [52] S. Skoglund, J. Hedberg, E. Yunda, A. Godymchuk, E. Blomberg, I. Odnevall Wallinder, Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions - Four case studies, *PLoS One*. 12 (2017) 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0181735.
- [53] R. Atif, F. Inam, Reasons and remedies for the agglomeration of multilayered graphene and carbon nanotubes in polymers, *Beilstein J. Nanotechnol.* 7 (2016) 1174–1196. doi:10.3762/bjnano.7.109.
- [54] S. V. Sokolov, K. Tschulik, C. Batchelor-McAuley, K. Jurkschat, R.G. Compton, Reversible or Not? Distinguishing Agglomeration and Aggregation at the Nanoscale, *Anal. Chem.* 87 (2015) 10033–10039. doi:10.1021/acs.analchem.5b02639.
- [55] H. Bahadar, F. Maqbool, K. Niaz, M. Abdollahi, Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models, *Iran. Biomed. J.* 20 (2016) 1–11. doi:10.7508/ibj.2016.01.001.
- [56] B. Dahneke, Simple kinetic theory of Brownian diffusion in vapors and aerosols, *Theory Dispersed Multiph. Flow. Proc. an Adv. Semin.* (1983) 97–133. doi:10.1016/B978-0-12-493120-6.50011-8.
- [57] S. Parasuraman, Toxicological screening, *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2 (2011) 74. doi:10.4103/0976-500X.81895.
- [58] C.T. Han, M.J. Kim, S.H. Moon, Y.R. Jeon, J.S. Hwang, C. Nam, C.W. Park, S.H. Lee, J.B. Na, C.S. Park, H.W. Park, J.M. Lee, H.S. Jang, S.H. Park, K.G. Han, Y.W. Choi, H.Y. Lee, J.K. Kang, Acute

- p>and 28-day subacute toxicity studies of hexane extracts of the roots of
- Lithospermum erythrorhizon*
- in sprague-dawley rats,
- Toxicol. Res.*
- 31 (2015) 403–414. doi:10.5487/TR.2015.31.4.403.
- [59] A. Domínguez, G.G. Brown, K.D. Sautter, C.M.R. De Oliveira, E.C. De Vasconcelos, C.C. Niva, M.L.C. Bartz, J.C. Bedano, Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil, *Sci. Rep.* 6 (2016). doi:10.1038/srep19731.
 - [60] B. González-Flecha, Oxidant mechanisms in response to ambient air particles, *Mol. Aspects Med.* 25 (2004) 169–182. doi:10.1016/j.mam.2004.02.017.
 - [61] J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J.F. Heilier, M. Delos, M. Arras, A. Fonseca, J.B. Nagy, D. Lison, Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (2005) 221–231. doi:10.1016/j.taap.2005.01.008.
 - [62] M.I. Khan, A. Mohammad, G. Patil, S.A.H. Naqvi, L.K.S. Chauhan, I. Ahmad, Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles, *Biomaterials.* 33 (2012) 1477–1488. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.080.
 - [63] S. Alarifi, D. Ali, S. Alkahtani, M.S. Alhader, Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line, *Biol. Trace Elem. Res.* 159 (2014) 416–424. doi:10.1007/s12011-014-9972-0.
 - [64] L. Wang, L. Wang, W. Ding, F. Zhang, Acute Toxicity of Ferric Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Rats, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (2010) 8617–8624. doi:10.1166/jnn.2010.2483.
 - [65] A. Shirband, H. Azizian, M. Pourmentezari, M.E. Rezvani, M. Anvari, M. Esmaeilidehaj, Dose-dependent effects of iron oxide nanoparticles on thyroid hormone concentrations in liver enzymes: Possible tissue destruction, *Glob. J. Med. Res. Stud.* 1 (2014) 28–31.
 - [66] L. Sadeghi, V. Yousefi Babadi, H.R. Espanani, Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue., *Bratisl. Lek. Listy.* 116 (2015) 373–8.
 - [67] B.J. Marquis, S.A. Love, K.L. Braun, C.L. Haynes, Analytical methods to assess nanoparticle toxicity, *Analyst.* 134 (2009) 425. doi:10.1039/b818082b.
 - [68] J. Sun, Q. Zhang, Z. Wang, B. Yan, Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 9319–9337. doi:10.3390/ijms14059319.
 - [69] C. Chakraborty, A.R. Sharma, G. Sharma, S.S. Lee, Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity, *J. Nanobiotechnology.* 14 (2016) 1–13. doi:10.1186/s12951-016-0217-6.
 - [70] S. Lanone, F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Maillot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix, P. Hoet, Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines, *Part. Fibre Toxicol.* 6 (2009) 1–12. doi:10.1186/1743-8977-6-14.
 - [71] C.F. Jones, D.W. Grainger, In vitro assessments of nanomaterial toxicity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 438–456. doi:10.1016/j.addr.2009.03.005.
 - [72] S. Triboulet, C. Aude-Garcia, M. Carrière, H. Diemer, F. Proamer, A. Habert, M. Chevallet, V. Collin-Faure, J.-M. Strub, D. Hanau, A. Van Dorsselaer, N. Herlin-Boime, T. Rabilloud, Molecular Responses of Mouse Macrophages to Copper and Copper Oxide Nanoparticles

- Inferred from Proteomic Analyses, *Mol. Cell. Proteomics*. 12 (2013) 3108–3122. doi:10.1074/mcp.M113.030742.
- [73] C. Awortwe, P.S. Fasinu, B. Rosenkranz, Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges., *J. Pharm. Pharm. Sci. a Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Société Can. Des Sci. Pharm.* 17 (2014) 1–19. doi:10.18433/J30K63.
- [74] Y. Lai, P.C. Chiang, J.D. Blom, N. Li, K. Shevlin, T.G. Brayman, Y. Hu, J.G. Selbo, L.G. Hu, Comparison of in vitro nanoparticles uptake in various cell lines and in vivo pulmonary cellular transport in intratracheally dosed rat model, *Nanoscale Res. Lett.* 3 (2008) 321–329. doi:10.1007/s11671-008-9160-2.
- [75] P. Chairuangkitti, S. Lawanprasert, S. Roytrakul, S. Aueviriyavit, D. Phummiratch, K. Kulthong, P. Chanvorachote, R. Maniratanachote, Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways, *Toxicol. Vitro*. 27 (2013) 330–338. doi:10.1016/j.tiv.2012.08.021.
- [76] B. Ekstrand-Hammarström, C.M. Akfur, P.O. Andersson, C. Lejon, L. Österlund, A. Bucht, Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B, *Nanotoxicology*. 6 (2012) 623–634. doi:10.3109/17435390.2011.598245.
- [77] L. Capasso, M. Camatini, M. Gualtieri, Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells, *Toxicol. Lett.* 226 (2014) 28–34. doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.040.
- [78] T. He, J. Long, J. Li, L. Liu, Y. Cao, Toxicity of ZnO nanoparticles (NPs) to A549 cells and A549 epithelium in vitro: Interactions with dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 56 (2017) 233–240. doi:10.1016/j.etap.2017.10.002.
- [79] Z. Wang, N. Li, J. Zhao, J.C. White, P. Qu, B. Xing, CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: Cellular uptake, location, export, and genotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 1512–1521. doi:10.1021/tx3002093.
- [80] E. Moschini, M. Gualtieri, D. Gallinotti, E. Pezzolato, M. Camatini, P. Mantecca, Metal oxide nanoparticles induce cytotoxic effects on human lung epithelial cells A549, *Assoc. Ital. Di Ing. Chim.* (2009). www.aidic.it/aaas10/webpapers/64Moschini.pdf.
- [81] H.R. Xie, L.S. Hu, G.Y. Li, SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, *Chin Med J.* 123 (2010) 1086–1092. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021.
- [82] J.H. Park, S. Gurunathan, Y.-J. Choi, J.W. Han, H. Song, J.-H. Kim, Silver nanoparticles suppresses brain-derived neurotrophic factor-induced cell survival in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, *J. Ind. Eng. Chem.* 47 (2017) 62–73. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.11.015.
- [83] S. Rahmani, L. Mogharizadeh, F. Attar, S.M. Rezayat, S.E. Mousavi, M. Falahati, Probing the interaction of silver nanoparticles with tau protein and neuroblastoma cell line as nervous system models, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2017) 1–15. doi:10.1080/07391102.2017.1407673.
- [84] L. Wang, Y. Liu, W. Li, X. Jiang, Y. Ji, X. Wu, L. Xu, Y. Qiu, K. Zhao, T. Wei, Y. Li, Y. Zhao, C. Chen, Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: Implications for cancer therapy, *Nano Lett.* 11 (2011) 772–780. doi:10.1021/nl103992v.

- [85] A.J. Hill, H. Teraoka, W. Heideman, R.E. Peterson, Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity, *Toxicol. Sci.* 86 (2005) 6–19. doi:10.1093/toxsci/kfi110.
- [86] Y. Yang, Z. Qin, W. Zeng, T. Yang, Y. Cao, C. Mei, Y. Kuang, Toxicity assessment of nanoparticles in various systems and organs, *Nanotechnol. Rev.* 6 (2017) 279–289. doi:10.1515/ntrev-2016-0047.
- [87] V. Stone, H. Johnston, R.P.F. Schins, Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations in vitro methods for nanotoxicology Vicki Stone et al., *Crit. Rev. Toxicol.* 39 (2009) 613–626. doi:10.1080/10408440903120975.
- [88] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [89] C.M. Sayes, K.L. Reed, D.B. Warheit, Assessing toxicology of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles, *Toxicol. Sci.* 97 (2007) 163–180. doi:10.1093/toxsci/kfm018.
- [90] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Curr. Protoc. Immunol. Appendix 3* (2001) Appendix 3B. doi:10.1002/0471142735.ima03bs21.
- [91] J.M. Hillegass, M.B. Macpherson, J.C. Magill, M.F. Byl, B. Goldwaser, M.P. Instructor, B. Yates, J.R. Morency, L.B. Kaban, W.C. Guralnick, M.J.T. Associate, A. Manuscript, C. Smoke, S. Tobacco, J.C. Magill, M.F. Byl, B. Goldwaser, M.P. Instructor, B. Yates, J.R. Morency, L.B. Kaban, W.C. Guralnick, M.J.T. Associate, A. Manuscript, C. Oxide, N. Induce, O. Stress, J.M. Hillegass, M.B. Macpherson, NIH Public Access, 3 (2010) 1–17. doi:10.1002/wnan.54.Assessing.
- [92] M. Van Engeland, L.J.W. Nieland, F.C.S. Ramaekers, B. Schutte, C.P.M. Reutelingsperger, Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure, *Cytometry.* 31 (1998) 1–9. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R.
- [93] S. Nagata, H. Nagase, K. Kawane, N. Mukae, H. Fukuyama, Degradation of chromosomal DNA during apoptosis, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 108–116. doi:10.1038/sj.cdd.4401161.
- [94] S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516. doi:10.1080/01926230701320337.
- [95] J. Kain, H.L. Karlsson, L. Möller, DNA damage induced by micro- and nanoparticles - interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay, *Mutagenesis.* 27 (2012) 491–500. doi:10.1093/mutage/ges010.
- [96] 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. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- [97] C.A. Barnes, A. Elsaesser, J. Arkusz, A. Smok, J. Palus, A. Leśniak, A. Salvati, J.P. Hanrahan, W.H. de Jong, E. Dziubałtowska, M. Stepnik, K. Rydzyński, G. McKerr, I. Lynch, K.A. Dawson, C.V. Howard, Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity., *Nano Lett.* 8 (2008) 3069–3074. doi:10.1021/nl801661w.
- [98] B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.*

- 31 (1975) 347–363. doi:10.1016/0165-1161(75)90046-1.
- [99] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 113 (1983) 173–215. doi:10.1016/0165-1161(83)90010-9.
- [100] Y. Li, D.H. Chen, J. Yan, Y. Chen, R.A. Mittelstaedt, Y. Zhang, A.S. Biris, R.H. Heflich, T. Chen, Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 745 (2012) 4–10. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.11.010.
- [101] T. Chen, J. Yan, Y. Li, Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles, *J. Food Drug Anal.* 22 (2014) 95–104. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.008.
- [102] X. Guo, Y. Li, J. Yan, T. Ingle, M.Y. Jones, N. Mei, M.D. Boudreau, C.K. Cunningham, M. Abbas, A.M. Paredes, T. Zhou, M.M. Moore, P.C. Howard, T. Chen, Size- and coating-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using in vitro standard assays, 2016. doi:10.1080/17435390.2016.1214764.
- [103] B. Hellack, C. Nickel, C. Albrecht, T.A.J. Kuhlbusch, S. Boland, A. Baeza-Squiban, W. Wohlleben, R.P.F. Schins, Analytical methods to assess the oxidative potential of nanoparticles: a review, *Environ. Sci. Nano.* 4 (2017) 1920–1934. doi:10.1039/C7EN00346C.
- [104] F.J. Kelly, *Oxidative Stress : Its Role in Air Pollution and Adverse Health Effects*, (2003).
- [105] S.I. Dikalov, D.G. Harrison, Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 372–382. doi:10.1089/ars.2012.4886.
- [106] K.S. Subramanian, Determination of metals in biofluids and tissues: Sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 51 (1996) 291–319. doi:10.1016/0584-8547(95)01425-X.
- [107] J. Szpunar, Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques, *Analyst.* 125 (2000) 963–988. doi:10.1039/a909137h.
- [108] U.S. Patil, S. Adireddy, A. Jaiswal, S. Mandava, B.R. Lee, D.B. Chrisey, In vitro/in vivo toxicity evaluation and quantification of iron oxide nanoparticles, 2015. doi:10.3390/ijms161024417.
- [109] A. Ostrowski, D. Nordmeyer, A. Boreham, C. Holzhausen, L. Mundhenk, C. Graf, M.C. Meinke, A. Vogt, S. Hadam, J. Lademann, E. Ruhl, U. Alexiev, A.D. Gruber, Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques, *Beilstein J. Nanotechnol.* 6 (2015) 263–280. doi:10.3762/bjnano.6.25.
- [110] S. Amara, I. Ben-Slama, I. Mrad, N. Rihane, M. Jeljeli, L. El-Mir, K. Ben-Rhouma, W. Rachidi, M. Sève, H. Abdelmelek, M. Sakly, Acute exposure to zinc oxide nanoparticles does not affect the cognitive capacity and neurotransmitters levels in adult rats, *Nanotoxicology.* 8 (2014) 208–215. doi:10.3109/17435390.2013.879342.
- [111] N.R. Ben Younes, S. Amara, I. Mrad, I. Ben-Slama, M. Jeljeli, K. Omri, J. El Ghoul, L. El Mir, K. Ben Rhouma, H. Abdelmelek, M. Sakly, Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination., *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (2015) 8728–37. doi:10.1007/s11356-014-4002-5.
- [112] I. Ben Slama, S. Amara, I. Mrad1, N. Rihane, K. Omri, J. EL Ghoul, L. EL Mir, K.B.R.H. Abdelmelek, M. Sakly, Sub-Acute Oral Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles in Male Rats, *J. Nanomed. Nanotechnol.* 6 (2015). doi:10.4172/2157-7439.1000284.

