

Cycle de vie de nanoparticules magnétiques dans l'organisme

Jelena Kolosnjaj-Tabi¹, Yasir Javed², Lénéa Lartigue^{1,2}, Christine Péchoux³, Nathalie Luciani¹,
Damien Alloeyau² et Florence Gazeau¹

¹ Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, CNRS – Université Paris Diderot, 75205 Paris Cedex 13, France

² Laboratoire Matériaux et Phénomènes Quantiques, CNRS – Université Paris Diderot, 75205 Paris Cedex 13, France

³ INRA UMR 1313 – Génétique Animale et Biologie Intégrative – Plate-forme MIMA2, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

Auteur correspondant : Florence Gazeau, florence.gazeau@univ-paris-diderot.fr

Reçu le 25 juin 2014

Résumé – Malgré une utilisation toujours croissante de nanomatériaux, leur devenir dans l'organisme reste peu étudié et mal connu. Une meilleure compréhension des interactions entre nanoparticules et environnement biologique est nécessaire pour maîtriser une éventuelle toxicité et développer leurs applications médicales. Dans cet objectif, il est urgent de développer des méthodologies pour détecter, quantifier et suivre l'évolution de nanoparticules dans un milieu biologique complexe en couvrant les échelles pertinentes, du nanomètre au tissu. Dans ce travail, nous décrirons le cycle de vie de nanoparticules magnétiques dans l'organisme, en suivant leurs transformations au cours du temps, de l'injection à l'élimination. Contrairement aux approches de nanotoxicologie, nous adoptons le point de vue des nanoparticules pour identifier l'influence de l'environnement biologique sur leurs propriétés et leur devenir (interactions avec les protéines, confinement cellulaire, dégradation...). Il s'agit d'établir des liens entre la structure initiale des nanoparticules et leur cycle de vie.

Mots clés : Nanoparticules / nanomagnétisme / nanomédecine / nanodégradation

Abstract – Life cycle of magnetic nanoparticles in the organism.

The use of nanomaterials drastically increases and yet their behavior in living organisms remains poorly examined. At the same time a better comprehension of the interactions between nanoparticles and the biological environment would allow us to limit potential nanoparticle-based toxicity and fully exploit nanoparticles medical applications. In this perspective, it is high time we develop methods to detect, quantify and follow the evolution of nanoparticles in the complex biological environment, spanning all relevant scales from the nanometer up to the tissue level. In this work we follow the life cycle of magnetic nanoparticles *in vivo*, focusing on their transformations over time from administration to elimination. As opposed to traditional nano-toxicological approaches, we herein take the nanoparticle perspective and try to establish how biological environment might impact the particles properties and their fate (interaction with proteins, cell confinement, degradation...) from their initial state to a series of changes a nanoparticle might undergo on its journey throughout the organism.

Key words: Nanoparticles / nanomagnetism / nanomedicine / nanodegradation

Introduction

L'augmentation croissante de l'utilisation industrielle des nanomatériaux et leur fort potentiel pour les

applications biologiques et médicales engendrent une exposition accrue de l'homme aux nano-objets, que cette exposition soit intentionnelle ou non. Si la réduction d'une ou plusieurs dimensions d'un

matériau à l'échelle nanométrique lui confère des propriétés physiques inédites motivant un effort de recherche sans précédent, elle le rend également extrêmement réactif à son environnement et donc potentiellement dangereux (Hubbs *et al.*, 2011). La communauté scientifique internationale et les instances dirigeantes ont récemment pris conscience de l'urgence d'étudier la toxicité de nano-objets, afin d'éviter de futurs problèmes sanitaires. Néanmoins, les recherches en nanosciences restent aujourd'hui beaucoup plus focalisées sur l'optimisation des propriétés des matériaux que sur leur transformation et leur devenir à long terme dans un environnement biologique. En dépit de leur importance en termes de santé publique, le cycle de vie des nanoparticules dans l'organisme reste peu exploré. L'étude des nanomatériaux dans un environnement biologique se heurte en effet à plusieurs difficultés, qui s'ajoutent à la nouveauté des enjeux posés.

Premièrement il est difficile de caractériser l'état des nanoparticules dans un environnement complexe. L'importance relative de la surface par rapport au volume des nanomatériaux les rend particulièrement sensibles aux interactions avec leur environnement proche, aux processus de transformations physiques et chimiques initiés à leur surface (Thomas *et al.*, 2011; Lowry *et al.*, 2012). Les transformations d'origine biologique sont encore plus complexes car elles impliquent des interactions avec une multitude de molécules et d'entités biologiquement actives qui affectent tant l'état physique (organisation, agrégation, propriétés physiques) que l'évolution chimique et biologique des nanomatériaux (opsonisation, attaque enzymatique, dissolution, trafic cellulaire...) (Rivera-Gil *et al.*, 2009). Ainsi si les propriétés physico-chimiques de nanoparticules inorganiques peuvent être modulées à souhait grâce aux procédés de synthèse des matériaux (nature du cœur inorganique, enrobage de surface, forme, architecture, taille...), on prédit plus difficilement le comportement de ces matériaux dans des milieux biologiques par essence dynamiques et complexes (Fadeel *et al.*, 2013). Cette difficulté a conduit certains auteurs à distinguer l'identité synthétique des nanoparticules telle qu'elle est donnée par ses concepteurs, de leur identité « biologique » qui tient compte des modifications opérées par le milieu d'application (Monopoli *et al.*, 2012; Bertoli *et al.*, 2014). Un des aspects récemment mis au jour est que les nanoparticules vont spontanément être entourées d'une couronne de biomolécules, qui vont déterminer leur transport dans les liquides physiologiques, leur capture cellulaire, leur bio-persistance et leur éventuelle toxicité pour l'organisme (Albanese *et al.*, 2014). Ainsi la commensurabilité des constituants du vivant avec les nanomatériaux fait de ces derniers des entités susceptibles de transformations orchestrées par l'activité

biologique. En conséquence les nanoparticules, dans les milieux qu'elles rencontrent, ne seraient pas définies par leur identité propre ou « synthétique », mais bien plutôt par leurs *interactions* multiples et dynamiques avec le milieu, interactions qui dictent leur devenir et leurs effets (Loeve *et al.*, 2013). La problématique est donc de caractériser, de comprendre et à terme de maîtriser ces interactions nanoparticules/environnement.

La deuxième difficulté est d'ordre méthodologique. Du fait de leur taille, de leurs interactions et de leur rareté, les nanoparticules restent difficiles à détecter, à quantifier et à caractériser *in situ* dans un environnement complexe tel que l'organisme. Il faut donc adapter ou inventer des méthodes de nanométrie qui permettent de suivre dans le temps leur biodistribution de l'échelle tissulaire à l'échelle nanométrique, d'étudier leurs transformations et les processus d'élimination ou encore de distinguer les nanoparticules de leurs produits de dégradation. Pour ce faire, certains nanomatériaux conçus pour la nanomédecine et la biologie sont dotés de propriétés magnétiques, optiques ou radioactives qui permettent de les détecter par des méthodes d'imagerie non invasive. Le suivi des propriétés physiques de ces nanoparticules peut également apporter des informations sur leur cycle de vie. Enfin les analyses *ex vivo* par des méthodes d'analyse élémentaire, de spectroscopie quantitative ou encore de microscopie optique et électronique doivent être développées pour tracer les nanomatériaux, leur spéciation et leurs résidus dans les tissus biologiques de manière quantitative ou encore caractériser leurs modifications morphologiques aux échelles pertinentes.