- [113] H.S. Huang, J.F. Hainfeld, Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia, *Int. J. Nanomedicine*. 8 (2013) 2521–2532. doi:10.2147/IJN.S43770.
- [114] P. Lin, J.W. Chen, L.W. Chang, J.P. Wu, L. Redding, H. Chang, T.K. Yeh, S.Y. Chung, M.H. Tsai, H.J. Wang, Y.C. Kuo, R.S.H. Yang, Computational and ultrastructural toxicology of a nanoparticle, Quantum Dot 705, in mice, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 6264–6270. doi:10.1021/es800254a.
- [115] X. Liu, J. Tan, I. Hatem, B.L. Smith, Image processing to facilitate histological evaluation of tissue specimens stained with Perl's Prussian blue, *Toxicol. Mech. Methods*. 13 (2003) 213–220. doi:10.1080/15376510309837.
- [116] S. Amara, I. Ben Slama, K. Omri, J. El Ghoul, L. El Mir, K. Ben Rhouma, H. Abdelmelek, M. Sakly, Effects of nanoparticle zinc oxide on emotional behavior and trace elements homeostasis in rat brain, *Toxicol. Ind. Health*. 31 (2015) 1202–1209. doi:10.1177/0748233713491802.
- [117] J.M. de Souza, B. de O. Mendes, A.T.B. Guimarães, A.S. de L. Rodrigues, T.Q. Chagas, T.L. Rocha, G. Malafaia, Zinc oxide nanoparticles in predicted environmentally relevant concentrations leading to behavioral impairments in male swiss mice, *Sci. Total Environ.* 613–614 (2018) 653–662. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.051.
- [118] X. Li, X. Liu, T. Li, X. Li, D. Feng, X. Kuang, J. Xu, X. Zhao, M. Sun, D. Chen, Z. Zhang, X. Feng, SiO₂ nanoparticles cause depression and anxiety-like behavior in adult zebrafish, *RSC Adv.* 7 (2017) 2953–2963. doi:10.1039/C6RA24215D.
- [119] I. M'rad, M. Jeljeli, N. Rihane, P. Hilber, M. Sakly, S. Amara, Aluminium oxide nanoparticles compromise spatial learning and memory performance in rats, *EXCLI J.* 17 (2018) 200–210. doi:10.17179/excli2017-1050.
- [120] E. Sheida, O. Sipailova, S. Miroshnikov, E. Sizova, S. Lebedev, E. Rusakova, S. Notova, The effect of iron nanoparticles on performance of cognitive tasks in rats, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 8700–8710. doi:10.1007/s11356-017-8531-6.
- [121] Y. Ibuki, T. Toyooka, Nanoparticle uptake measured by flow cytometry, *Methods Mol. Biol.* 926 (2012) 157–166. doi:10.1007/978-1-62703-2-1_11.
- [122] R.M. Zucker, E.J. Massaro, K.M. Sanders, L.L. Degn, W.K. Boyes, Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry, *Cytom. Part A*. 77A (2010) 677–685. doi:10.1002/cyto.a.20927.
- [123] R.M. Zucker, J.N.R. Ortenzio, W.K. Boyes, Characterization, detection, and counting of metal nanoparticles using flow cytometry, *Cytom. Part A*. 89 (2016) 169–183. doi:10.1002/cyto.a.22793.
- [124] M. Wade, Y.-C. Li, G. M. Wahl, NIH Public Access, *Nat. Rev. Cancer*. 13 (2013) 83–96. doi:10.1002/ana.22528.Toll-like.
- [125] A.P. Brown, R.M.D. Brydson, N.S. Hondow, Measuring *in vitro* cellular uptake of nanoparticles by transmission electron microscopy, *J. Phys. Conf. Ser.* 522 (2014) 12058. doi:10.1088/1742-6596/522/1/012058.
- [126] E. Fröhlich, Role of omics techniques in the toxicity testing of nanoparticles, *J. Nanobiotechnology*. 15 (2017) 1–22. doi:10.1186/s12951-017-0320-3.
- [127] T.H. Shin, D.Y. Lee, H.S. Lee, H.J. Park, M.S. Jin, M.J. Paik, B. Manavalan, J.S. Mo, G. Lee,

- Integration of metabolomics and transcriptomics in nanotoxicity studies, *BMB Rep.* 51 (2018) 14–20. doi:10.5483/BMBRep.2018.51.1.237.
- [128] B. Kumar, A. Prakash, R.K. Ruhela, B. Medhi, Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development, *Pharmacol. Reports.* 66 (2014) 956–963. doi:10.1016/j.pharep.2014.06.010.
- [129] M. Yamamoto, A. Singh, F. Sava, M. Pui, S.J. Tebbutt, C. Carlsten, MicroRNA expression in response to controlled exposure to diesel exhaust: Attenuation by the antioxidant N-acetylcysteine in a randomized crossover study, *Environ. Health Perspect.* 121 (2013) 670–675. doi:10.1289/ehp.1205963.
- [130] M. Ehrlich, DNA hypomethylation in cancer cells, *Epigenomics.* 1 (2009) 239–259. doi:10.2217/epi.09.33.
- [131] J.S. You, P.A. Jones, Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?, *Cancer Cell.* 22 (2012) 9–20. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.008.
- [132] F. Cheng, D. Theodorescu, I.G. Schulman, J.K. Lee, In vitro transcriptomic prediction of hepatotoxicity for early drug discovery, *J. Theor. Biol.* 290 (2011) 27–36. doi:10.1016/j.jtbi.2011.08.009.
- [133] M. Chen, H. Bisgin, L. Tong, H. Hong, H. Fang, J. Borlak, W. Tong, Toward predictive models for drug-induced liver injury in humans: are we there yet?, *Biomark Med.* 8 (2014) 201–213. doi:10.2217/bmm.13.146.
- [134] M. Otava, Z. Shkedy, W. Talloen, G.R. Verheyen, A. Kasim, Identification of in vitro and in vivo disconnects using transcriptomic data, *BMC Genomics.* 16 (2015). doi:10.1186/s12864-015-1726-7.
- [135] P. Kohonen, J.A. Parkkinen, E.L. Willighagen, R. Ceder, K. Wennerberg, S. Kaski, R.C. Grafström, A transcriptomics data-driven gene space accurately predicts liver cytopathology and drug-induced liver injury, *Nat. Commun.* 8 (2017). doi:10.1038/ncomms15932.
- [136] R. Van Assche, V. Broeckx, K. Boonen, E. Maes, W. De Haes, L. Schoofs, L. Temmerman, Integrating -Omics: Systems Biology as Explored Through *C. Elegans* Research, *J. Mol. Biol.* 427 (2015) 3441–3451. doi:10.1016/j.jmb.2015.03.015.
- [137] W. Shim, M.J. Paik, D.T. Nguyen, J.K. Lee, Y. Lee, J.H. Kim, E.H. Shin, J.S. Kang, H.S. Jung, S. Choi, S. Park, J.S. Shim, G. Lee, Analysis of changes in gene expression and metabolic profiles induced by silica-coated magnetic nanoparticles, *ACS Nano.* 6 (2012) 7665–7680. doi:10.1021/nn301113f.
- [138] T. Rabilloud, P. Lescuyer, Proteomics in mechanistic toxicology: History, concepts, achievements, caveats, and potential, *Proteomics.* 15 (2015) 1051–1074. doi:10.1002/pmic.201400288.
- [139] D. Nath Roy, R. Goswami, A. Pal, Nanomaterial and toxicity: what can proteomics tell us about the nanotoxicology?, *Xenobiotica.* 47 (2017) 632–643. doi:10.1080/00498254.2016.1205762.
- [140] C.H. Johnson, J. Ivanisevic, G. Siuzdak, Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 (2016) 451–459. doi:10.1038/nrm.2016.25.
- [141] C. a Smith, E.J. Want, G. O’Maille, R. Abagyan, G. Siuzdak, and G.S. CA Smith, J Elizabeth, G O’Maille, Ruben Abagyan, XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling

- using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification, *ACS Publ.* 78 (2006) 779–87. doi:10.1021/ac051437y.
- [142] T.W.M. Fan, R.M. Higashi, A.N. Lane, Integrating metabolomics and transcriptomics for probing Se anticancer mechanisms, in: *Drug Metab. Rev.*, 2006: pp. 707–732. doi:10.1080/03602530600959599.
- [143] B. Pilch, M. Mann, Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma, *Genome Biol.* 7 (2006). doi:10.1186/gb-2006-7-5-r40.
- [144] M.R. Wilkins, J.C. Sanchez, A.A. Gooley, R.D. Appel, I. Humphery-Smith, D.F. Hochstrasser, K.L. Williams, Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13 (1996) 19–50. doi:10.1080/02648725.1996.10647923.
- [145] M.R. Wilkins, J.C. Sanchez, K.L. Williams, D.F. Hochstrasser, Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects, in: *Electrophoresis*, 1996: pp. 830–838. doi:10.1002/elps.1150170504.
- [146] A. Pandey, M. Mann, Proteomics to study genes and genomes, *Nature.* 405 (2000) 837–846. doi:10.1038/35015709.
- [147] S. Fields, Proteomics: Proteomics in genomeland, *Science* (80-.). 291 (2001) 1221–1224. doi:10.1126/science.291.5507.1221.
- [148] G. Scherperel, G.E. Reid, Emerging methods in proteomics: top-down protein characterization by multistage tandem mass spectrometry, *Analyst.* 132 (2007) 500. doi:10.1039/b618499p.
- [149] C.E. Parker, C.H. Borchers, Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation - Quality assurance and control of protein biomarker assays, *Mol. Oncol.* 8 (2014) 840–858. doi:10.1016/j.molonc.2014.03.006.
- [150] J.H. Gross, *Mass spectrometry: A textbook*, 2011. doi:10.1007/978-3-642-10711-5.
- [151] J.R. Wisniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann, J.R. Wi, Universal sample preparation method for proteome analysis, *Nat. Methods.* 6 (2009) 377–362. doi:10.1038/nmeth.1322.
- [152] J. Erde, R.R.O. Loo, J.A. Loo, Improving proteome coverage and sample recovery with enhanced FASP (eFASP) for quantitative proteomic experiments, in: *Methods Mol. Biol.*, 2017: pp. 11–18. doi:10.1007/978-1-4939-6747-6_2.
- [153] C.S. Hughes, S. Foehr, D.A. Garfield, E.E. Furlong, L.M. Steinmetz, J. Krijgsveld, Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology, *Mol. Syst. Biol.* 10 (2014) 757–757. doi:10.15252/msb.20145625.
- [154] N.A. Kulak, G. Pichler, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells, *Nat. Methods.* 11 (2014) 319–324. doi:10.1038/nmeth.2834.
- [155] C. Lenz, H. Urlaub, Separation methodology to improve proteome coverage depth, *Expert Rev. Proteomics.* 11 (2014) 409–414. doi:10.1586/14789450.2014.919862.
- [156] E. Mostovenko, C. Hassan, J. Rattke, A.M. Deelder, P.A. van Veelen, M. Palmblad, Comparison of peptide and protein fractionation methods in proteomics, *EuPA Open Proteomics.* 1 (2013) 30–37. doi:10.1016/j.euprot.2013.09.001.

- [157] A. Moreda-Piñeiro, N. García-Otero, P. Bermejo-Barrera, A review on preparative and semi-preparative offgel electrophoresis for multidimensional protein/peptide assessment, *Anal. Chim. Acta.* 836 (2014) 1–17. doi:10.1016/j.aca.2014.04.053.
- [158] G. Tezel, A proteomics view of the molecular mechanisms and biomarkers of glaucomatous neurodegeneration, *Prog. Retin. Eye Res.* 35 (2013) 18–43. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.01.004.
- [159] K. Chandramouli, P.-Y. Qian, Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity, *Hum. Genomics Proteomics.* 2009 (2009) 1–22. doi:10.4061/2009/239204.
- [160] N. Rauniyar, J.R. Yates, Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 5293–5309. doi:10.1021/pr500880b.
- [161] F. Xie, T. Liu, W.J. Qian, V.A. Petyuk, R.D. Smith, Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 25443–25449. doi:10.1074/jbc.R110.199703.
- [162] P.L. Ross, Y.N. Huang, J.N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, D.J. Pappin, Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents, *Mol. Cell. Proteomics.* 3 (2004) 1154–1169. doi:10.1074/mcp.M400129-MCP200.
- [163] R.D. Unwin, J.R. Griffiths, A.D. Whetton, Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 1574–1582. doi:10.1038/nprot.2010.123.
- [164] G. Pottiez, J. Wiederin, H.S. Fox, P. Ciborowski, Comparison of 4-plex to 8-plex iTRAQ quantitative measurements of proteins in human plasma samples, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 3774–3781. doi:10.1021/pr300414z.
- [165] K.A. Neilson, N.A. Ali, S. Muralidharan, M. Mirzaei, M. Mariani, G. Assadourian, A. Lee, S.C. Van Sluyter, P.A. Haynes, Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry, *Proteomics.* 11 (2011) 535–553. doi:10.1002/pmic.201000553.
- [166] D.A. Megger, L.L. Pott, M. Ahrens, J. Padden, T. Bracht, K. Kuhlmann, M. Eisenacher, H.E. Meyer, B. Sitek, Comparison of label-free and label-based strategies for proteome analysis of hepatoma cell lines, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1844 (2014) 967–976. doi:10.1016/j.bbapap.2013.07.017.
- [167] P.M. Palagi, P. Hernandez, D. Walther, R.D. Appel, Proteome informatics I: Bioinformatics tools for processing experimental data, *Proteomics.* 6 (2006) 5435–5444. doi:10.1002/pmic.200600273.
- [168] K.G. Calderón-González, J. Hernández-Monge, M.E. Herrera-Aguirre, J.P. Luna-Arias, Bioinformatics tools for proteomics data interpretation, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016: pp. 281–341. doi:10.1007/978-3-319-41448-5_16.
- [169] O.M. Lemine, K. Omri, M. Iglesias, V. Velasco, P. Crespo, P. De La Presa, L. El Mir, H. Bouzid, A. Yousif, A. Al-Hajry, ??-Fe₂O₃by sol-gel with large nanoparticles size for magnetic hyperthermia application, *J. Alloys Compd.* 607 (2014) 125–131. doi:10.1016/j.jallcom.2014.04.002.

- [170] T. Enkel, S.M. Berger, K. Schöning, B. Tews, D. Bartsch, Reduced expression of nogo-a leads to motivational deficits in rats., *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 1–7. doi:10.3389/fnbeh.2014.00010.
- [171] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J. Neurosci. Methods.* 14 (1985) 149–167. doi:10.1016/0165-0270(85)90031-7.
- [172] K. Maaroufi, M. Ammari, M. Jeljeli, V. Roy, M. Sakly, H. Abdelmelek, Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate., *Physiol. Behav.* 96 (2009) 343–349. doi:10.1016/j.physbeh.2008.10.019.
- [173] D. Treit, J. Menard, C. Royan, Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44 (1993) 463–469. doi:10.1016/0091-3057(93)90492-C.
- [174] R. Morris, Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat, *J. Neurosci. Methods.* 11 (1984) 7336–7336. doi:10.1016/016510270(84)9000714.
- [175] K. Maaroufi, L. Had-Aissouni, C. Melon, M. Sakly, H. Abdelmelek, B. Poucet, E. Save, Spatial learning, monoamines and oxidative stress in rats exposed to 900MHz electromagnetic field in combination with iron overload, *Behav. Brain Res.* 258 (2014) 80–89. doi:10.1016/j.bbr.2013.10.016.
- [176] J. Deguil, F. Chavant, C. Lafay-Chebassier, M.C. Pérault-Pochat, B. Fauconneau, S. Pain, Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP Parkinsonian mice, *Neurotox. Res.* 17 (2010) 142–155. doi:10.1007/s12640-009-9091-4.
- [177] Y.A. Chen, L.P. Tripathi, K. Mizuguchi, TargetMine, an integrated data warehouse for candidate gene prioritisation and target discovery, *PLoS One.* 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0017844.
- [178] H. Mi, A. Muruganujan, P.D. Thomas, PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 377–386. doi:10.1093/nar/gks1118.
- [179] B. Fahmy, S. Cormier, Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells, *Toxicol. Vit.* (2009). doi:10.1016/j.tiv.2009.08.005.
- [180] A.A. Khalaf, A.R. Zaki, M.K. Galal, H.A. Ogaly, M.A. Ibrahim, A. Hassan, The potential protective effect of α -lipoic acid against nanocopper particle-induced hepatotoxicity in male rats, *Hum. Exp. Toxicol.* 36 (2017) 881–891. doi:10.1177/0960327116674526.
- [181] M.J. Ribeiro, V.L. Maria, J.J. Scott-Fordsmand, M.J.B. Amorim, Oxidative stress mechanisms caused by Ag nanoparticles (NM300K) are different from those of AgNO₃: Effects in the soil invertebrate *Enchytraeus Crypticus*, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12 (2015) 9589–9602. doi:10.3390/ijerph120809589.
- [182] E. Paszek, J. Czyz, O. Woźnicka, D. Jakubiak, J. Wojnarowicz, W. Łojkowski, E. Stępień, Zinc oxide nanoparticles impair the integrity of human umbilical vein endothelial cell monolayer in vitro, *J. Biomed. Nanotechnol.* 8 (2012) 957–967. doi:10.1166/jbn.2012.1463.
- [183] B.K. Gaiser, S. Hirn, A. Kermanizadeh, N. Kanase, K. Fytianos, A. Wenk, N. Haberl, A. Brunelli, W.G. Kreyling, V. Stone, Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro, *Toxicol. Sci.* 131 (2013) 537–547. doi:10.1093/toxsci/kfs306.