Enfin, un des défis essentiels des nanosciences sera de relier la notion de cycle de vie des nanoparticules à leurs effets biologiques et leur potentielle toxicité. L'approche dominante de la nanotoxicologie, héritière de la toxicologie classique, est d'évaluer les effets d'une exposition aux nanoparticules en étudiant leurs conséquences biologiques (Szalay *et al.*, 2012). Mais il faut également prendre en considération les effets de l'environnement biologique sur les nanoparticules elles-mêmes, en évaluant leurs transformations, dégradation ou élimination. L'enjeu est donc de mieux comprendre, voire de prédire, en fonction de l'identité synthétique des nanoparticules, la relation entre leur devenir et leurs effets physiopathologiques.

Dans cet article, nous allons nous intéresser à une classe de nanomatériaux très prometteurs pour les applications médicales : des nanoparticules (NP) inorganiques à propriétés magnétiques. Ces nanoparticules, le plus souvent constituées d'oxyde de fer, se comportent comme des nano-aimants et combinent différentes fonctions dans un même objet. Elles servent d'agent de contraste pour l'imagerie par résonance

magnétique (IRM) ce qui leur confère une utilité diagnostique. Activées par un champ magnétique alternatif, elles chauffent localement leur environnement et permettent de brûler des tumeurs (ablation thermique) ou de délivrer des médicaments par des vecteurs thermosensibles grâce à un stimulus à distance. Enfin par l'intermédiaire de forces magnétiques, elles permettent de manipuler ou d'attirer vers un site cible des vecteurs ou encore des cellules à visée thérapeutique. Nous avons récemment décrit dans cette même revue leurs applications pour les thérapies cellulaires et la médecine régénérative (Wilhelm & Gazeau, 2012). Enfin très dernièrement, ces nanoparticules ont été proposées comme colle chirurgicale pour améliorer des processus de suture ou favoriser l'implantation de biomatériaux dans l'organisme (Meddahi-Pellé *et al.*, 2014). Pour toutes ces nombreuses applications, souvent combinées entre elles, se pose la question du devenir des nanoparticules inorganiques dans l'organisme. Si l'on n'observe pas de toxicité aiguë des oxydes de fer, il faut se demander combien de temps ces nanoparticules peuvent persister dans l'organisme, dans quels organes et quelles structures biologiques elles peuvent s'accumuler, si elles sont susceptibles de se dégrader et si leurs produits de dégradation peuvent être assimilés, éliminés ou recyclés. Une question connexe se pose également sur l'efficacité de ces nanoparticules une fois injectées dans l'organisme : si elles sont modifiées par leur environnement biologique, que deviennent leurs propriétés magnétiques à la base des applications ? Combien de temps seront-elles détectables par IRM ? Pourra-t-on les faire chauffer de manière répétée sans les réinjecter dans la tumeur ? Leur destinée dans l'organisme détermine d'une part leur innocuité à long terme, mais également leur efficacité en termes diagnostique ou thérapeutique. C'est à ces questions que nous apporterons des éléments de réponses en suivant l'odyssée des nanoparticules dans l'organisme et leurs transformations dans des milieux mimant les environnements biologiques qu'elles rencontrent. Dans une première partie, nous nous intéresserons aux interactions complexes entre nanoparticules et protéines sanguines et comment elles orientent la capture cellulaire. Nous montrerons dans une deuxième partie comment l'internalisation cellulaire et l'accumulation dans des vésicules de stockage peuvent modifier les propriétés magnétiques des nanoparticules et leurs efficacités pour les applications. La troisième partie sera consacrée au devenir à long terme des particules et décrira des méthodes de quantification de ces nano-aimants dans l'organisme. Enfin nous discuterons des possibles mécanismes de dégradation des nano-aimants et montrerons l'intérêt d'aller observer leurs transformations morphologiques à l'échelle pertinente, c'est-à-dire à l'échelle nanométrique.

Nous discuterons également comment la méthodologie mise en place dans ces études peut être utile pour l'étude du cycle de vie biologique d'une grande variété de nanoparticules.

Premier contact : interactions avec les protéines sanguines

Les interactions avec les biomacromolécules (par exemple les protéines du plasma) jouent un rôle critique, récemment mis en exergue, dans le devenir des nanoparticules. L'adsorption d'une *couronne protéique* à la surface des particules change l'identité biologique des nanoparticules, telles qu'elles sont vues par les cellules et modifient dynamiquement l'interface avec l'environnement (figure 1) (Cedervall *et al.*, 2007; Casals *et al.*, 2010). La pharmacocinétique, la capture macrophagique et la biodistribution des nanoparticules administrées par voie parentérale sont profondément affectées par les interactions avec les protéines, dont la nature peut varier au cours du cheminement des nanoparticules dans l'organisme (du flux sanguin au compartiment intracellulaire, par exemple) (Dobrovolskaia *et al.*, 2008; Lundqvist *et al.*, 2011). La couronne protéique, dynamique par nature, peut masquer des agents de ciblage greffés sur les nanoparticules et mettre en péril les possibilités d'adressage spécifique des nanoparticules (Salvati *et al.*, 2013).

Dans le cas de nanoparticules d'oxyde de fer, nous avons utilisé leurs propriétés magnétiques pour sonder la couronne protéique qui se forme à leur surface (Lartigue *et al.*, 2012). En effet les nanoparticules s'orientent dans la direction d'un champ magnétique. Lorsqu'on coupe le champ, elles se désorientent avec un temps de relaxation proportionnel à leur volume hydrodynamique. C'est ce temps de relaxation que l'on mesure en enregistrant le signal de biréfringence induite magnétiquement. On mesure ainsi l'augmentation de volume due à l'adsorption de protéines ou à l'aggrégation des nanoparticules lorsqu'elles sont mises en présence de plasma (figure 1). Par cette technique qui permet de sonder spécifiquement les nanoparticules magnétiques, couplée à un tri magnétique et à l'identification des protéines par électrophorèse, nous avons pu montrer plusieurs résultats importants. Premièrement, comme attendu, l'adsorption de protéines dépend de l'enrobage de la nanoparticule. Deuxièmement, on ne retrouve pas les mêmes protéines à la surface des nanoparticules si ces dernières sont incubées avec 10 % de plasma (condition généralement utilisée pour des cultures cellulaires *in vitro*) ou avec du plasma pur (condition proche de l'*in vivo*). Ce résultat remet en cause la pertinence des essais *in vitro* pour déterminer le comportement et la toxicité de nanoparticules et met en lumière la difficulté de reproduire des conditions mimant les