- [184] S.J.H. Soenen, N. Nuytten, S.F. De Meyer, S.C. De Smedt, M. De Cuyper, High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling, *Small*. 6 (2010) 832–842. doi:10.1002/sml.200902084.
- [185] C. Hoskins, A. Cuschieri, L. Wang, The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism, *J. Nanobiotechnology*. 10 (2012) 15. doi:10.1186/1477-3155-10-15.
- [186] S. Triboulet, C. Aude-Garcia, L. Armand, V. Collin-Faure, M. Chevallet, H. Diemer, A. Gerdil, F. Proamer, J.M. Strub, A. Habert, N. Herlin, A. Van Dorsselaer, M. Carrière, T. Rabilloud, Comparative proteomic analysis of the molecular responses of mouse macrophages to titanium dioxide and copper oxide nanoparticles unravels some toxic mechanisms for copper oxide nanoparticles in macrophages, *PLoS One*. 10 (2015) 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0124496.
- [187] R. Hachani, M.A. Birchall, M.W. Lowdell, G. Kasparis, L.D. Tung, B.B. Manshian, S.J. Soenen, W. Gsell, U. Himmelreich, C.A. Gharagouzloo, S. Sridhar, N.T.K. Thanh, Assessing cell-nanoparticle interactions by high content imaging of biocompatible iron oxide nanoparticles as potential contrast agents for magnetic resonance imaging, *Sci. Rep.* 7 (2017) 7850. doi:10.1038/s41598-017-08092-w.
- [188] A. Panariti, G. Miserocchi, I. Rivolta, The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: Disrupting or enabling functions?, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 5 (2012) 87–100. doi:10.2147/NSA.S25515.
- [189] K. Buyukhatipoglu, A.M. Clyne, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 96 A (2011) 186–195. doi:10.1002/jbm.a.32972.
- [190] J. Kovalevich, D. Langford, *Neuronal Cell Culture*, 1078 (2013) 9–21. doi:10.1007/978-1-62703-640-5.
- [191] H. Xicoy, B. Wieringa, G.J.M. Martens, The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s disease research: a systematic review, *Mol. Neurodegener.* 12 (2017) 1–11. doi:10.1186/s13024-017-0149-0.
- [192] R.A. Ross, B.A. Spengler, J.L. Biedler, Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 71 (1983) 741–747. doi:10.1093/jnci/71.4.741.
- [193] C. Costa, F. Brandão, M.J. Bessa, S. Costa, V. Valdiglesias, G. Kiliç, N. Fernández-Bertólez, P. Quaresma, E. Pereira, E. Pásaro, B. Laffon, J.P. Teixeira, In vitro cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on neuronal and glial cells. Evaluation of nanoparticle interference with viability tests, *J. Appl. Toxicol.* 36 (2016) 361–372. doi:10.1002/jat.3213.
- [194] P. Bihari, M. Vippola, S. Schultes, M. Praetner, A.G. Khandoga, C.A. Reichel, C. Coester, T. Tuomi, M. Rehberg, F. Krombach, Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies, *Part. Fibre Toxicol.* 5 (2008). doi:10.1186/1743-8977-5-14.
- [195] M.C. Hohnholt, M. Geppert, R. Dringen, Treatment with iron oxide nanoparticles induces ferritin synthesis but not oxidative stress in oligodendroglial cells, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3946–3954. doi:10.1016/j.actbio.2011.06.052.
- [196] E.M. Luther, C. Petters, F. Bulcke, A. Kaltz, K. Thiel, U. Bickmeyer, R. Dringen, Endocytotic uptake of iron oxide nanoparticles by cultured brain microglial cells, *Acta Biomater.* 9 (2013)

- 8454–8465. doi:10.1016/j.actbio.2013.05.022.
- [197] G. Fleige, C. Nolte, M. Synowitz, F. Seeberger, H. Kettenmann, C. Zimmer, Magnetic labeling of activated microglia in experimental gliomas, *Neoplasia*. 3 (2001) 489–499. doi:10.1038/sj.neo.7900176.
- [198] X. Zhang, N. Surguladze, B. Slagle-Webb, A. Cozzi, J.R. Connor, Cellular iron status influences the functional relationship between microglia and oligodendrocytes, *Glia*. 54 (2006) 795–804. doi:10.1002/glia.20416.
- [199] S. Oshiro, K. ichi Kawamura, C. Zhang, T. Sone, M.S. Morioka, S. Kobayashi, K. Nakajima, Microglia and astroglia prevent oxidative stress-induced neuronal cell death: Implications for aceruloplasminemia, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1782 (2008) 109–117. doi:10.1016/j.bbadis.2007.12.002.
- [200] G.M. Bishop, I.F. Scheiber, R. Dringen, S.R. Robinson, Synergistic accumulation of iron and zinc by cultured astrocytes, *J. Neural Transm.* 117 (2010) 809–817. doi:10.1007/s00702-010-0420-9.
- [201] A. Laskar, M. Ghosh, S.I. Khattak, W. Li, X.-M. Yuan, Degradation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-induced ferritin by lysosomal cathepsins and related immune response, *Nanomedicine*. 7 (2012) 705–717. doi:10.2217/nnm.11.148.
- [202] S. Laurent, C. Burtea, C. Thirifays, U.O. Häfeli, M. Mahmoudi, Crucial ignored parameters on nanotoxicology: The importance of toxicity assay modifications and “cell vision,” *PLoS One*. 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0029997.
- [203] E. Fröhlich, Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles., *Curr. Drug Metab.* 14 (2013) 976–88. doi:10.2174/1389200211314090004.
- [204] M. Geppert, C. Petters, K. Thiel, R. Dringen, The presence of serum alters the properties of iron oxide nanoparticles and lowers their accumulation by cultured brain astrocytes, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013). doi:10.1007/s11051-012-1349-8.
- [205] C. Boyer, M.R. Whittaker, V. Bulmus, J. Liu, T.P. Davis, The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications, *NPG Asia Mater.* 2 (2010) 23–30. doi:10.1038/asiamat.2010.6.
- [206] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science* (80-.). 311 (2006) 622–627. doi:10.1126/science.1114397.
- [207] A.K. Gupta, S. Wells, Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies, *IEEE Trans. Nanobioscience*. 3 (2004) 66–73. doi:10.1109/TNB.2003.820277.
- [208] P.M. Doraiswamy, A.E. Finefrock, Metals in our minds: Therapeutic implications for neurodegenerative disorders, *Lancet Neurol.* 3 (2004) 431–434. doi:10.1016/S1474-4422(04)00809-9.
- [209] Y. Wang, Y.W. Ng, Y. Chen, B. Shuter, J. Yi, J. Ding, S. -c. Wang, S.S. Feng, Formulation of Superparamagnetic Iron Oxides by Nanoparticles of Biodegradable Polymers for Magnetic Resonance Imaging, *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 308–318. doi:10.1002/adfm.200700456.
- [210] J. Petrak, R. Ivanek, O. Toman, R. Cmejla, J. Cmejlova, D. Vyoral, J. Zivny, C.D. Vulpe, Déjà vu in

- proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins, *Proteomics*. 8 (2008) 1744–1749. doi:10.1002/pmic.200700919.
- [211] B. Szalay, E. Tátrai, G. Nyíró, T. Vezér, G. Dura, Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro experiments, *J. Appl. Toxicol.* 32 (2012) 446–453. doi:10.1002/jat.1779.
- [212] D. V Vayenas, M. Repanti, A. Vassilopoulos, D.A. Papanastasiou, Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper concentration in rat tissues in vivo: study of liver, spleen, and brain, *Int J Clin Lab Res.* 28 (1998) 183–186. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801930>.
- [213] X.T. Huang, Z.M. Qian, X. He, Q. Gong, K.C. Wu, L.R. Jiang, L.N. Lu, Z. jing Zhu, H.Y. Zhang, W.H. Yung, Y. Ke, Reducing iron in the brain: A novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging.* 35 (2014) 1045–1054. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.004.
- [214] M.G. Du L, Zhao Z, Cui A, Zhu Y, Zhang L, Liu J, Shi S, Fu C, Han X, Gao W, Song T, Xie L, Wang L, Sun S, Guo R, Increased Iron Deposition on Brain Quantitative Susceptibility Mapping Correlates with Decreased Cognitive Function in Alzheimer's Disease, *ACS Chem. Neurosci.* (2018). doi:10.1021/acscchemneuro.8b00194.
- [215] P. Umarao, S. Bose, S. Bhattacharyya, A. Kumar, S. Jain, Neuroprotective Potential of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Along with Exposure to Electromagnetic Field in 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16 (2016) 261–269. doi:10.1166/jnn.2016.11103.
- [216] P. Remy, M. Doder, A. Lees, N. Turjanski, D. Brooks, Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system, *Brain.* 128 (2005) 1314–1322. doi:10.1093/brain/awh445.
- [217] S.Z. Imam, S.M. Lantz-McPeak, E. Cuevas, H. Rosas-Hernandez, S. Liachenko, Y. Zhang, S. Sarkar, J. Ramu, B.L. Robinson, Y. Jones, B. Gough, M.G. Paule, S.F. Ali, Z.K. Binienda, Iron Oxide Nanoparticles Induce Dopaminergic Damage: In vitro Pathways and In Vivo Imaging Reveals Mechanism of Neuronal Damage, *Mol. Neurobiol.* 52 (2015) 913–926. doi:10.1007/s12035-015-9259-2.
- [218] E.-J. Park, H. Kim, Y. Kim, J. Yi, K. Choi, K. Park, Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice, *Toxicology.* 275 (2010) 65–71. doi:10.1016/j.tox.2010.06.002.
- [219] D.M. Hasan, M. Amans, T. Tihan, C. Hess, Y. Guo, S. Cha, H. Su, A.J. Martin, M.T. Lawton, E.A. Neuwelt, D.A. Saloner, W.L. Young, Ferumoxytol-Enhanced MRI to Image Inflammation Within Human Brain Arteriovenous Malformations: A Pilot Investigation, *Transl. Stroke Res.* 3 (2012) 166–173. doi:10.1007/s12975-012-0172-y.
- [220] E. Kim, J.M. Kim, L. Kim, S.J. Choi, I.S. Park, J.Y. Han, Y.C. Chu, E.S. Choi, K. Na, S.-S. Hong, The effect of neutral-surface iron oxide nanoparticles on cellular uptake and signaling pathways, *Int. J. Nanomedicine.* Volume 11 (2016) 4595–4607. doi:10.2147/IJN.S110332.
- [221] a C. Chua, E.H. Morgan, Effects of iron deficiency and iron overload on manganese uptake and deposition in the brain and other organs of the rat., *Biol. Trace Elem. Res.* 55 (1996) 39–54. doi:10.1007/BF02784167.
- [222] S.R. Räisänen, P. Lehenkari, M. Tasanen, P. Rahkila, P.L. Härkönen, H.K. Väänänen, Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis., *FASEB J.* 13 (1999)

- 513–22. doi:10.1016/S0928-4680(98)80745-1.
- [223] C. Shi, Y. Uda, C. Dedic, E. Azab, N. Sun, A.I. Hussein, C.A. Petty, K. Fulzele, M.C. Mitterberger-Vogt, W. Zwerschke, R. Pereira, K. Wang, P.D. Pajevic, Carbonic anhydrase III protects osteocytes from oxidative stress, *FASEB J.* 32 (2018) 440–452. doi:10.1096/fj.201700485RR.
- [224] R.R. Da Fonseca, W.E. Johnson, S.J. O'Brien, V. Vasconcelos, A. Antunes, Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases, *BMC Evol. Biol.* 10 (2010). doi:10.1186/1471-2148-10-281.
- [225] A. Klaus, S. Zorman, A. Berthier, C. Polge, S. Ramirez, S. Michelland, M. Sève, D. Vertommen, M. Rider, N. Lentze, D. Auerbach, U. Schlattner, Glutathione S-Transferases Interact with AMP-Activated Protein Kinase: Evidence for S-Glutathionylation and Activation In Vitro, *PLoS One.* 8 (2013) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0062497.
- [226] Y.R. Lin, C.J. Kuo, H.Y.H. Lin, C.J. Wu, S.S. Liang, A proteomics analysis to evaluate cytotoxicity in NRK-52E cells caused by unmodified Nano-Fe, *Sci. World J.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/754721.
- [227] A. Singhal, V.B. Morris, V. Labhasetwar, A. Ghorpade, Nanoparticle-mediated catalase delivery protects human neurons from oxidative stress, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e903-9. doi:10.1038/cddis.2013.362.
- [228] M. Gutch, S. Consil, S. Kumar, A. Agarwal, R. Robo, N. Jain, Oxidative stress determined through the levels of antioxidant enzymes and the effect of N-acetylcysteine in aluminum phosphide poisoning, *Indian J. Crit. Care Med.* 18 (2014) 666. doi:10.4103/0972-5229.142176.
- [229] A. Gautam, A. Ray, S. Mukherjee, S. Das, K. Pal, S. Das, P. Karmakar, M. Ray, S. Ray, Immunotoxicity of copper nanoparticle and copper sulfate in a common Indian earthworm, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148 (2018) 620–631. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.11.008.
- [230] S.J. Kim, T.Y. Yune, C.T. Han, Y.C. Kim, Y.J. Oh, G.J. Markelonis, T.H. Oh, Mitochondrial isocitrate dehydrogenase protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against oxidative stress, *J Neurosci Res.* 85 (2007) 139–152. doi:10.1002/jnr.21106.
- [231] S.H. Lee, S.O. Ha, H.J. Koh, K. Kim, S.M. Jeon, M.S. Choi, O.S. Kwon, T.L. Huh, Upregulation of cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by hyperglycemia protects renal cells against oxidative stress, *Mol. Cells.* 29 (2010) 203–208. doi:10.1007/s10059-009-0183-z.
- [232] P.-F. Wang, H.-W. Song, H.-Q. Cai, L.-W. Kong, K. Yao, T. Jiang, S.-W. Li, C.-X. Yan, Preoperative inflammation markers and IDH mutation status predict glioblastoma patient survival, *Oncotarget.* 8 (2017) 50117–50123. doi:10.18632/oncotarget.15235.
- [233] J. Dalli, L. V Norling, D. Renshaw, D. Cooper, K. Leung, M. Perretti, Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles, *112* (2018) 2512–2520. doi:10.1182/blood-2008-02-140533.The.
- [234] M. Mirsaeidi, S. Gidfar, A. Vu, D. Schraufnagel, Annexins family: Insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis, *J. Transl. Med.* 14 (2016) 1–9. doi:10.1186/s12967-016-0843-7.
- [235] B. Zhao, J. Wang, L. Liu, X. Li, S. Liu, Q. Xia, J. Shi, Annexin A1 translocates to nucleus and promotes the expression of pro-inflammatory cytokines in a PKC-dependent manner after OGD/R, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–13. doi:10.1038/srep27028.