INTERACTION AVEC LES PROTÉINES DU SANG

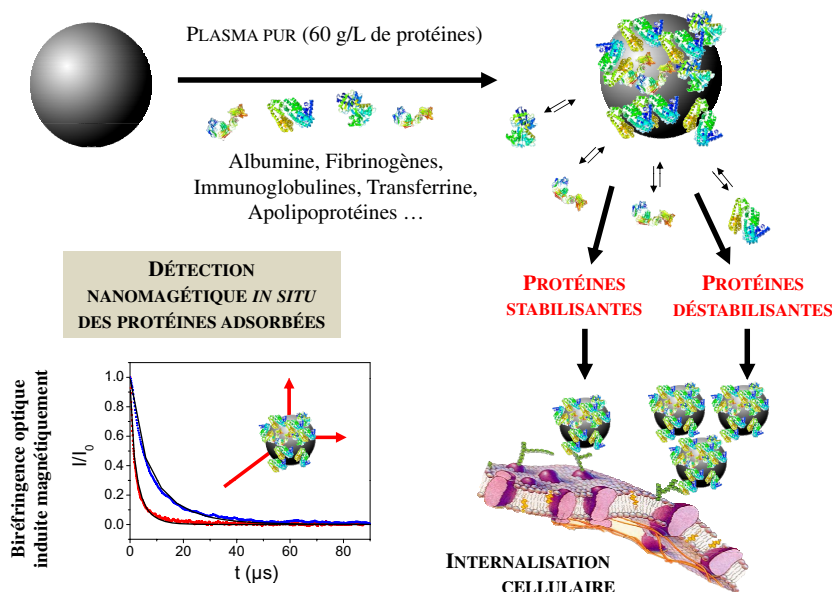


Fig. 1. Les interactions des nanoparticules avec les protéines plasmatiques dépendent de leur état de surface et peuvent conduire à la formation d'une couronne protéique dynamique impliquant différentes sortes de protéines. Ce processus complexe, encore mal compris, modifie à la fois l'identité biologique des nanoparticules vue par les cellules et leur état physique, isolé ou agrégé. La pharmacocinétique, la biodistribution et la capture cellulaire de NP vont dépendre fortement de ces interactions locales avec l'environnement biologique. L'adsorption des protéines sur des NP magnétiques peut être suivie spécifiquement en mesurant la relaxation du signal de biréfringence magnéto-optique induit par les NP (Lartigue *et al.*, 2012).

phénomènes rencontrés *in vivo* lors de l'injection intraveineuse des nanoparticules. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que certaines protéines telles que l'albumine avaient un effet stabilisant sur les nanoparticules tandis que d'autres, comme le fibrinogène, provoquaient leur agrégation. De manière remarquable, ces deux populations de particules entourées de protéines différentes et d'état physique distinct (isolées *versus* agrégées) peuvent coexister dans le plasma. De surcroît, les cellules du système immunitaire, en particulier les macrophages chargés d'éliminer ces corps étrangers, ne vont pas réagir, ni capturer de la même manière et dans le même temps ces différentes populations de nanoparticules d'identités biologique (couronne protéique) et physique distinctes. On voit par là que l'interaction nanoparticule/biomolécule peut drastiquement influencer leur distribution dans l'organisme et leur devenir immédiat.

L'internalisation cellulaire modifie les propriétés magnétiques des nanoparticules

Un facteur important pour le devenir des nanoparticules est leur tendance à s'agglomérer dans les milieux

biologiques, qui résulte d'une déstabilisation chimique, du relargage des agents de surface, de l'adsorption de molécules de l'hôte et de processus biologiques actifs tels que l'internalisation cellulaire (Fayol *et al.*, 2012; Lartigue *et al.*, 2012). En effet la capture des nanoparticules par les cellules se fait le plus généralement par un mécanisme spontané d'endocytose grâce auquel les nanoparticules sont internalisées dans des vésicules intracellulaires (Wilhelm *et al.*, 2002). Le trafic intracellulaire, qui consiste en des événements de fusion/fission membranaire des compartiments d'endocytose, conduit les nanoparticules dans des vésicules de dégradation et de stockage appelés lysosomes. Dans le cas des nanoparticules d'oxyde de fer utilisées en imagerie, on retrouve la grande majorité des nanoparticules injectées par voie intraveineuse dans les lysosomes des macrophages résidant dans le foie et dans la rate. La capture des nanoparticules est extrêmement spécifique et les nanoparticules sont rapidement confinées à très forte concentration dans les lysosomes des macrophages. La question qui se pose alors est de savoir comment une telle concentration locale de NP peut être prise en charge par la cellule.

D'un point de vue physique, ce confinement à l'échelle subcellulaire n'est pas neutre pour les propriétés magnétiques des NP, qui vont, d'une part,

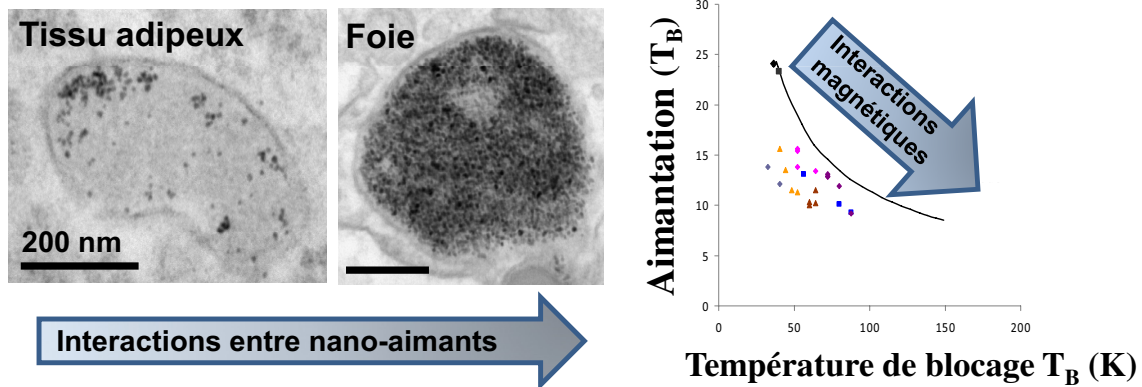


Fig. 2. Modifications des propriétés superparamagnétiques de nanoparticules d'oxyde de fer dues à leur confinement dans les lysosomes intracellulaires (à gauche, exemple de confinement lysosomal dans les macrophages du tissu adipeux (faible confinement)) ou dans les macrophages du foie (fort confinement). Les interactions dipolaires magnétiques entre nanoparticules tendent à diminuer l'aimantation et ralentir la dynamique magnétique des nanoparticules (augmentation de leur température de « blocage »), avec des conséquences sur leur efficacité pour l'hyperthermie thérapeutique sous l'action d'un champ magnétique alternatif (Lévy *et al.*, 2011c).