- [236] J.D. Gilthorpe, F. Oozeer, J. Nash, M. Calvo, D.L. Bennett, A. Lumsden, A. Pini, Extracellular histone H1 is neurotoxic and drives a pro-inflammatory response in microglia, *F1000Research*. (2013) 1–14. doi:10.12688/f1000research.2-148.v1.
- [237] R. Chen, R. Kang, X.-G. Fan, D. Tang, Release and activity of histone in diseases., *Cell Death Dis*. 5 (2014) e1370. doi:10.1038/cddis.2014.337.
- [238] T. Vogl, A.L. Gharibyan, L.A. Morozova-Roche, Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: Self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 2893–2917. doi:10.3390/ijms13032893.

WEBOGRAPHIE :

<http://www.r-nano.fr/>

Nanoscale-why size matter Niniti.com

<http://www.enteknomaterials.com>

www.nano.sd-tech.com/files/fr/pdf/publication/2017/Zeta.pdf

<http://www.nanosafety-platform.com>

<https://www.gbiosciences.com/Bioassays/CytoScan-LDH-Cytotoxicity-Assay>

www.urmc.rochester.edu

PRIDE, www.ebi.ac.uk/pride

ProteomeXchange, www.proteomexchange.org

<https://de.wikipedia.org>

ANNEXES

IX. ANNEXES

ANNEXE 1 : Tableaux des protéines
dérégulées suite à l'exposition des cellules au
 FeCl_3 et aux Nanoparticules de fer

A. ANNEXE 1 : Tableaux des protéines dérégulées suite à l'exposition des cellules aux Nanoparticules de fer (de l'article I)

Table 2: Downregulated (red) and Upregulated (green) proteins after FeCl₃ exposure compared to control cells

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P68363	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	1	31	4.43	0.395	0.001	0.001	-0.404
Q71U36	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	1	17	4.43	0.456	0.001	0.001	-0.341
P63261	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	1	6	2.67	0.461	0.001	0.002	-0.337
P31151	S10A7_HUMAN	Protein S100-A7	S100A7	1	1	10.89	0.468	0.019	0.002	-0.329
Q9UK08	GBG8_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-8	GNG8	1	3	24.29	0.505	0.016	0.003	-0.296
Q99460	PSMD1_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	PSMD1	1	3	1.26	0.507	0.036	0.004	-0.295
P60709	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	1	11	2.67	0.540	0.000	0.003	-0.268
P35527	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	15	87	1.28	0.589	0.008	0.007	-0.230
P02765	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	2	3	1.63	0.602	0.005	0.005	-0.220
Q13838	DX39B_HUMAN	Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	3	21	3.5	0.636	0.019	0.015	-0.197
O00154	BACH_HUMAN	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	ACOT7	3	12	4.21	0.649	0.014	0.011	-0.188
P09104	ENOG_HUMAN	Gamma-enolase	ENO2	1	4	4.15	0.660	0.048	0.013	-0.181
P27695	APEX1_HUMAN	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	1	21	5.35	0.663	0.017	0.012	-0.178
Q99622	C10_HUMAN	Protein C10	C12orf57	2	6	11.9	0.666	0.042	0.013	-0.176
P69892	HBG2_HUMAN	Hemoglobin subunit gamma-2	HBG2	1	7	6.8	0.667	0.000	0.013	-0.176
P04264	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	27	320	1.55	0.684	0.014	0.015	-0.165
P54819	KAD2_HUMAN	Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2	1	6	6.69	0.691	0.026	0.019	-0.161

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P62888	RL30_HUMAN	60S ribosomal protein L30	RPL30	3	11	5.22	0.704	0.032	0.020	-0.153
P13645	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	22	171	3.08	0.713	0.037	0.023	-0.147
P19404	NDUV2_HUMAN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	1	4	5.22	0.716	0.038	0.027	-0.145
Q15126	PMVK_HUMAN	Phosphomevalonate kinase	PMVK	1	3	4.17	0.717	0.037	0.028	-0.144
P35908	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	15	73	1.41	0.724	0.047	0.028	-0.140
P68402	PA1B2_HUMAN	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	PAFAH1B2	1	22	3.93	0.737	0.029	0.039	-0.133
Q8NBS9	TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5	TXNDC5	1	12	2.08	0.748	0.012	0.037	-0.126
P54578	UBP14_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	USP14	2	7	2.63	0.751	0.009	0.048	-0.125
P23284	PIIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PIIB	5	38	5.09	0.752	0.022	0.032	-0.124
Q08945	SSRP1_HUMAN	FACT complex subunit SSRP1	SSRP1	4	20	1.55	0.760	0.047	0.036	-0.119

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P62258	1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	7	40	3.92	1.269	0.015	0.045	0.103
P26583	HMGB2_HUMAN	High mobility group protein B2	HMGB2	4	22	3.83	1.320	0.023	0.041	0.121
Q969Q0	RL36L_HUMAN	60S ribosomal protein L36a-like	RPL36AL	2	4	8.49	1.322	0.046	0.042	0.121
P61981	1433G_HUMAN	14-3-3 protein gamma	YWHAG	6	37	4.05	1.324	0.012	0.041	0.122
P46777	RL5_HUMAN	60S ribosomal protein L5	RPL5	8	26	2.69	1.327	0.020	0.028	0.123
Q99613	EIF3C_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C	1	3	0.77	1.332	0.045	0.035	0.124
P40925	MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	2	10	3.59	1.335	0.025	0.038	0.126
P16401	H15_HUMAN	Histone H1.5	HIST1H1B	9	108	3.54	1.338	0.032	0.034	0.126
P84098	RL19_HUMAN	60S ribosomal protein L19	RPL19	5	9	3.06	1.338	0.007	0.022	0.126
P18669	PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	6	34	5.51	1.344	0.013	0.030	0.128
P52565	GDIR1_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDIA	8	70	7.35	1.351	0.021	0.027	0.131
P67809	YBOX1_HUMAN	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	10	74	6.17	1.390	0.041	0.027	0.143
Q71DI3	H32_HUMAN	Histone H3.2	HIST2H3A;	6	157	5.15	1.393	0.019	0.021	0.144
P60866	RS20_HUMAN	40S ribosomal protein S20	RPS20	2	12	12.61	1.402	0.021	0.026	0.147
P46821	MAP1B_HUMAN	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	5	10	1.26	1.416	0.040	0.014	0.151

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q9NQC3	RTN4_HUMAN	Reticulon-4	RTN4	1	6	1.09	1.420	0.000	0.020	0.152
O95433	AHSA1_HUMAN	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	AHSA1	2	4	2.37	1.425	0.047	0.020	0.154
P47914	RL29_HUMAN	60S ribosomal protein L29	RPL29	3	23	3.77	1.429	0.023	0.017	0.155
P05204	HMGN2_HUMAN	Non-histone chromosomal protein HMG-17	HMGN2	3	30	18.89	1.433	0.043	0.038	0.156
P46779	RL28_HUMAN	60S ribosomal protein L28	RPL28	5	20	5.84	1.438	0.003	0.011	0.158
P09382	LEG1_HUMAN	Galectin-1	LGALS1	3	42	7.41	1.450	0.031	0.013	0.162
P02545	LMNA_HUMAN	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C	LMNA	11	41	1.66	1.473	0.005	0.012	0.168
O14979	HNRDL_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRNPDL	2	8	1.9	1.486	0.025	0.016	0.172
P39748	FEN1_HUMAN	Flap endonuclease 1	FEN1	1	8	4.21	1.506	0.006	0.014	0.178
P62266	RS23_HUMAN	40S ribosomal protein S23	RPS23	6	45	5.59	1.532	0.000	0.015	0.185
P29966	MARCS_HUMAN	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	7	56	9.64	1.541	0.041	0.009	0.188
P49006	MRP_HUMAN	MARCKS-related protein	MARCKSL1	4	22	6.67	1.597	0.023	0.014	0.203
Q01082	SPTB2_HUMAN	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1	2	4	0.34	1.608	0.015	0.012	0.206
P53999	TCP4_HUMAN	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	SUB1	2	4	8.66	1.618	0.034	0.016	0.209
P62913	RL11_HUMAN	60S ribosomal protein L11	RPL11	3	13	6.74	1.708	0.001	0.009	0.233

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q969H8	MYDGF_HUMAN	Myeloid-derived growth factor	MYDGF	1	2	6.36	1.763	0.036	0.007	0.246
P27348	1433T_HUMAN	14-3-3 protein theta	YWHAQ	2	16	5.71	1.775	0.045	0.008	0.249
Q9Y383	LC7L2_HUMAN	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	1	2	3.83	1.808	0.044	0.007	0.257
P31946	1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	YWHAB	2	5	5.69	1.853	0.047	0.012	0.268
Q8NC51	PAIRB_HUMAN	60S ribosomal protein L8	SERBP1	8	25	1.96	1.877	0.029	0.012	0.273
P62917	RL8_HUMAN	40S ribosomal protein S14	RPL8	4	9	3.11	1.883	0.000	0.004	0.275
P62263	RS14_HUMAN	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	RPS14	2	4	8.61	1.895	0.022	0.005	0.278
Q9UIG0	BAZ1B_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	BAZ1B	1	2	0.47	1.931	0.020	0.003	0.286
P09493	TPM1_HUMAN	ATPase inhibitor, mitochondrial	TPM1	1	1	3.17	2.135	0.020	0.002	0.330
Q9UII2	ATIF1_HUMAN	Glucosidase 2 subunit beta	ATPIF1	1	2	9.43	2.238	0.044	0.002	0.350
P14314	GLU2B_HUMAN		PRKCSH	1	2	1.33	2.268	0.002	0.002	0.356

Table 2: Downregulated (red) and Upregulated (green) proteins after IONP exposure compared to control cells

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P68363	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	1	31	4.43	0.34	1.61E-07	0.000612	-0.4685
Q71U36	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	1	17	4.43	0.4155	4.42E-05	0.001421	-0.3815
P63261	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	1	6	2.67	0.5156	0.010313	0.005384	-0.2877
O75531	BAF_HUMAN	Barrier-to-autointegration factor	BANF1	1	2	13.48	0.5318	0.049995	0.005323	-0.2743
Q9NZ01	TECR_HUMAN	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR	1	8	2.6	0.5662	0.020878	0.006121	-0.247
P60709	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	1	11	2.67	0.5897	0.00033	0.006048	-0.2293
P02765	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	2	3	1.63	0.5924	0.008082	0.009249	-0.2274
P35527	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	15	87	1.28	0.5984	0.003368	0.007559	-0.223
O00154	BACH_HUMAN	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	ACOT7	3	12	4.21	0.7166	0.035425	0.0248	-0.1447
P13645	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	22	171	3.08	0.7189	0.009705	0.036644	-0.1433
P04264	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	27	320	1.55	0.7329	0.013944	0.030954	-0.1349
O95076	ALX3_HUMAN	Homeobox protein aristaless-like 3	ALX3	1	3	2.33	0.7529	0.048431	0.033766	-0.1233
P69892	HBG2_HUMAN	Hemoglobin subunit gamma-2	HBG2	1	7	6.8	0.7573	0.006934	0.038177	-0.1207
P62888	RL30_HUMAN	60S ribosomal protein L30	RPL30	3	11	5.22	0.7578	0.028507	0.030631	-0.1204

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
O43809	CPSF5_HUMAN	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	3	4	3.08	1.3394	0.034449	0.03188	0.1269
P02545	LMNA_HUMAN	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C]	LMNA	11	41	1.66	1.3673	0.045432	0.030192	0.1359
P46821	MAP1B_HUMAN	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	5	10	1.26	1.4017	0.023844	0.025183	0.1467
Q96QV6	H2A1A_HUMAN	Histone H2A type 1-A	HIST1H2AA	1	29	6.87	1.4716	0.033445	0.016374	0.1678
P62263	RS14_HUMAN	40S ribosomal protein S14	RPS14	2	4	8.61	1.5648	0.045908	0.009035	0.1945
P09493	TPM1_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	1	1	3.17	2.0266	0.03125	0.002646	0.3068

ANNEXE 2 : Tableaux des protéines
dérégulées suite à l'exposition intranasale des
rats Wistar aux Nanoparticules de fer

B. ANNEXE 2 : Tableaux des protéines dérégulées suite à l'exposition intranasale des rats Wistar aux Nanoparticules de fer (dans le cerveau, le foie et le poumon)

Tableau des protéines dérégulées vers une baisse dans le cerveau suite à l'administration intranasale des NPs de fer

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P00762	TRY1_RAT	Anionic trypsin-1	Prss1	1	8	8.13	0.526	0.001	0.004	-0.279
P08592	A4_RAT	Amyloid beta A4 protein	App	1	2	1.17	0.546	0.010	0.004	-0.263
Q62696	DLG1_RAT	Disks large homolog 1	Dlg1	1	1	1.32	0.558	0.026	0.005	-0.253
B2RZ74	B2RZ74_RAT	Protein Snrnp70	Snrnp70	1	1	2.88	0.566	0.024	0.005	-0.247
Q3KRE8	TBB2B_RAT	Tubulin beta-2B chain	Tubb2b	1	10	2.7	0.568	0.000	0.005	-0.246
Q66H40	HMGN3_RAT	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 3	Hmgn3	1	4	15.79	0.583	0.001	0.006	-0.234
B4F7C7	B4F7C7_RAT	Hebp1 protein	Hebp1	2	4	6.32	0.592	0.031	0.009	-0.228
Q62736	CALD1_RAT	Non-muscle caldesmon	Cald1	2	4	3.77	0.601	0.000	0.008	-0.222
P18437	HMGN2_RAT	Non-histone chromosomal protein HMG-17	Hmgn2	1	8	16.67	0.603	0.004	0.008	-0.219
Q9ES53	UFD1_RAT	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	Ufd1l	1	2	5.21	0.615	0.003	0.008	-0.211
F1LXC7	F1LXC7_RAT	Protein LOC100362814	LOC100362814	1	1	0.82	0.640	0.021	0.011	-0.194
Q4L1J4	MAGI1_RAT	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	Magi1	1	1	1.12	0.641	0.022	0.011	-0.193
Q8K585	HMGA1_RAT	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	Hmga1	1	2	23.36	0.654	0.026	0.011	-0.184
F1LPG5	F1LPG5_RAT	Protein Ndufb4	Ndufb4	3	10	8.53	0.673	0.008	0.014	-0.172
P62824	RAB3C_RAT	Ras-related protein Rab-3C	Rab3c	1	4	6.17	0.677	0.003	0.017	-0.170
P25235	RPN2_RAT	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	Rpn2	1	3	2.69	0.679	0.003	0.015	-0.168
P02650	APOE_RAT	Apolipoprotein E	ApoE	3	8	1.92	0.684	0.000	0.015	-0.165
A9UMV9	A9UMV9_RAT	Ndufa7 protein	Ndufa7	3	10	9.82	0.689	0.002	0.014	-0.162