interagir entre elles du fait de leur proximité (interactions dipolaires magnétiques) et, d'autre part, perdre leurs degrés de liberté de rotation ou de translation (figure 2). La réponse magnétique des NP à un champ externe s'en trouve frustrée et la susceptibilité magnétique diminuée avec, en retour, une augmentation de l'hystérésis magnétique (rémanence de l'aimantation). Ainsi la capacité de chauffage des NP sous un champ magnétique alternatif est altérée lorsque ces dernières s'adsorbent sur la membrane cellulaire et s'internalisent dans les cellules tumorales (Di Corato *et al.*, 2014). De ce fait, il peut être intéressant de favoriser une distribution extracellulaire des nanoparticules pour préserver leur capacité de chauffage qui est généralement optimisée en dehors de l'environnement biologique (Kolosnjaj-Tabi *et al.*, 2014). Inversement le confinement intracellulaire est très favorable pour la détection de cellules par IRM (Lévy *et al.*, 2012). En effet la cellule, qui concentre les sources de champ magnétique dans un volume restreint, est vue par les protons environnants comme une importante inhomogénéité de champ. Il en résulte une perte de signal IRM localisée sur la cellule (Smirnov *et al.*, 2006). Grâce à cet effet, on peut suivre dans le temps et de manière non invasive la migration d'une population cellulaire préalablement marquée par les NP puis injectée dans l'organisme (Smirnov *et al.*, 2008). Cette méthode d'imagerie cellulaire *in vivo* est particulièrement intéressante pour évaluer les essais de thérapie cellulaire, où l'on injecte dans l'organisme des cellules thérapeutiques (Di Corato *et al.*, 2013; Kolosnjaj-Tabi *et al.*, 2013). La concentration des NP dans l'espace intracellulaire permet également de manipuler les cellules à distance par des systèmes d'aimants. Ainsi on peut utiliser des forces magnétiques

sur les cellules pour contrôler leur organisation lors de la construction de tissus *in vitro* (ingénierie tissulaire), qui seront ensuite implantés dans l'organisme (Fayol *et al.*, 2013a, 2013b). L'attraction magnétique sert également à retenir ou à attirer des cellules d'intérêt thérapeutique dans l'organe à régénérer (par exemple le cœur) et à optimiser la thérapie (Cheng *et al.*, 2010; Chaudhury *et al.*, 2012).

Pour toutes ces applications, il reste aux cellules et à l'organisme à prendre en charge les NP qu'elles ont capturées. Notons que la caractérisation magnétique des tissus biologiques permet d'obtenir des informations sur l'état de confinement local des nanoparticules à l'échelle intracellulaire dans les différents organes (figure 2). En effet, on peut modéliser les effets d'interactions magnétiques dus à l'internalisation cellulaire (Lévy *et al.*, 2011a) et en déduire quelles modifications des propriétés magnétiques ils entraînent. Ainsi les mesures magnétiques à l'échelle macroscopique confirment les observations de TEM, montrant que la concentration de NP dans les lysosomes est plus importante dans les macrophages résidents du foie et de la rate que dans les monocytes/macrophages circulants recrutés sur les sites d'inflammation (figure 2). Le suivi de propriétés magnétiques de NP apporte donc des informations importantes sur les biotransformations qu'elles subissent (Lévy *et al.*, 2011c). Ces transformations affectent directement les propriétés utiles pour les applications tant thérapeutiques que diagnostiques.

Qu'en est-il des transformations à long terme des nanoparticules? Comment évaluer les processus d'élimination ou de dégradation des nanoparticules? Comment contrôler la persistance des NP dans les organes?

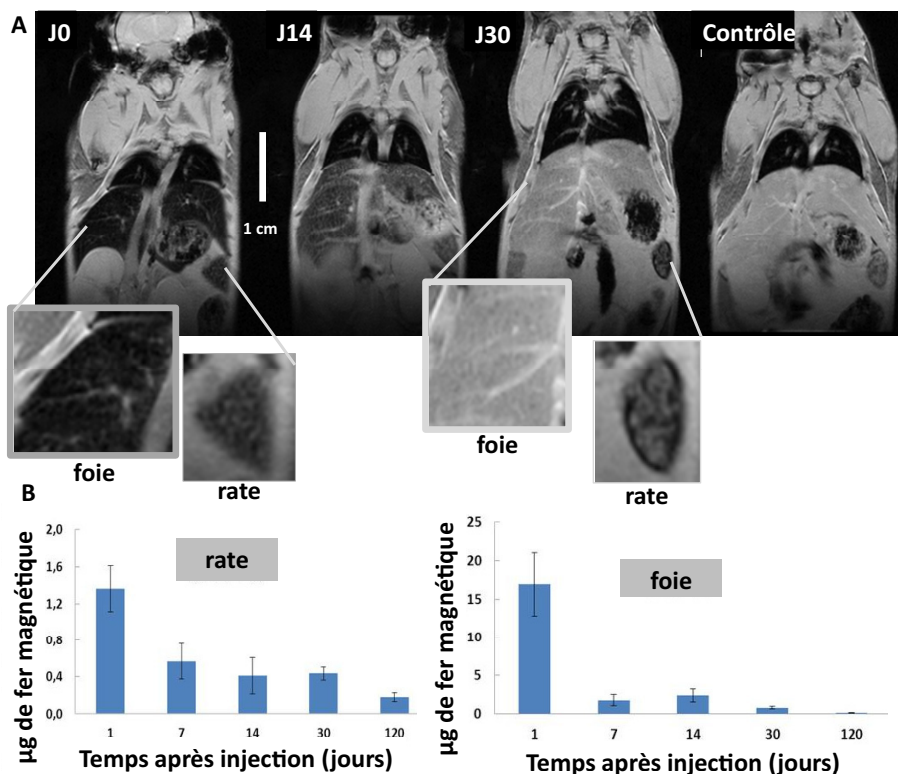


Fig. 3. (A) Évolution temporelle du signal IRM (séquence d'écho de gradient) sur des souris injectées avec des nanocubes d'oxyde de fer (20 nm, 56 μg de fer magnétique injectés). On remarque que le noircissement dû à l'accumulation des nanocubes dans le foie et la rate diminue au cours du temps. (B) Quantification par résonance paramagnétique électronique (RPE) dans le foie et la rate *ex vivo* de la quantité de fer magnétique sous la forme de nanocubes. On remarque une persistance plus longue dans la rate que dans le foie (Kolosnjaj-Tabi *et al.*, 2014).

Élimination et dégradation : de l'échelle tissulaire à l'échelle nanométrique

Afin de caractériser le devenir des nanoparticules dans l'organisme, nous avons besoin de méthodes :

- pour les quantifier alors qu'elles représentent une fraction infime de la masse totale (on les mesure en ppm ($\mu\text{g}/\text{g}$) voire en ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)), et pour distinguer les NP de leurs produits de dégradation,
- pour les localiser de l'échelle de l'organisme à l'échelle subcellulaire en fonction du temps,
- pour suivre l'évolution de leurs propriétés,
- et enfin pour observer à l'échelle nanométrique aussi bien leurs transformations que leurs interactions avec les entités biologiques environnantes.

Dans le cas de nanoparticules d'oxyde de fer, il faut noter que le contenu en fer endogène dans l'organisme (de l'ordre de 50 mg/kg chez l'homme) est bien supérieur au fer injecté sous forme de nanoparticules (2,5 mg/kg pour une IRM). On ne peut donc utiliser les techniques d'analyse élémentaire pour quantifier ces nanoparticules. En revanche leurs propriétés

magnétiques offrent l'opportunité d'une quantification et d'une caractérisation par des méthodes de nanomagnétisme. Ainsi la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE) est un outil de quantification à la fois sensible et spécifique des NP (Lévy *et al.*, 2011b). Les mesures d'aimantation en fonction du champ magnétique ou de la température viennent compléter la RPE car elles reflètent la distribution en taille des NP et leur état d'agrégation. Après injection par voie intraveineuse de NP de maghémite de forme sphérique (7–8 nm) ou cubiques (20 nm), on observe qu'une grande majorité des NP se retrouvent dans le foie et dans une moindre mesure dans la rate (la concentration par gramme d'organe est néanmoins plus élevée dans la rate que dans le foie) (Lévy *et al.*, 2011b; Kolosnjaj-Tabi *et al.*, 2014). La quantité de NP diminue dans les premiers mois après injection, plus rapidement dans le foie que dans la rate. Ces résultats sont corroborés par l'IRM *in vivo* qui montre que la prise de contraste due aux NP diminue dans le temps (figure 3). Cette diminution du fer magnétique peut provenir soit d'un processus d'élimination, soit d'un processus de dégradation

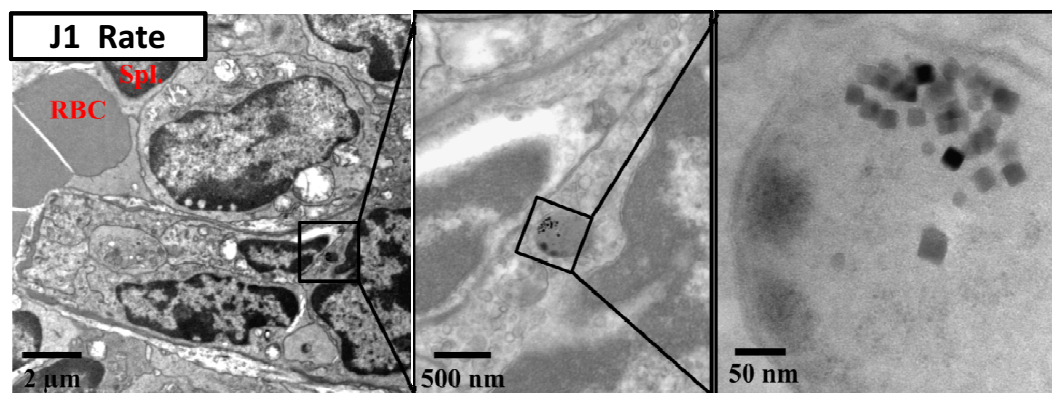


Fig. 4. Exemple de localisation de nanocubes d'oxyde de fer (20 nm) dans des coupes de rate de souris observées à différents grossissements (RBC : red blood cells, Spl : Splénocytes).

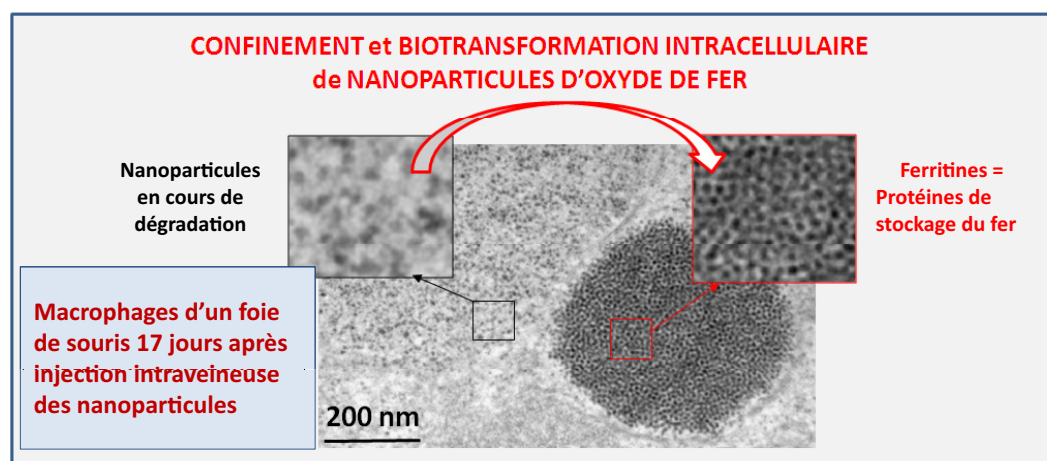


Fig. 5. Exemple de biotransformation des nanoparticules d'oxyde de fer utilisées pour l'imagerie IRM (développée par Guerbet, diamètre 7–8 nm). Les nanoparticules restent confinées dans les compartiments intracellulaires des macrophages du foie 17 jours après leur injection intraveineuse. On observe cependant un transfert du fer dégradé vers des protéines de stockage qui sont elles-mêmes confinées. Par ce mécanisme de prise en charge locale, la cellule pourrait limiter l'émission d'ions fer libres, qui sont toxiques (Lévy *et al.*, 2011b), dans le cytosol.

des NP en espèces non magnétiques, soit encore d'une combinaison de ces deux processus. Le changement des dynamiques magnétiques de nanoparticules, sondées par leur dépendance en température, permet d'affirmer qu'il y a effectivement dégradation des nanoparticules qui perdent leurs propriétés magnétiques d'origine (Lévy *et al.* 2011b).