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q8CGU4	AGAP2_RAT	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	Agap2	3	4	1.43	0.689	0.012	0.016	-0.162
P62329	TYB4_RAT	Thymosin beta-4	Tmsb4x	5	11	29.55	0.691	0.001	0.020	-0.161
P30009	MARCS_RAT	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	7	47	4.85	0.694	0.007	0.020	-0.158
Q9Z0J8	NEGR1_RAT	Neuronal growth regulator 1	Negr1	1	9	3.74	0.699	0.003	0.020	-0.155
P38652	PGM1_RAT	Phosphoglucomutase-1	Pgm1	5	19	2.31	0.700	0.011	0.031	-0.155
F1LQZ0	F1LQZ0_RAT	Protein Tmem65	Tmem65	1	3	5.41	0.701	0.007	0.021	-0.154
D3ZT20	D3ZT20_RAT	Protein Fbxo41	Fbxo41	1	2	1.84	0.705	0.044	0.021	-0.152
P85108	TBB2A_RAT	Tubulin beta-2A chain	Tubb2a	2	45	2.7	0.707	0.000	0.021	-0.151
B2GUV5	B2GUV5_RAT	ATPase, H transporting, lysosomal V1 subunit G1	Atp6v1g1	1	4	9.32	0.707	0.004	0.019	-0.151
P62845	RS15_RAT	40S ribosomal protein S15	Rps15	1	8	8.97	0.711	0.019	0.025	-0.148
P85971	6PGL_RAT	6-phosphogluconolactonase	Pgls	2	4	6.23	0.719	0.000	0.022	-0.143
P56603	SCAM1_RAT	Secretory carrier-associated membrane protein 1	Scamp1	3	7	3.85	0.724	0.008	0.021	-0.141
P62494	RB11A_RAT	Ras-related protein Rab-11A	Rab11a	3	5	3.7	0.726	0.004	0.025	-0.139
Q63396	TCP4_RAT	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	Sub1	2	5	7.87	0.727	0.012	0.027	-0.139
Q9JKE3	SCAM5_RAT	Secretory carrier-associated membrane protein 5	Scamp5	1	6	4.68	0.731	0.006	0.026	-0.136
P47728	CALB2_RAT	Calretinin	Calb2	1	4	4.43	0.732	0.017	0.022	-0.135
Q5FVI4	CEND_RAT	Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1	Cend1	9	43	5.37	0.734	0.015	0.037	-0.134
P13234	KCC4_RAT	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV	Camk4	3	6	2.53	0.737	0.002	0.028	-0.132
Q5RJN0	Q5RJN0_RAT	NADH dehydrogenase	Ndufs7	4	15	6.88	0.743	0.011	0.044	-0.129
P07936	NEUM_RAT	Neuromodulin	Gap43	9	29	11.95	0.743	0.020	0.028	-0.129

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
B5DEN5	B5DEN5_RAT	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Eef1b2	2	4	4	0.745	0.000	0.030	-0.128
A9CMA6	TM163_RAT	Transmembrane protein 163	Tmem163	1	3	3.47	0.749	0.034	0.048	-0.126
Q9JK11	RTN4_RAT	Reticulon-4	Rtn4	5	11	1.12	0.749	0.013	0.031	-0.125
P60841	ENSA_RAT	Alpha-endosulfine	Ensa	4	10	14.88	0.750	0.009	0.034	-0.125
P62982	RS27A_RAT	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	Rps27a	6	69	9.62	0.750	0.014	0.029	-0.125
Q568Z1	F131B_RAT	Protein FAM131B	Fam131b	2	4	4.22	0.754	0.013	0.043	-0.123
Q5XIF3	NDUS4_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	Ndufs4	2	6	5.71	0.755	0.001	0.035	-0.122
Q920Q0	PALM_RAT	Paralemmmin-1	Palm	1	6	4.96	0.756	0.012	0.030	-0.122
Q6P7R8	DHB12_RAT	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	Hsd17b12	2	7	4.81	0.757	0.034	0.022	-0.121
O35987	NSF1C_RAT	NSFL1 cofactor p47	Nsfl1c	2	3	4.32	0.760	0.018	0.033	-0.119
M0R665	M0R665_RAT	Uncharacterized protein		2	4	7.05	0.761	0.012	0.040	-0.119
Q63610	TPM3_RAT	Tropomyosin alpha-3 chain	Tpm3	3	11	2.82	0.762	0.003	0.041	-0.118
E9PT79	E9PT79_RAT	Protein Tsn	Tsn	1	4	3.6	0.763	0.005	0.035	-0.117
Q75Q41	TOM22_RAT	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	Tomm22	3	6	8.45	0.763	0.037	0.031	-0.117
P07632	SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod1	5	21	7.14	0.764	0.012	0.035	-0.117
P63090	PTN_RAT	Pleiotrophin	Ptn	1	4	6.55	0.766	0.003	0.036	-0.116
B2GV54	NCEH1_RAT	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	Nceh1	3	11	3.92	0.767	0.034	0.047	-0.115
P63055	PCP4_RAT	Purkinje cell protein 4	Pcp4	3	14	16.13	0.769	0.006	0.040	-0.114
Q6DGG0	PPID_RAT	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Ppid	3	8	2.16	0.771	0.003	0.036	-0.113
Q6URK4	ROA3_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Hnrnpa3	9	20	3.43	0.776	0.046	0.050	-0.110
O88778	BSN_RAT	Protein bassoon	Bsn	21	66	0.66	0.778	0.023	0.041	-0.109
P10888	COX41_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Cox4i1	9	45	4.73	0.783	0.042	0.047	-0.106

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q5RKG9	Q5RKG9_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	2	5	2.62	0.784	0.001	0.045	-0.106
Q6J4I0	PPR1B_RAT	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	Ppp1r1b	3	20	9.76	0.787	0.017	0.050	-0.104
P05426	RL7_RAT	60S ribosomal protein L7	Rpl7	6	11	4.23	0.789	0.013	0.042	-0.103
P16446	PIPNA_RAT	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	Pitpna	6	14	3.32	0.790	0.022	0.049	-0.102

Tableau des protéines dérégulées vers une hausse dans le cerveau suite à l'administration intranasale des NPs de fer

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
D3ZAN3	D3ZAN3_RAT	Alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit	Ganab	6	10	1.38	1.207	0.026	0.047	0.082
Q5I0D1	GL0D4_RAT	Glyoxalase domain-containing protein 4	Glod4	2	4	2.68	1.227	0.027	0.037	0.089
P05712	RAB2A_RAT	Ras-related protein Rab-2A	Rab2a	4	14	6.13	1.237	0.050	0.038	0.092
Q7TQ16	QCR8_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	Uqcrq	4	13	9.76	1.262	0.024	0.040	0.101
Q5PPJ9	SHLB2_RAT	Endophilin-B2	Sh3glb2	6	21	3.71	1.271	0.030	0.036	0.104
P22062	PIMT_RAT	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	Pcmt1	4	7	7.49	1.292	0.047	0.021	0.111
Q4G009	MCTS1_RAT	Malignant T-cell-amplified sequence 1	Mcts1	1	5	10.44	1.305	0.013	0.039	0.115
P49186	MK09_RAT	Mitogen-activated protein kinase 9	Mapk9	1	7	3.07	1.306	0.001	0.041	0.116
P51650	SSDH_RAT	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	Aldh5a1	7	16	2.1	1.310	0.013	0.037	0.117
P31977	EZRI_RAT	Ezrin	Ezr	2	3	1.19	1.312	0.004	0.041	0.118
D3ZN79	D3ZN79_RAT	Protein LOC686074	LOC686074	1	4	8.13	1.315	0.009	0.038	0.119
P19804	NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B	Nme2	5	15	9.21	1.323	0.000	0.038	0.122
Q01205	ODO2_RAT	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	Dlst	6	21	1.76	1.331	0.005	0.027	0.124
Q5XIG0	NUDT9_RAT	ADP-ribose pyrophosphatase, mitochondrial	Nudt9	1	3	2.57	1.339	0.005	0.029	0.127
Q09073	ADT2_RAT	ADP/ATP translocase 2	Slc25a5	9	46	3.69	1.341	0.014	0.028	0.127
D3ZI16	D3ZI16_RAT	COP9	Cops6	2	5	3.49	1.348	0.034	0.038	0.130
O35567	PUR9_RAT	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	Atic	1	4	1.86	1.356	0.035	0.036	0.132
P47971	NPTX1_RAT	Neuronal pentraxin-1	Nptx1	1	6	1.85	1.364	0.009	0.030	0.135

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q9ERH3	WDR7_RAT	WD repeat-containing protein 7	Wdr7	3	7	0.87	1.366	0.001	0.023	0.135
Q6Q7Y5	GNA13_RAT	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	Gna13	2	5	2.65	1.372	0.002	0.025	0.137
P14668	ANXA5_RAT	Annexin A5	Anxa5	3	15	2.51	1.378	0.021	0.029	0.139
D3ZLT1	D3ZLT1_RAT	NADH dehydrogenase	Ndufb7	3	15	6.57	1.387	0.000	0.019	0.142
Q5RK08	Q5RK08_RAT	Glioblastoma amplified sequence	Gbas	3	6	5.69	1.393	0.002	0.021	0.144
D4ADS4	D4ADS4_RAT	Protein Mgst3	Mgst3	2	9	8.55	1.396	0.018	0.028	0.145
Q9JJK1	GPM6B_RAT	Neuronal membrane glycoprotein M6-b	Gpm6b	1	9	4.91	1.397	0.000	0.018	0.145
P62483	KCAB2_RAT	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	Kcnab2	4	10	1.91	1.404	0.005	0.013	0.147
Q68FX1	MPI_RAT	Mannose-6-phosphate isomerase	Mpi	1	3	3.55	1.412	0.016	0.019	0.150
P01830	THY1_RAT	Thy-1 membrane glycoprotein	Thy1	6	45	6.21	1.421	0.012	0.018	0.153
Q566C7	NUDT3_RAT	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1	Nudt3	1	7	10.12	1.437	0.026	0.024	0.157
Q5U2P5	Q5U2P5_RAT	Protein C2cd2l	C2cd2l	1	3	1.42	1.453	0.001	0.012	0.162
P45479	PPT1_RAT	Palmitoyl-protein thioesterase 1	Ppt1	2	5	3.92	1.455	0.009	0.015	0.163
P23711	HMOX2_RAT	Heme oxygenase 2	Hmox2	2	4	5.08	1.459	0.010	0.016	0.164
P02401	RLA2_RAT	60S acidic ribosomal protein P2	Rplp2	1	4	16.52	1.462	0.005	0.014	0.165
P19627	GNAZ_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha	Gnaz	3	13	3.94	1.464	0.002	0.014	0.166
M0R5P8	M0R5P8_RAT	Protein Adam22	Adam22	4	10	1.55	1.467	0.016	0.010	0.166
Q07009	CAN2_RAT	Calpain-2 catalytic subunit	Capn2	2	4	1.57	1.475	0.027	0.014	0.169
Q6AYR2	NDRG3_RAT	Protein NDRG3	Ndr3	2	8	4.53	1.477	0.004	0.015	0.169
B4F7A3	B4F7A3_RAT	Galectin	Lgalsl	2	8	5.81	1.480	0.037	0.027	0.170
P20059	HEMO_RAT	Hemopexin	Hpx	3	6	1.74	1.481	0.000	0.017	0.171
P46844	BIEA_RAT	Biliverdin reductase A	Blvra	1	3	4.41	1.487	0.001	0.015	0.172
Q4V8H5	Q4V8H5_RAT	Aspartyl aminopeptidase	Dnpep	2	4	2.32	1.510	0.008	0.013	0.179
D4A4Q4	D4A4Q4_RAT	Protein Ociad2	Ociad2	1	8	9.85	1.515	0.017	0.008	0.181

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P27791	KAPCA_RAT	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	Prkaca	1	6	3.42	1.521	0.000	0.010	0.182
Q9R1T1	BAF_RAT	Barrier-to-autointegration factor	Banf1	1	7	13.48	1.536	0.001	0.011	0.187
Q4FZT2	PPME1_RAT	Protein phosphatase methylesterase 1	Ppme1	1	9	3.37	1.553	0.006	0.010	0.191
Q68FQ9	Q68FQ9_RAT	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2	Lancl2	3	4	2	1.577	0.001	0.009	0.198
G3V912	G3V912_RAT	Protein Tmx4	Tmx4	1	2	3.87	1.583	0.022	0.010	0.200
Q5I0D5	LHPP_RAT	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	Lhpp	1	3	4.44	1.610	0.027	0.008	0.207
P08009	GSTM4_RAT	Glutathione S-transferase Yb-3	Gstm3	6	15	4.13	1.619	0.000	0.008	0.209
P61107	RAB14_RAT	Ras-related protein Rab-14	Rab14	3	6	7.44	1.692	0.000	0.006	0.228
P62718	RL18A_RAT	60S ribosomal protein L18a	Rpl18a	1	3	5.11	1.718	0.000	0.006	0.235
Q6AY56	TBA8_RAT	Tubulin alpha-8 chain	Tuba8	1	3	3.56	1.788	0.000	0.004	0.252
D3ZJF9	D3ZJF9_RAT	Protein Gla	Gla	2	3	2.62	1.800	0.007	0.004	0.255
Q6IFU8	K1C17_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 17	Krt17	2	7	1.62	1.810	0.000	0.003	0.258
D4ACG7	D4ACG7_RAT	Protein Cpne6	Cpne6	1	3	3.41	1.858	0.000	0.003	0.269
Q62812	MYH9_RAT	Myosin-9	Myh9	2	2	0.71	1.978	0.000	0.003	0.296
M0R4V4	M0R4V4_RAT	Protein Slc25a23	Slc25a23	1	1	2.78	2.280	0.023	0.001	0.358
B0BNE6	B0BNE6_RAT	NADH dehydrogenase	Ndufs8	1	2	4.25	2.307	0.027	0.001	0.363

Tableau des protéines dérégulées vers une baisse dans le foie suite à l'administration intranasale des NPs de fer

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q6IFU8	K1C17_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 17	Krt17	1	1	2.54	0.312	0.005	0.000	-0.506
Q99PS8	HRG_RAT	Histidine-rich glycoprotein	Hrg	2	3	2.67	0.575	0.003	0.001	-0.241
Q6P6Q2	K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5	Krt5	1	1	1.39	0.578	0.015	0.002	-0.238
D3ZBN0	H15_RAT	Histone H1.5	Hist1h1b	3	5	4.95	0.589	0.018	0.003	-0.230
P0C170	H2A1E_RAT	Histone H2A type 1-E		1	6	5.38	0.592	0.000	0.002	-0.228
P16638	ACLY_RAT	ATP-citrate synthase	Acly	18	48	1.73	0.597	0.001	0.002	-0.224
P05370	G6PD_RAT	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6pdx	2	3	1.94	0.605	0.008	0.003	-0.218
P24008	S5A1_RAT	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	Srd5a1	1	2	3.47	0.628	0.044	0.003	-0.202
P12785	FAS_RAT	Fatty acid synthase	Fasn	34	131	0.32	0.631	0.000	0.003	-0.200
A0A0G2K1A2	A0A0G2K1A2_RAT	Myeloperoxidase	Mpo	2	4	1.00	0.640	0.043	0.005	-0.194
P80431	COX7B_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 7B, mitochondrial	Cox7b	1	2	10.00	0.650	0.046	0.005	-0.187
A0A0G2K916	A0A0G2K916_RAT	Ankyrin repeat and KH domain-containing 1		1	2	1.00	0.658	0.045	0.004	-0.182
P12928	KPYR_RAT	Pyruvate kinase PKLR	Pklr	8	20	1.92	0.665	0.000	0.004	-0.177
Q5M875	DHB13_RAT	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13	Hsd17b13	3	4	4.33	0.668	0.008	0.004	-0.175
O09171	BHMT1_RAT	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	Bhmt	17	134	5.41	0.681	0.000	0.005	-0.167
F1M853	F1M853_RAT	Protein Rrbp1	Rrbp1	6	9	0.96	0.683	0.001	0.005	-0.165
P15865	H14_RAT	Histone H1.4	Hist1h1e	2	8	4.11	0.701	0.048	0.007	-0.154
P13803	ETFA_RAT	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Etfa	5	15	4.80	0.724	0.002	0.010	-0.140