Ces mesures macroscopiques sont complétées par les observations en TEM (*Transmission Electron Microscopy*) et EDX (spectroscopie par analyse dispersive des rayons X) sur des coupes de foie et de rate (figure 4). Si quelques jours après leur administration, on retrouve les NP intactes confinées dans les lysosomes intracellulaires, leur distribution subcellulaire et leur aspect évolue au cours du temps. Les NP ont tendance à se ségréger à la périphérie du lysosome et coexistent avec une quantité croissante de

nanoparticules monodispersées de petite taille (6 nm) chargées en fer, mais faiblement cristallines (figures 5 et 6) (Lévy *et al.*, 2011b; Lartigue *et al.*, 2013). On identifie ces petites particules à la ferritine qui est une protéine endogène chargée du stockage du fer. En cas d'excès de fer, l'apoferritine, constituée de 24 sous-unités qui s'assemblent pour former une coquille creuse, peut oxyder les ions ferreux Fe^{2+} et les stocker à l'intérieur de leur coquille sous forme de cristallites d'oxyhydroxyde de fer minéral (principalement ferrihydrite). Chaque protéine peut ainsi confiner jusqu'à 4500 atomes de fer sous forme ferrique (Fe^{3+}) évitant ainsi la réaction de Fenton sur les ions ferreux dans le cytoplasme ce qui est toxique pour la cellule en raison de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ainsi l'homéostasie du fer dans l'organisme est un processus finement régulé par un ensemble de protéines

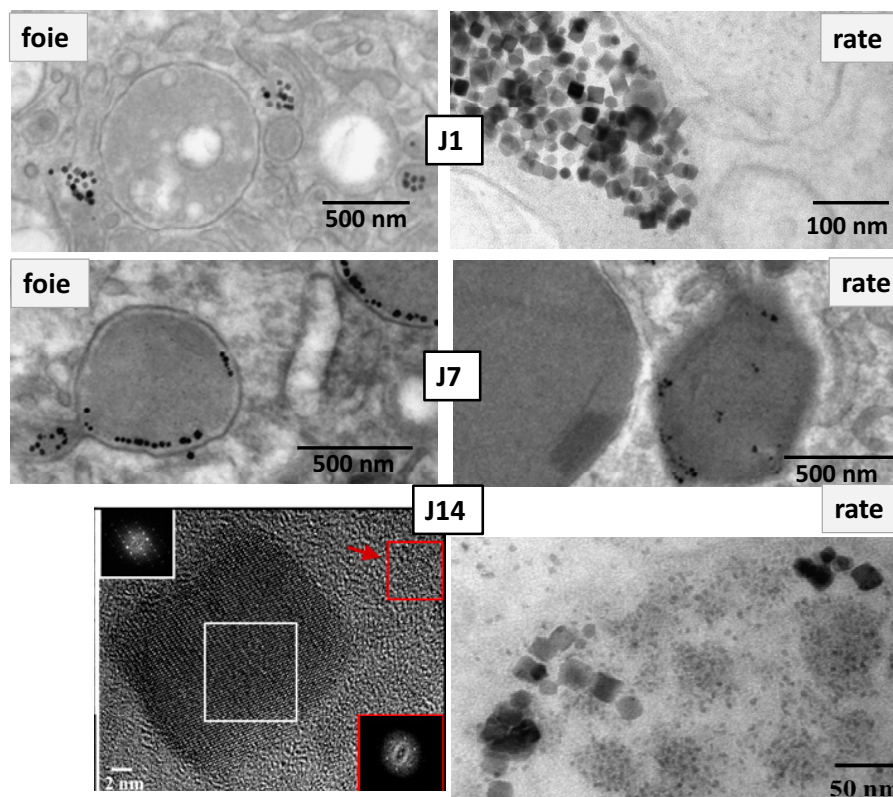


Fig. 6. Dégradation intracellulaire de nanocubes d'oxyde de fer (20 nm de côté) recouverts par du polyéthylène glycol, après leur injection intraveineuse chez la souris. Les images représentent des coupes de rate et de foie observées à l'échelle intracellulaire. Les nanocubes sont présents dans les cellules macrophagiques et leur distribution spatiale intralysosomale évolue dans le temps. On observe à temps long la coexistence des nanocubes dégradés et de nanocavités protéiques de ferritine (cadres rouges) qui se remplissent de fer, suggérant un mécanisme local de transfert du fer libéré par les nanocubes (Lartigue *et al.*, 2013).

de détection, transport, régulation et stockage du fer pour subvenir aux besoins en fer pour la synthèse de l'hémoglobine et éviter les excès (Beaumont & Delaby, 2009). La présence de ferritine chargée en fer au voisinage de nanoparticules d'oxyde de fer qui montrent des signes de dégradation (altération de la forme dans le cas des cubes par exemple) suggère un mécanisme local de transfert du fer libéré par les nanoparticules vers les protéines de stockage. Cette hypothèse est cohérente d'une part avec la surexpression (à 4 mois post-injection) des gènes codant pour cette protéine, d'autre part avec l'observation d'une signature magnétique caractéristique de la ferrihydrite lorsque la signature magnétique des NP a disparu. Remarquons qu'un tel scénario permettrait à la cellule de minimiser la toxicité du fer labile en confinant les échanges de fer aux compartiments lysosomaux : le fer resterait stocké sous forme cristalline non toxique dans les nanoparticules d'origine au sein des lysosomes jusqu'à ce que les protéines, synthétisées et recrutées au voisinage des NP, puissent prendre en charge le fer libéré par ces dernières lors de leur dégradation. Ce

scénario est également cohérent avec l'isolement progressif des NP qui s'entourent de ferritine dans les lysosomes (figure 6) (Lartigue *et al.*, 2013). Néanmoins les mécanismes de dissolution et de transfert du fer des NP vers la protéine restent encore inconnus et sont actuellement en cours d'étude. Il faudrait également démontrer de manière formelle ce transfert métallique *in vivo*. Ainsi l'implication du métabolisme du fer dans le recyclage des NP d'oxyde de fer pourrait expliquer l'innocuité de ces nanoparticules puisqu'aucune toxicité n'a été rapportée jusqu'alors chez des animaux sains (Bourrinet *et al.*, 2006 ; Szalay *et al.*, 2012). Il s'agirait donc de nanoparticules assimilables par l'organisme à long terme. Le métabolisme du fer étant impliqué dans de nombreuses situations physiopathologiques, les perturbations de l'homéostasie du fer par la présence des NP est néanmoins à surveiller, par exemple dans un contexte d'inflammation. Par ailleurs, on remarque que la cinétique de disparition des propriétés magnétiques des NP dépend de la dose injectée, de l'organe, de la fonctionnalisation des particules, de leur forme et taille (Lévy *et al.*, 2010, 2011b ;

Lartigue *et al.*, 2013). Il est donc nécessaire de mieux comprendre les facteurs intrinsèques aux particules et les acteurs biologiques qui participent à la prise en charge des nanoparticules.

De manière à limiter l'expérimentation animale pour des raisons d'éthique, nous avons cherché à mimer l'environnement lysosomal par un système modèle reconstitué. Les expériences sur cellules *in vitro* se heurtent à la durée de vie limitée des cellules en culture primaire et à la division rapide des cellules immortalisées qui dilue rapidement les NP internalisées. De plus, les mécanismes de régulation du fer ne sont pas forcément à l'œuvre dans une population cellulaire isolée en culture. En revanche, il a été montré qu'un milieu tamponné au pH du lysosome (pH 4.7) et supplémenté en ions citrate, jouant le rôle de chélatant du fer, était suffisant pour induire une dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer (Arbab *et al.*, 2005; Lévy *et al.*, 2010). Nous utilisons ce milieu minimal pour suivre dans le temps l'évolution des propriétés des particules et les relier à leurs modifications morphologiques et structurales observées en TEM. Ainsi il apparaît que la nature des molécules à la surface de NP (qui ont pour rôle de stabiliser les particules en suspension colloïdale et éventuellement de limiter l'adsorption de protéines plasmatiques) peut changer la cinétique de dissolution des nanoparticules (Lévy *et al.*, 2010). L'étude des nanocubes magnétiques est particulièrement intéressante car on peut suivre l'évolution de leur géométrie en TEM haute résolution (Lartigue *et al.*, 2013). Comme l'illustre la figure 7, l'attaque des cubes par le milieu mimant l'environnement lysosomal se fait principalement par les coins. Néanmoins la structure cristalline initiale (structure spinelle de la maghémite) persiste au cours de la dégradation même si la forme cubique est rapidement perdue et certaines faces se dissolvent préférentiellement. En faisant une cartographie du carbone par la technique EFTEM (*Energy Filtered Transmission Electron Microscopy*), on s'aperçoit que les surfaces de nanocubes les plus promptes à la dégradation sont celles qui ont une densité plus faible de polymères, en particulier au niveau des coins. Cette observation suggère que la vitesse de dissolution d'un cube est limitée par la nature et la distribution locale du polymère recouvrant sa surface et donc par l'accessibilité des molécules chélatantes (les ions citrate) à la surface de l'oxyde de fer. De plus, en accord avec l'hypothèse d'accessibilité, on remarque que les agrégats de cubes se dégradent beaucoup moins facilement que les cubes isolés. Ces analyses à l'échelle nanométrique sont confirmées par l'évolution des propriétés magnétiques des nanocubes. Ainsi les cubes recouverts d'un polymère amphiphile conservent leur aimantation et leur capacité de chauffage plus longtemps que les mêmes cubes recouverts de polyéthylène

glycol, un polymère hydrophile. Observés en TEM, ces derniers se dégradent plus facilement, même sous la forme d'agrégats. Cette influence de l'aggrégation peut être pertinente *in vivo* : agrégés aux temps courts dans les lysosomes, les cubes ont tendance à s'individualiser avant d'être dégradés et probablement recyclés par la ferritine. On observe également, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que certains cubes conservent leur structure initiale alors que d'autres sont complètement dissous (le nombre de cubes se raréfie). Qu'ils s'agissent des sphères ou des cubes, la distribution en taille des particules et les propriétés magnétiques associées varient peu dans le temps, mais leur concentration diminue. Cela suggère un mécanisme non linéaire où toutes les particules ne seraient pas attaquées à la fois, mais celles qui sont attaquées se dissolvent complètement. Cette hypothèse, peu intuitive *a priori*, pourrait expliquer qu'on retrouve des cubes intacts dans les lysosomes jusqu'à 6 mois après l'injection.

Une de questions essentielles pour les applications est de comprendre comment on peut moduler la bio-persistance des nanoparticules *in vivo*. Outre la fonctionnalisation de surface qui semble jouer un rôle essentiel, l'architecture des NP est également un paramètre important. Nous avons étudié la dégradation des nanoparticules en forme de fleurs (de l'ordre de 20 nm), constituées par la coalescence de petits cœurs d'oxyde de fer au moment de la synthèse (Javed *et al.*, 2014). De manière remarquable, les cœurs magnétiques s'assemblent pour former un monocristal et orientent leurs moments magnétiques dans une même direction. Les propriétés exceptionnelles de ces nanofleurs pour l'hyperthermie et l'IRM proviennent de ce magnétisme coopératif (Lartigue *et al.*, 2013). En suivant l'évolution de nanofleurs individuelles dans le milieu mimant le lysosome, nous observons la désintégration des nanofleurs en petites particules, le creusement du monocristal se faisant au niveau des pores de la structure initiale. En se désintégrant, les fleurs perdent leur magnétisme coopératif et voient leur capacité de chauffage et leurs propriétés de contraste pour l'IRM drastiquement diminuer. Ici c'est la perte de l'organisation collective qui affecte les propriétés et on peut clairement relier la structure à l'échelle nano aux propriétés macroscopiques. Nous voyons ici que les propriétés utiles aux applications peuvent être plus ou moins rapidement perdues à cause de la biodégradation des particules. Il faut cependant noter que les cinétiques de dégradation/élimination *in vivo* sont beaucoup plus lentes que celles observées *in vitro* dans le milieu modèle (quelques mois *versus* quelques heures et jours), ce qui laisse du temps pour l'utilisation diagnostique ou thérapeutique des nano-aimants.

Néanmoins plusieurs questions générales se posent. Peut-on réaliser un compromis entre maintien à court