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
O88813	ACSL5_RAT	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	Acs15	4	11	1.61	0.731	0.022	0.010	-0.136
Q62902	LMAN1_RAT	Protein ERGIC-53	Lman1	3	6	1.35	0.745	0.010	0.011	-0.128
P24473	GSTK1_RAT	Glutathione S-transferase kappa 1	Gstk1	2	5	5.75	0.757	0.022	0.013	-0.121
P09034	ASSY_RAT	Argininosuccinate synthase	Ass1	22	148	4.85	0.759	0.011	0.013	-0.120
P21531	RL3_RAT	60S ribosomal protein L3	Rpl3	4	6	1.74	0.764	0.019	0.014	-0.117
P50137	TKT_RAT	Transketolase	Tkt	13	42	1.61	0.767	0.040	0.014	-0.115
P01946	HBA_RAT	Hemoglobin subunit alpha-1/2 Serine	Hba1	3	43	6.34	0.773	0.000	0.019	-0.112
Q5U3Z7	Q5U3Z7_RAT	hydroxymethyltransferase	Shmt2	1	4	1.59	0.773	0.022	0.017	-0.112
P04143	THRSP_RAT	Thyroid hormone-inducible hepatic protein	Thrsp	1	8	8.67	0.774	0.036	0.023	-0.112
G3V728	G3V728_RAT	4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1	Nipsnap1	5	12	3.17	0.783	0.047	0.019	-0.107
Q4KLZ6	TKFC_RAT	Triokinase/FMN cyclase	Tkfc	11	36	3.63	0.784	0.012	0.018	-0.106
P09495	TPM4_RAT	Tropomyosin alpha-4 chain	Tpm4	2	5	3.63	0.794	0.029	0.021	-0.100
P04797	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	16	114	2.10	0.796	0.026	0.022	-0.099
P02680	FIBG_RAT	Fibrinogen gamma chain	Fgg	3	8	2.47	0.803	0.040	0.025	-0.095
Q6AXX6	F213A_RAT	Redox-regulatory protein FAM213A	Fam213a	2	6	3.49	0.819	0.006	0.031	-0.087
P63102	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	3	14	4.90	0.825	0.021	0.043	-0.084
D3ZFAQ8	D3ZFAQ8_RAT	Cytochrome c-1	Cyc1	3	12	4.91	0.827	0.043	0.036	-0.083

Tableau des protéines dérégulées vers une hausse dans le foie suite à l'administration intranasale des NPs de fer

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P97562	ACOX2_RAT	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2	Acox2	7	39	2.20	1.201	0.043	0.032	0.080
P41562	IDHC_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Idh1	5	38	2.66	1.210	0.013	0.034	0.083
P17988	ST1A1_RAT	Sulfotransferase 1A1	Sult1a1	8	52	6.19	1.242	0.032	0.024	0.094
Q4V8H5	Q4V8H5_RAT	Aspartyl aminopeptidase	Dnpep	4	8	3.37	1.251	0.030	0.024	0.097
P04762	CATA_RAT	Catalase	Cat	23	123	3.61	1.258	0.016	0.021	0.100
Q9JLA3	UGGG1_RAT	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	Uggt1	3	5	0.64	1.260	0.018	0.022	0.101
Q7M0E3	DEST_RAT	Destrin	Dstn	5	15	6.67	1.279	0.015	0.020	0.107
P61206	ARF3_RAT	ADP-ribosylation factor 3	Arf3	2	7	6.08	1.281	0.011	0.019	0.107
Q7TP54	FA65B_RAT	Protein FAM65B	Fam65b	3	12	1.22	1.281	0.038	0.021	0.108
Q63276	BAAT_RAT	Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase	Baat	12	54	4.52	1.282	0.010	0.018	0.108
P00502	GSTA1_RAT	Glutathione S-transferase alpha-1	Gsta1	8	54	4.05	1.304	0.000	0.015	0.115
P36365	FMO1_RAT	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 1	Fmo1	5	11	1.69	1.305	0.016	0.016	0.116
P08010	GSTM2_RAT	Glutathione S-transferase Mu 2	Gstm2	9	63	6.42	1.310	0.006	0.014	0.117
Q07523	HAOX2_RAT	Hydroxyacid oxidase 2	Hao2	2	5	4.82	1.325	0.016	0.011	0.122
P16303	CES1D_RAT	Carboxylesterase 1D	Ces1d	7	30	2.12	1.331	0.001	0.012	0.124
P70473	AMACR_RAT	Alpha-methylacyl-CoA racemase	Amacr	4	9	1.83	1.364	0.011	0.008	0.135
P49889	ST1E3_RAT	Estrogen sulfotransferase, isoform 3	Ste	5	11	3.39	1.387	0.000	0.008	0.142
Q5QE80	AOXC_RAT	Aldehyde oxidase 3	Aox3	3	17	1.05	1.390	0.000	0.008	0.143
P80067	CATC_RAT	Dipeptidyl peptidase 1	Ctsc	2	11	3.03	1.398	0.003	0.008	0.146

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
Q5I0C3	MCCA_RAT	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	Mccc1	2	4	1.82	1.413	0.042	0.008	0.150
Q6DGG1	ABHEB_RAT	Protein ABHD14B	Abhd14b	2	9	5.24	1.432	0.002	0.006	0.156
P62755	RS6_RAT	40S ribosomal protein S6	Rps6	3	7	6.43	1.454	0.006	0.005	0.163
Q9Z1A6	VIGLN_RAT	Vigilin	Hdlbp	3	5	1.18	1.474	0.012	0.005	0.169
P20759	IGHG1_RAT	Ig gamma-1 chain C region		3	9	2.45	1.562	0.030	0.004	0.194
D3Z8I7	D3Z8I7_RAT	Protein Gstt3	Gstt3	4	8	6.19	1.590	0.002	0.003	0.201
Q8CHM7	HACL1_RAT	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1	Hacl1	4	6	1.55	1.625	0.002	0.003	0.211
D4ABH1	D4ABH1_RAT	Protein LOC688906	Scaf11	1	13	0.83	1.649	0.001	0.002	0.217
P50237	ST1C1_RAT	Sulfotransferase 1C1	Sult1c1	4	12	1.97	1.662	0.000	0.002	0.221
M0R4N4	M0R4N4_RAT	Protein Dhrr7l1	Dhrr7l1	1	1	2.47	1.981	0.021	0.001	0.297
P14141	CAH3_RAT	Carbonic anhydrase 3	Ca3	14	75	6.54	2.073	0.000	0.001	0.317
P63029	TCTP_RAT	Translationally-controlled tumor protein	Tpt1	1	2	7.56	2.076	0.023	0.001	0.317

Tableau des protéines dérégulées vers une baisse dans le poumon suite à l'administration intranasale des NPs de fer

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P01946	HBA_RAT	Hemoglobin subunit alpha-1/2	Hba1	3	43	6.34	0.375	0.000	0.000	-0.426
F1LQJ7	F1LQJ7_RAT	Protein Pck2	Pck2	1	2	1.56	0.382	0.046	0.001	-0.418
G3V9Y3	G3V9Y3_RAT	Protein Ttc25	Ttc25	1	2	2.02	0.476	0.002	0.001	-0.323
P62329	TYB4_RAT	Thymosin beta-4	Tmsb4x	2	4	29.55	0.613	0.000	0.004	-0.213
F1M6Q3	F1M6Q3_RAT	Protein Col4a2	Col4a2	1	1	0.73	0.632	0.039	0.005	-0.199
A0A0G2JSV6	A0A0G2JSV6_RAT	Globin c2	Hba-a2	3	13	0	0.657	0.024	0.007	-0.183
Q63355	MYO1C_RAT	Unconventional myosin-1c	Myo1c	5	8	1.44	0.659	0.000	0.008	-0.181
P20070	NB5R3_RAT	NADH-cytochrome b5 reductase 3	Cyb5r3	4	10	5.65	0.666	0.037	0.013	-0.176
Q63598	PLST_RAT	Plastin-3	Pls3	4	10	1.9	0.680	0.002	0.008	-0.168
P04276	VTDB_RAT	Vitamin D-binding protein	Gc	3	9	1.47	0.703	0.009	0.014	-0.153
P21913	SDHB_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Sdhb	3	17	3.19	0.714	0.005	0.011	-0.146
P24090	FETUA_RAT	Alpha-2-HS-glycoprotein	Ahsg	3	10	2.84	0.721	0.031	0.013	-0.142

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P62755	RS6_RAT	40S ribosomal protein S6	Rps6	3	7	6.43	0.723	0.047	0.014	-0.141
Q63495	RAGE_RAT	Advanced glycosylation end product-specific receptor	Ager	5	25	2.24	0.725	0.001	0.014	-0.140
P47875	CSRP1_RAT	Cysteine and glycine-rich protein 1	Csrp1	1	2	8.81	0.738	0.049	0.016	-0.132
P02770	ALBU_RAT	Serum albumin	Alb	35	394	1.15	0.741	0.050	0.016	-0.130
P11762	LEG1_RAT	Galectin-1	Lgals1	5	15	7.41	0.754	0.027	0.019	-0.123
P47942	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	3	6	1.57	0.756	0.003	0.018	-0.122
P12346	TRFE_RAT	Serotransferrin	Tf	27	145	1.72	0.759	0.007	0.020	-0.120
D3ZZZ9	D3ZZZ9_RAT	Catenin	Ctnnd1	2	5	1.39	0.764	0.022	0.022	-0.117
P02091	HBB1_RAT	Hemoglobin subunit beta-1	Hbb	3	63	6.12	0.775	0.000	0.022	-0.111
P49911	AN32A_RAT	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	Anp32a	2	3	3.24	0.776	0.022	0.029	-0.110
P11517	HBB2_RAT	Hemoglobin subunit beta-2		3	78	6.12	0.781	0.004	0.028	-0.107
P04639	APOA1_RAT	Apolipoprotein A-I	Apoa1	4	6	3.47	0.787	0.040	0.032	-0.104
Q9QXQ0	ACTN4_RAT	Alpha-actinin-4	Actn4	5	16	1.21	0.791	0.015	0.031	-0.102
P02680	FIBG_RAT	Fibrinogen gamma chain	Fgg	3	8	2.47	0.793	0.008	0.025	-0.101
P16617	PGK1_RAT	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	4	16	4.08	0.795	0.045	0.035	-0.100
Q9Z270	VAPA_RAT	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	Vapa	3	6	5.62	0.803	0.029	0.036	-0.095
P14480	FIBB_RAT	Fibrinogen beta chain	Fgb	5	10	2.92	0.814	0.018	0.047	-0.089

Tableau des protéines dérégulées vers une hausse dans le poumon suite à l'administration intranasale des NPs de fer

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P26772	CH10_RAT	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspe1	5	24	6.86	1.215	0.017	0.047	0.085
Q6AXX6	F213A_RAT	Redox-regulatory protein FAM213A	Fam213a	2	6	3.49	1.221	0.013	0.045	0.087
D3ZMX6	D3ZMX6_RAT	Protein Sntb2	Sntb2	2	5	1.72	1.223	0.030	0.047	0.087
A0A0G2K654	A0A0G2K654_RAT	Histone cluster 1 H1 family member c	Hist1h1c	1	8	0	1.225	0.020	0.043	0.088
Q4G075	ILEUA_RAT	Leukocyte elastase inhibitor A	Serpinb1a	4	6	2.64	1.231	0.050	0.044	0.090
G3V7W1	G3V7W1_RAT	Programmed cell death 6	Pdcd6	1	5	5.24	1.233	0.046	0.043	0.091
D3ZE63	D3ZE63_RAT	Protein LOC679748	LOC679748	1	8	7.83	1.265	0.014	0.036	0.102
O35244	PRDX6_RAT	Peroxiredoxin-6	Prdx6	6	26	5.36	1.267	0.050	0.037	0.103
P09606	GLNA_RAT	Glutamine synthetase	Glul	4	12	1.88	1.273	0.013	0.025	0.105
Q1HAQ0	PCAT1_RAT	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	Lpcat1	1	6	1.87	1.277	0.020	0.028	0.106
P36972	APT_RAT	Adenine phosphoribosyltransferase	Aprt	2	36	7.22	1.279	0.004	0.028	0.107
P06757	ADH1_RAT	Alcohol dehydrogenase 1	Adh1	11	67	5.85	1.290	0.048	0.035	0.111
P52555	ERP29_RAT	Endoplasmic reticulum resident protein 29	Erp29	2	4	5	1.294	0.047	0.024	0.112
P50115	S10A8_RAT	Protein S100-A8	S100a8	5	35	17.98	1.305	0.009	0.025	0.116
P16232	DHI1_RAT	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	Hsd11b1	5	38	3.82	1.326	0.011	0.020	0.123
Q9JLZ1	GLRX3_RAT	Glutaredoxin-3	Glrx3	1	3	3.86	1.329	0.040	0.022	0.123
P20673	ARLY_RAT	Argininosuccinate lyase	Asl	4	11	1.95	1.337	0.038	0.018	0.126
D4ACJ1	D4ACJ1_RAT	40S ribosomal protein S24	LOC100363469	4	13	4.51	1.339	0.006	0.018	0.127
P61206	ARF3_RAT	ADP-ribosylation factor 3	Arf3	2	7	6.08	1.346	0.012	0.020	0.129
P49889	ST1E3_RAT	Estrogen sulfotransferase, isoform3	Ste	5	11	3.39	1.356	0.015	0.017	0.132

Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
D3ZBN0	H15_RAT	Histone H1.5	Hist1h1b	3	5	4.95	1.357	0.025	0.023	0.132
P02466	CO1A2_RAT	Collagen alpha-2(I) chain	Col1a2	3	13	1.09	1.361	0.011	0.017	0.134
P19132	FRIH_RAT	Ferritin heavy chain	Fth1	3	8	3.85	1.361	0.000	0.016	0.134
Q63507	RL14_RAT	60S ribosomal protein L14	Rpl14	3	25	4.67	1.363	0.003	0.013	0.134
G3V8L1	G3V8L1_RAT	PYD and CARD domain containing	Pycard	2	3	4.15	1.394	0.044	0.020	0.144
P48675	DESM_RAT	Desmin	Des	2	3	1.71	1.420	0.013	0.011	0.152
D3ZQM3	D3ZQM3_RAT	Integrin alpha 3 variant B	Itga3	3	4	1.59	1.435	0.009	0.010	0.157
P68182	KAPCB_RAT	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	Prkacb	1	3	3.42	1.443	0.035	0.009	0.159
P62836	RAP1A_RAT	Ras-related protein Rap-1A	Rap1a	3	27	6.52	1.466	0.002	0.008	0.166
P07895	SODM_RAT	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Sod2	4	23	6.31	1.489	0.005	0.007	0.173
Q3T1J1	IF5A1_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Eif5a	2	4	7.79	1.498	0.002	0.007	0.176
P80067	CATC_RAT	Dipeptidyl peptidase 1	Ctsc	2	11	3.03	1.502	0.039	0.007	0.177
P06760	BGLR_RAT	Beta-glucuronidase	Gusb	1	4	1.39	1.513	0.012	0.008	0.180
P17046	LAMP2_RAT	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Lamp2	1	3	2.19	1.522	0.000	0.007	0.182
P80431	COX7B_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 7B, mitochondrial	Cox7b	1	2	10	1.524	0.046	0.007	0.183
Q5XI77	Q5XI77_RAT	Annexin	Anxa11	2	5	2.39	1.544	0.021	0.007	0.189
P02454	CO1A1_RAT	Collagen alpha-1(I) chain	Col1a1	4	20	1.24	1.549	0.000	0.006	0.190
Q7TP54	FA65B_RAT	Protein FAM65B	Fam65b	3	12	1.22	1.578	0.001	0.008	0.198
P0C170	H2A1E_RAT	Histone H2A type 1-E		1	6	5.38	1.596	0.000	0.005	0.203
P45479	PPT1_RAT	Palmitoyl-protein thioesterase 1	Ppt1	2	3	3.92	1.608	0.004	0.004	0.206

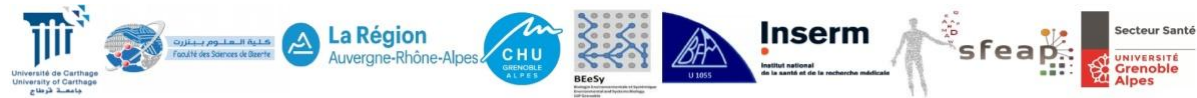
Accession	Name	Description	Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence coverage %	Ratio	p value Ratio	p value Sample	Log 10 Ratio
P97521	MCAT_RAT	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	Slc25a20	2	8	7.64	1.617	0.031	0.005	0.209
P97700	M2OM_RAT	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Slc25a11	2	3	3.18	1.623	0.010	0.006	0.210
P09527	RAB7A_RAT	Ras-related protein Rab-7a	Rab7a	2	4	6.76	1.637	0.028	0.004	0.214
P27139	CAH2_RAT	Carbonic anhydrase 2	Ca2	4	10	6.15	1.645	0.000	0.005	0.216
P50116	S10A9_RAT	Protein S100-A9	S100a9	5	21	8.85	1.650	0.000	0.004	0.218
Q5XHY5	SYTC_RAT	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	Tars	2	3	1.29	1.703	0.047	0.005	0.231
Q9Z2G8	NP1L1_RAT	Nucleosome assembly protein 1-like 1	Nap1l1	1	6	2.82	1.704	0.001	0.003	0.232
P04157	PTPRC_RAT	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	Ptpcr	2	3	0.86	1.710	0.005	0.004	0.233
Q9JJ54	HNRPD_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	Hnrnpd	1	3	2.27	1.732	0.004	0.003	0.239
Q6I8Q6	Q6I8Q6_RAT	Histone H2A	Hist1h2af	1	1	5.38	1.751	0.022	0.003	0.243
Q0H8B9	CL2DB_RAT	C-type lectin domain family 2 member D11	Clec2d11	1	2	5.31	1.783	0.043	0.003	0.251
Q4FZY0	EFHD2_RAT	EF-hand domain-containing protein D2	Efhd2	2	5	2.93	1.791	0.006	0.003	0.253
Q05962	ADT1_RAT	ADP/ATP translocase 1	Slc25a4	1	5	3.02	1.939	0.000	0.002	0.288
Q9WTQ2	PODXL_RAT	Podocalyxin	Podxl	1	2	2.06	1.968	0.002	0.002	0.294

C. ANNEXE 3 : Posters

-Conférence de Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Fluxomique & Electrophorèse et Analyse Protéomique (SMMAP), Marne-la-Vallée, France, Octobre 2017

- Journée de la Recherche Médicale 2018, Grenoble, France, June 2018

“Investigating Iron Oxide Nanoparticles Effects on Rat Using Proteomic Tools”. Dalel Askri *et al.*



Investigating Iron Oxide Nanoparticles Effects on Rat using Proteomic Tools

Dalel Askri^{1,2,3,4,*}, Sylvia G. Lehmann^{1,2,3,5}, Valérie Cunin^{1,2,3}, Souhir Ouni⁴, Walid Rachidi⁶, Mohsen Sakly⁴, Salem Amara⁴ and Michel Sève^{1,2,3}

¹- Univ. Grenoble Alpes, LBFA and BEESy, PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France ²- Inserm, U1055, PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France ³- CHU de Grenoble, IBS PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France ⁴- Univ. Carthage, College of Sciences of Biologie, Unit of Integrated Physiology, Biologie, Tunisia ⁵- Univ. Grenoble Alpes, IStem, Grenoble, France ⁶- CEA Grenoble, INAC/SCIB/LAN, Grenoble, France

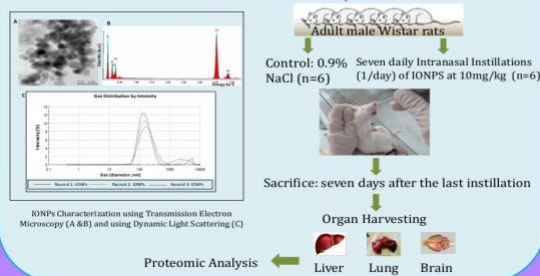
* Corresponding author: Dalel Askri, Promethee Proteomic Platform, Grenoble, France, Tel: +33669255993, e-mail: askridalel@gmail.com

Introduction

Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) are used in Biomedicine as theranostic agents for cancer, and also as Magnetic Resonance Imaging contrast agents because of their unique properties [1]. With the increasing production and use of these IONPs, there is an evident increasing risk of exposure for human and the environment. Thus, it is essential to study the effects of these nanoparticles on the living cells in which they may accumulate after exposure and/or cause various changes [2]. In our study, we investigated the liver, lung and brain proteome changes to evaluate the effects of IONPs on mammals taking the Wistar rat as model.

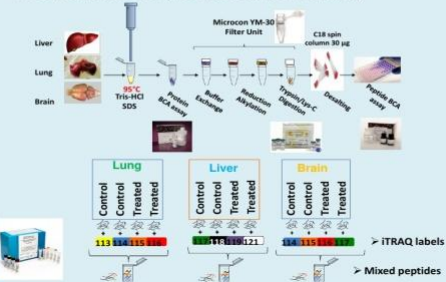
Material and Methods

IONPs Characterization & Rat exposure



Quantitative Proteomics using Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation Labeling (iTRAQ) and MS

Protein extraction: FASP (Filter-Aided Sample Preparation)



2 Dimension fractionation

1st D: OFFGEL fractionation

2nd D: RP-nanoHPLC fractionation

Protein MS/MS

4800 MALDI-TOF/TOF

Bioinformatics

Rat database of UniProtKB/Swiss-Prot

ParagonProtein Pilot™

Identification & Quantitation

Upregulated, if p-value sample and p-value ratio ≤ 0.05 with iTRAQ ratio > 1

Downregulated, if p-value sample and p-value ratio ≤ 0.05 with iTRAQ ratio < 1

Dysregulated proteins

Gene Ontology Analysis

Biological Pathway Analysis

TargetMine

Results

Quantification of:

- Liver: 1124 proteins and 6225 peptides
- Lung: 1542 proteins and 6225 peptides
- Brain: 1542 proteins and 9784 peptides

- ✓ 31 upregulated & 35 downregulated proteins
- ✓ 54 upregulated & 30 downregulated proteins
- ✓ 60 upregulated & 67 downregulated proteins

Liver

Biological process	Accession Number	Ratio	p-value	Biological process	Accession Number	Ratio	p-value
Response to oxidative stress				Fatty Acid Metabolism			
Carbonic anhydrase 3	P14141	2.07	<0.001	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 5	O88813	0.75	0.022
Glutathione S-transferase alpha-1	P00502	1.30	<0.001	Fatty acid synthase	P12785	0.65	<0.001
Glutathione S-transferase Mu 2	P06010	1.30	0.005	Glyoxylis/ Gluconogenesis	P16638	0.68	<0.001
Catalase	P04762	1.29	0.015	ATP-citrate synthase	P04797	0.78	0.025
Isocitrate dehydrogenase	P41562	1.20	0.012	Glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase	P05370	0.60	0.008
Immune system				Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P12928	0.64	<0.001
Ig gamma-1 chain C region	P20759	1.56	0.029	Pyruvate kinase	D37628	0.62	0.043
Cancer metabolism				Cytochrome C1	P80431	0.62	0.046
Sulfotransferase 1C1	P50237	1.66	<0.001	Oxidative Phosphorylation			
Hepatic lipid metabolism				Cytochrome c oxidase COX 7B			
Vigilin	Q921A6	1.47	0.012				

Lung

Biological process	Accession Number	Ratio	p-value	Biological process	Accession Number	Ratio	p-value
Response to oxidative stress				Metabolism			
Superoxide dismutase	P07895	1.48	0.005	Succinate dehydrogenase	P21913	0.75	0.005
Peroxiredoxin-6	O35244	1.26	0.049	Phosphoglycerate kinase 1	P16617	0.65	0.044
Receptor-regulatory protein FAM213A	O6A906	1.22	0.013	Oxygen transport (lung to tissues)			
Immune system stimulation and response to inflammation				Hemoglobin subunit alpha-1/2	P01946	0.65	<0.001
Annexin	Q5K477	1.54	0.021	Hemoglobin subunit beta-1 and beta-2	P02091	0.65	<0.001
Histone H1.5	O32800	1.35	0.025	Hemostasis			
Histone H2A	Q68026	1.75	0.021	Fibrinogen gamma chain	P02680	0.65	0.008
Protein S100-A8	P50115	1.30	0.009	Fibrinogen beta chain	P14480	0.65	0.017
Protein S100-A9	P50116	1.65	<0.001	Cell proliferation and differentiation			
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	P04157	1.71	0.004	Thymosin beta-4	P62329	0.65	<0.001
Receptor-regulatory protein FAM213A	O6A906	1.22	0.013				
Cell death							
Programmed cell death 6	G3V7W1	1.24	0.045				
Inflammation process							
Malignant T-cell amplified sequence 1	P19132	1.34	<0.001				
Ferritin heavy chain							
Cell adhesion and cancer progress							
Podocalyxin	Q9WTQ2	1.36	0.002				

Brain

Biological process	Accession Number	Ratio	p-value
Response to oxidative stress			
Glutathione S-transferase Yb-3	P08009	1.62	<0.001
NADH dehydrogenase	B0BNE6	2.30	0.027
Inflammation process			
Annexin A5	P14668	1.57	0.02
Cancer: angiogenesis			
Endothelial cell differentiation	P13977	1.31	0.0038
Endothelial cell differentiation	C40209	1.30	0.012
Neuronal damage related to Alzheimer Disease	P47971	1.36	0.009
Neuronal pentamer 1			
Adhesion, neuronal differentiation and signal transduction	Q62696	1.48	0.025
Disk large homolog 1	Q5FVH4	1.47	0.015
Cell cycle exit and neuronal differentiation protein1			

Conclusion

Several proteins were identified as dysregulated between treated animals and controls, in particular, proteins involved in the pathways of lipid and carbohydrate metabolism, immune system stimulation and inflammation process, response to oxidative stress, angiogenesis, and pathways related to neurodegenerative diseases. This study allows us to identify promising biomarkers of exposure to IONPs and to help predicting the long-term impact of exposure to IONPs.

Acknowledgements: We thank Pr Lassaad El Mir from the Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials Applied at Environment, College of Sciences in Gabes, Tunisia, for providing the γ-Fe₃O₄ IONPs and the Tunisian Ministry of Higher education, the Auvergne Rhône Alpes Region and SFEAP for the financial support.

References:
1. Lee JS, Kim Y, et al. Nanomaterials for theranostics: recent advances and future challenges. Chem Rev. 2015;115:327-84.
2. Vaidyanathan V, Fernandez-Solis R, et al. An iron oxide nanoparticle safe? Current knowledge and future perspectives. J Toxicol Environ Med Biol. 2016; doi: 10.1016/j.jtoxic.2016.01.017.

-The 5th World Congress and Expo on Nanotechnology and Material Science, Barcelone, Espagne, Avril 2017

-- Journée de la Recherche Médicale 2017, Grenoble, France, Juin 2017

“Study of the Toxic Effects Induced by Iron Oxide Nanoparticles on SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line. Dael Askri *et al.*



كلية العلوم
ببئررت
Faculté des Sciences de Bizerte



La Région
Auvergne-Rhône-Alpes



Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Study of the toxic effects induced by Iron Oxide Nanoparticles on SH-SY5Y neuroblastoma cell line

Dael ASKRI^{1,2,3,4}, Sylvia LEHMANN^{1,2,3,5}, Walid RACHIDI⁶, Mohsen SAKLY⁴, Salem AMARA⁴ and Michel SEVE^{1,2,3}

¹: Univ. Grenoble Alpes, LBFA and BEeSy, Grenoble, France ²: Inserm, U1055, PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France ³: CHU de Grenoble, IBP, PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France ⁴: Univ. of Carthage, Fac. Sciences of Bizerte, Unit of Integrated Physiology, Bizerte, Tunisia ⁵: Univ. Grenoble Alpes, ISTERRE, Grenoble, France ⁶: CEA Grenoble, INAC/SCIB/LAN, Grenoble, France

* Corresponding author: Dael Askri, Promethee Proteomic Platform, Grenoble, France, Tel: +33669259993; e-mail: askridael@gmail.com

Introduction

Over the last few years, Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) have been widely used in many fields especially in Biomedicine. Due to their unique properties, they are used as theranostic agents for cancer, and also as MRI contrast agents [1]. With the increasing production and use of these IONPs, there is an evident increasing of the risks that can affect the Human [2].

Material and Methods

In this work, three fractions of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IONPs were kindly provided by Pr El Mir from the Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials Applied at Environment, College of Sciences in Gabes, Tunisia. Three different IONPs were characterized as powder by XRD and TEM, and in solution by DLS. SH-SY5Y cells were seeded into 96 well plate at a density of $25 \cdot 10^3$ cell/well 24h prior to exposure to IONPs at concentrations (12.5-200 $\mu\text{g/ml}$). Morphological cell changes were evaluated by the inverted microscope. MTT was used to assess the cell viability after exposure to IONPs. The absorbance was measured at 570nm using a microplate reader. The percentage of viability was calculated as the following formula: % of viable cells = (OD of treated sample / OD of control sample) $\times 100$.

Results

IONPs Characterization

The $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IONPs F1, F2 and F3 were in size range of 14, 18 and 30nm respectively when characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) JEOL (JEM-2100F) at 200kV and by X-Ray Diffraction (PANalytical XpertPro) [3].

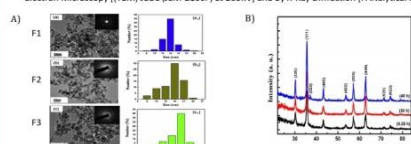


Figure 1: IONPs Characterization using Transmission Electron Microscopy (A) and using X-Ray Diffraction (B).

Dynamic Light Scattering

		F1	F2	F3
MilliQ water	Size	329.9	186.6	174.2
	PDI	0.290	0.409	0.302
	Zeta P	-7.79	-8.42	-10.6
FBS free Medium	Size	928.5	1229	1433
	PDI	0.362	0.216	0.254
	Zeta P	-10.9	-13.0	-9.56
Medium supplemented with FBS	Size	381.8	436.3	562.1
	PDI	0.235	0.279	0.428
	Zeta P	-10.0	-9.97	-9.31
NaCl 0.9% solution	Size	817.6	874.7	788.6
	PDI	0.246	0.277	0.323
	Zeta P	-13.2	-8.40	-9.99

Table 1: In solution characterization using the Dynamic Light Scattering to study the Hydrodynamic size and the Zeta potential of IONPs.

Morphological Modifications

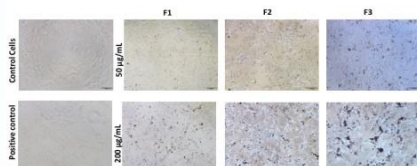


Figure 2: Morphological Changes observed under Inverted Microscope after 24h cell exposure to IONPs

Effects of IONPs on SH-SY5Y Viability

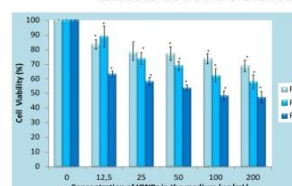


Figure 3: Effects of IONPs on cell viability using the MTT Assay. * $p < 0.05$ using *t*-Student test

Conclusion

Our work evidences the toxic effects of IONPs on Neuroblastoma cells which could be promising for their use to treat cancer. Further studies should be conducted to better understand these findings and particularly the cellular and molecular mechanisms.

References

1. Lim EK, Kim T, *et al.* Nanomaterials for theranostics: recent advances and future challenges. *Chem Rev.* 2015;115:527-94.
2. Valsalva V, Yousang Bontar N, *et al.* An iron oxide nanoparticles coated Carbon nanotube and future perspectives. *J Pharm Biom Med.* 2016; doi: 10.1016/j.jphbm.2016.03.017.
3. Lencina GJM, Chou K, *et al.* $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ by sol-gel with large nanoparticles size for magnetic hyperthermia application. *J Alloys Compd.* 2014;607: 125-31.

- Le 37^{ème} Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie, Paris, France, Mars 2017 "Etude de la Toxicité Hématologique des Nanoparticules de Fer chez le Rat." Dael Askri *et al.*



ETUDE DE LA TOXICITÉ HÉMATOLOGIQUE DES NANOPARTICULES DE FER CHEZ LE RAT WISTAR

Dael Askri ^{1,2*}, Said Galai ³, Michel Sève ², Salem Amara ¹ et Souheil Omar ³

¹. Université de Carthage, Unité de recherche en Physiologie Intégrée, Faculté des Sciences de Bizerte, Bizerte, Tunisie

². Université Grenoble Alpes Plateforme de Protéomique PROMETHEE, LBFA U1055, BeESy, Inserm, CHU de Grenoble, IBP, Grenoble, France

³. Unité de Recherche I2SP24 des mouvements anormaux, des maladies neurologiques orphelines et conséquences neurologiques de l'anoxie cérébrale, Laboratoire de Biologie Clinique, Institut National Mongi Ben Hmida de Neurologie de Tunis, Tunis, Tunisie

* Correspondance: Dael Askri, Doctorante, Plateforme de protéomique PROMETHEE, Grenoble, France, Tel: +3369259993; e-mail: askridael@gmail.com

Introduction

Les Nanoparticules de Fer (NPFe) sont utilisées comme agents théranostiques pour le cancer, et également comme agents de contraste en IRM [1,2]. Néanmoins, leur innocuité chez l'Homme est encore à discuter [3]. Dans ce travail, on se propose d'étudier les effets hématologiques des NPFe sur des rats Wistar males.

Matériel et Méthodes

Dans ce travail, les Nanoparticules de Fer (NPFe) γ -Fe₂O₃ ont été aimablement fournies par Pr. El Mir du Laboratoire de Physique des Matériaux et des Nanomatériaux Appliqués à l'Environnement du Collège des Sciences de Gabès (Tunisie). Les NPFe ont été caractérisées par Microscopie Electronique à Transmission et par Diffraction des Rayons X avant l'expérience.



Sept Injections Intrasnasales journalières
10 mg/kg
 γ -Fe₂O₃ NPs (30nm)

Sacrifice 7 jours après la dernière injection



Collecte du sang

Etude Hématologique

Résultats

Caractérisation des Nanoparticules de Fer (NPFe)

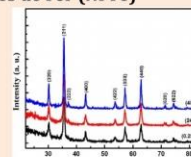
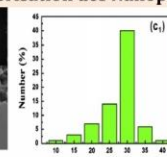
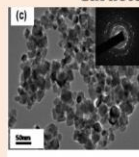


Figure 1: Images de l'analyse de la forme et la taille des NPFe par la Microscopie Electronique à Transmission

Figure 2: Profil de la diffraction des rayons X des NPFe (48h d'agitation taille des NPFe 30nm) [source: GMA, et al., J. Alloy Compd. 2014]

Le MET a montré que les NPFe sont sphériques avec une taille moyenne de 30 nm. La taille cristalline de IONPS 30 nm a été déterminée selon le pic le plus élevé observé en DRX après 48h d'agitation (profil bleu). De plus, les résultats ont montré qu'il n'y a pas d'autres impuretés élémentaires présentes dans NPFe.

Effet sur le poids corporel moyen et le poids relatif des organes chez le Rat

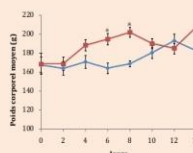


Figure 3: Poids corporel moyen des rats après injection intranasale de NPFe à 10mg/kg. Les données représentent les moyennes $\pm$ SEM de 6 rats par groupe.

	Cerveau (mg/g)	Foie (mg/g)	Reins (mg/g)	Rate (mg/g)	Poumons (mg/g)
Contrôle	9,050.23	53,421.92	9,940.41	3,850.23	7,960.19
NPFe	8,290.29	47,051.56*	8,440.34*	3,150.19	7,390.37

Table 1: Poids relatifs des différents organes des rats après injection intranasale de NPFe à 10mg/kg. Les données représentent les moyennes $\pm$ SEM de 6 rats par groupe.

Les résultats ont montré une augmentation significative du poids corporel moyen des rats en J6, 8 et 14. Ceci peut être expliqué par la stimulation des métabolismes lipidique et protéique chez le rat. Une perte du poids du foie et des reins suggère la présence des lésions au niveau de ces organes.

Effet des NPFe sur les paramètres hématologiques

	Contrôle	NPFe
Globules Rouges $10^6/\text{mm}^3$	6,650.76	7,840.76
Globules Blancs $10^6/\text{mm}^3$	7,320.15	7,520.15
Hémoglobines g/L	12,460.22	13,110.21
Hématocrite %	37,510.66	39,410.61
VCM fL	52,711.05	52,460.96
Plaquettes $10^9/\text{mm}^3$	990.68	807.99*
Neutrophiles %	1,980.37	1,740.28
Lymphocytes %	4,410.48	5,470.50
Monocytes %	0,310.04	0,440.13
Eosinophiles %	0,310.04	0,160.01
Basophiles %	0,0040.003	0,010.004

Table 2: Effets sur les paramètres hématologiques des rats après injection intranasale de NPFe à 10mg/kg. Les données représentent les moyennes $\pm$ SEM de 6 rats par groupe.

L'augmentation des trois lignées cellulaires (GB, GR et plaquettes) serait due à une stimulation de l'hématopoïèse probablement par le biais d'une cytokine pro-inflammatoire. L'administration intranasale des NPFe n'a pas eu, à priori, d'effet aplasant sur la moelle osseuse.

Conclusion

En conclusion, l'administration intranasale des NPFe n'a pas induit d'altération majeure visible ni de l'état de santé des rats Wistar ni de leurs paramètres hématologiques. La thrombocytose semble l'effet le plus marqué des NPFe sur l'hématopoïèse des rats Wistar.

1. Siah WJ, Senechal PR, et al. Industrial applications of nanoparticles. Chem Soc Rev. 2015;44:5793-605.
2. Liu DK, Kim T, Park S, et al. Nanomaterials for therapeutic, recent advances and future challenges. Chem Rev. 2015;115:127-66.
3. Valsalva N, Senechal PR, et al. An iron oxide nanoparticle with a core-shell structure and its use in cancer therapy. J Mater Chem B. 2016; doi: 10.1039/C5TB01601A.
4. Lemaire C, et al. γ -Fe₂O₃ by self-gel with large nanoparticles size for magnetic hyperthermia application. J Alloy Compd. 2014;607:25-33.

- Le 1^{er} Colloque Jeunes Chercheurs de l'Institut Pasteur de Tunis, Tunis, Tunisie, Décembre 2016

“Effects of Iron Oxide Nanoparticles on SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line.” ASKRI Dalel *et al.*



Effects of Iron Oxide Nanoparticles on SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line

Dalel ASKRI^{1,2,3,4}, Sylvia LEHMANN^{2,3,4,5}, Walid RACHIDI⁶, Lassaad EL MIR⁷, Mohsen SAKLY¹, Salem AMARA¹ and Michel SEVE^{2,3,4}

¹: University of Carthage, Fac. Sciences of Bizerte, Unit of Integrated Physiology, Bizerte, Tunisia ²: University Grenoble Alpes, LBFA and BEeSy, Grenoble, France

³: Inserm, U1055, PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France ⁴: CHU de Grenoble, IBP, PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France

⁵: Univ. Grenoble Alpes, ISTerre, Grenoble, France ⁶: CEA Grenoble, INAC/SCIB/LAN, Grenoble, France ⁷: University of Gabes, Fac. Sciences of Gabes, Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials Applied at Environment, Gabes, Tunisia

* Corresponding author: Dalel Askri, Unit of Integrated Physiology, College of Sciences of Bizerte, Zarzouna, Tunisia Tel: +21652731332; e-mail: askridalel@gmail.com

Introduction

Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) are widely used in many fields especially in Biomedicine. Due to their unique properties biocompatibility, biodegradability and high contrast enhancement, they are used as theranostic agents for cancer, and also as MRI contrast agents [1]. So, the safety of these NPs should be studied to optimize their benefits and to minimize their risks [2]. Our study was designed to investigate IONPs effects on the viability of Neuroblastoma cell line SH-SY5Y.

Material and Methods

In this work, three fractions of γ -Fe₂O₃ IONPs were kindly provided by Pr El Mir from the Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials Applied at Environment, College of Sciences in Gabes. The three fractions of IONPs were characterized by XRD and TEM, and in solution by DLS.

SH-SY5Y cells were seeded into 96 well plate at a density of 25.10³ cell/well 24h prior to exposure to IONPs at concentrations (12.5-200 μ g/mL). Cell morphology changes were evaluated using Inverted Microscope. Viability of cells after exposure to IONPs was assessed by MTT Assay. The absorbance was measured at 570nm using a microplate reader. Cell viability was expressed as percentage of live cells / total cells.

Results

IONPs Characterization

The γ -Fe₂O₃ IONPs F1, F2 and F3 were in size range of 14, 18 and 30nm respectively when characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) JEOL (JEM-2100F) at 200kV and by X-Ray Diffraction (PANalytical XpertPro) [3].

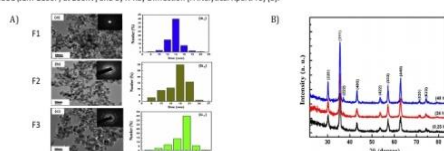


Figure 1: IONPs Characterization using Transmission Electron Microscopy (A) and using X-Ray Diffraction (B).

Dynamic Light Scattering

	F1	F2	F3
MiliQ water			
Size	329.9	188.6	179.2
PdI	0.280	0.409	0.302
Zeta P	-7.79	-6.42	-10.6
FBS free Medium			
Size	926.5	1129	1451
PdI	0.362	0.216	0.254
Zeta P	-10.0	-11.0	-9.55
Medium supplemented with FBS			
Size	381.8	426.2	562.1
PdI	0.235	0.279	0.428
Zeta P	-10.0	-9.97	-9.31
HuCl 0.9% solution			
Size	831.4	874.7	789.6
PdI	0.346	0.277	0.312
Zeta P	-11.2	-8.40	-9.98



Table 1: In solution characterization using the Dynamic Light Scattering to study the Hydrodynamic size and the Zeta potential of IONPs

Morphological Modifications

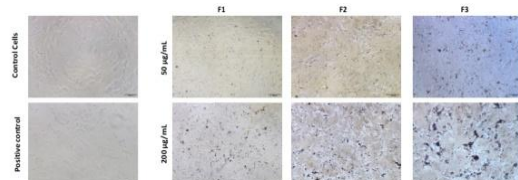


Figure 2: Morphological Changes observed under inverted Microscope after 24h cell exposure to IONPs

Effects of IONPs on SH-SY5Y Viability

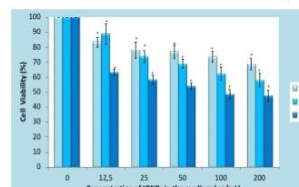


Figure 3: Effects of IONPs on cell viability using the MTT Assay. * $p < 0.05$ using t-Student test

Conclusion

Our work evidences the toxic effects of IONPs on Neuroblastoma cells which could be promising for their use to treat this kind of cancer. Further studies should be conducted to better understand these findings and particularly the cellular and molecular mechanisms.

References

1. Liu H, Kim T, et al. Nanomaterials for therapeutics: recent advances and future challenges. Chem Rev. 2015;115:127-94.
2. Valdiglesias V, Fernández-Berni J, et al. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. J Toxicol Med Biol. 2016; doi: 10.1080/10401445.2016.1151171.
3. Lemaire O, Chen R, et al. γ -Fe₂O₃ by self-gel with large nanoparticles size for magnetic hyperthermia applications. J Alloy Compd. 2014; 607: 120-31.

- Le 4^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, Hammamet, Tunisie, Mars 2016

“Acute Toxicity Induced by Single Iron Nanoparticles Intravenous Injection in Male Rats.”
Dalel Askri *et al.*



STUDY OF IRON NANOPARTICLES EFFECTS ON BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN ADULT MALE RATS



Dalel Askri^{1,2*}, Souhir Ouni¹, Imen Mrad¹, Naima Rihane¹, Lassaad El Mir³, Michel Sève², Mohsen Sakly¹ and Salem Amara¹

¹Unit of Integrated Physiology, College of Sciences, Zarzouna, Tunisia

²Proteomics Platform PROMETHEE, IBP, Inserm, IAB, Grenoble Alpes University, 38 400 Grenoble, France

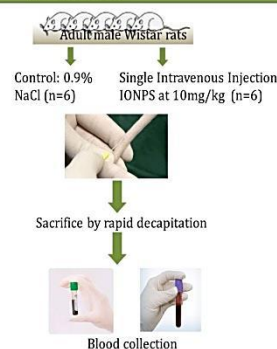
³Laboratory of Physics of Materials and Nanomaterials Applied at Environment, College of Sciences in Gabes, Tunisia

* Corresponding author: Dalel Askri, Unit of Integrated Physiology, College of Sciences, Zarzouna, Tunisia Tel: +21652731332; e-mail: askridalel@gmail.com

Introduction

Over the last few years, iron oxide nanoparticles (IONPs) have been widely used in many fields especially in medicine for MRI as contrast agents, drug delivery and hyperthermia therapy. However, some of these nanoparticles were identified to induce toxicity that should be studied to well understand their mode of action in the body. Thus, we aimed to investigate the pathophysiological effects of IONPs on adult male Wistar rats.

Material and Methods



Results

IONPs characterization

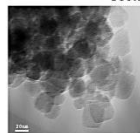


Figure 1: Transmission electron microscopy (TEM) images of synthesized IONPs.

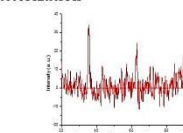


Figure 2: X-ray diffraction patterns for the crystal quality of IONPs.

Effects of IONPs treatment on hematological parameters

Parameters	Experimental group	
	Control	IONPs
WBC 10 ⁹ /L	9.67 ± 1.80	9.74 ± 1.23
RBC 10 ¹² /L	8.23 ± 0.22	8.11 ± 0.27
Hemoglobin g/dL	13.46 ± 0.29	13.36 ± 0.49
Hematocrit %	39.36 ± 0.78	39.68 ± 1.43
MCV fL	47.85 ± 0.49	48.91 ± 0.47
MCH pg	16.38 ± 0.20	16.48 ± 0.16
Platelets 10 ⁹ /L	583.66 ± 10.11	571.83 ± 46.33

Table 2: Effects of IONPs treatment on hematological parameters in wistar rats. Data represent the mean ± SEM of 6 animals per group.

Body weight and organ relative weight changes

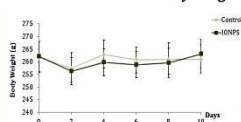


Figure 3: Body weight changes for treated rats with IONPs at dose of 10mg/kg. Data represent the mean ± SEM of 6 animals per group.

	Brain	Liver	Kidneys	Lungs	Spleen	Testis	Heart
Control	7.31 ± 0.28	37.72 ± 0.77	7.64 ± 0.28	7.76 ± 0.36	2.18 ± 0.8	9.92 ± 0.34	3.7 ± 0.11
IONPs	7.14 ± 0.26	38.93 ± 0.88	7.93 ± 0.23	7.28 ± 0.31	2.14 ± 0.22	9.48 ± 0.36	3.42 ± 0.07

Table 1: Relative organ weight (mg/g) changes for treated rats with IONPs at dose of 10mg/kg. Data represent the mean ± SEM of 6 animals per group.

Effects of IONPs treatment on biochemical parameters

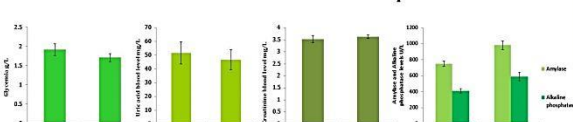


Figure 4: Effects of IONPs treatment on biochemical parameters in wistar rats. Data represent the mean ± SEM of 6 animals per group.

Conclusion

The blood count, the biochemical enzymes and the levels of glucose, creatinine, urea, acid uric, cholesterol, and proteins did not show significant modifications. This could be explained by the rapid clearance of IONPs in the body. However, blood amylase level was found to be higher in the treated group compared to the control; which might be linked to pancreatic toxicity. Our work suggests that acute exposure to IONPs does not have remarkable toxic effects on adult male rats. Further studies of long period exposure should be conducted to more understand the toxicity of these nanoparticles.