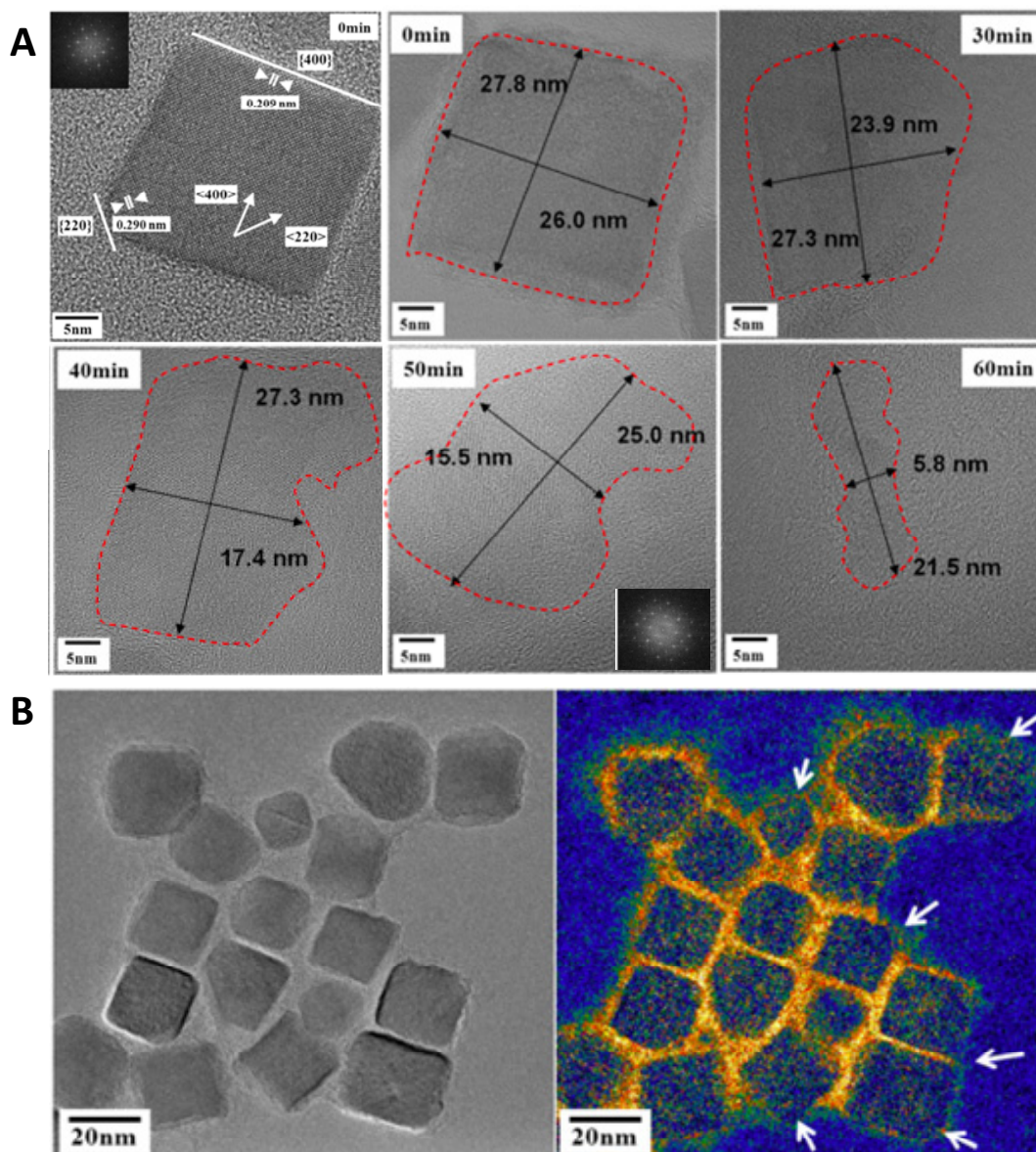


Fig. 7. Évolution de nanocubes d'oxyde de fer recouverts d'un polymère amphiphile dans un milieu mimant l'environnement lysosomal (pH 4.7, 20 mM en citrate). (A) On suit en HRTEM (*High Resolution Transmission Electron Microscopy*) l'évolution de la forme et de la cristallinité d'un même cube immergé pendant différents laps de temps dans le milieu de dégradation. Le cube s'érode principalement par les coins mais conserve sa structure cristalline originale. (B) La cartographie du polymère (carbone en jaune) autour des cubes, obtenue par la technique EFTEM, montre que l'attaque du nanocube se fait préférentiellement sur les sites où la densité de polymères est faible (coins) (Lartigue, 2013).

terme des propriétés utiles et dégradabilité à long terme ? La dégradabilité des nanoparticules est-elle un gage de sécurité ? Comment identifier les produits de dégradation et leurs effets ? Quel est le lien entre biopersistance, réactivité, dégradation et toxicité ? Est-il plus sûr pour l'organisme de conserver des nanoparticules supposées inertes (NP d'or par exemple) ou bien de gérer des NP réactives, potentiellement dégradables

et prendre en charge leurs sous-produits ? Les réponses sont complexes et dépendent bien sûr des matériaux.

Dans le cas des nanofleurs d'oxyde de fer, nous avons montré qu'un dépôt d'or à leur surface retardait leur désintégration et ce d'autant plus que l'or forme une couche continue (Javed *et al.*, 2014). On peut donc tenter de moduler la stabilité *in vivo* d'architectures nanométriques en associant différents matériaux de

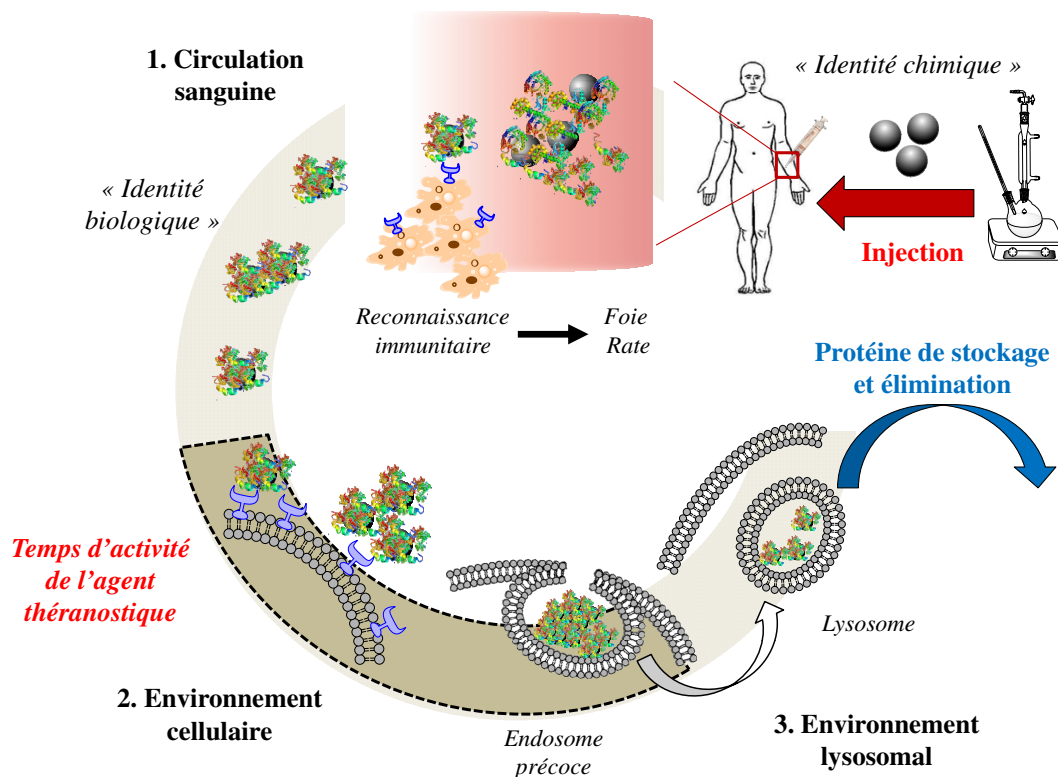


Fig. 8. Schéma illustrant le cheminement de nanoparticules dans l'organisme après leur injection intraveineuse. Pendant une durée limitée qui dépend de leur biodistribution et de leur cycle de vie, les nanoparticules sont utiles pour les applications en diagnostic et thérapie (théranostic).

réactivité variable. Par ailleurs, différentes stratégies sont en train d'émerger pour tirer parti des transformations de nanoparticules dans l'environnement biologique (Park *et al.*, 2010; Perrault & Chan, 2010). Ainsi l'assemblage des nanoparticules sous forme de superstructures par des polymères ou des brins d'ADN peut permettre leur accumulation dans une tumeur pendant le temps du traitement tout en favorisant à plus long terme leur désintégration en particules individuelles de tailles suffisamment faibles pour être éliminées par les reins (Chou *et al.*, 2014).

Parallèlement aux phénomènes de transformations intracellulaires des nanoparticules, nous avons mis en évidence une voie de dissémination des nanomatériaux dans l'organisme. Les cellules ayant internalisé des nanoparticules magnétiques (Luciani *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012), des nanoparticules d'or (Silva *et al.*, 2013) ou encore des nanotubes de carbone (Marangon *et al.*, 2012) peuvent également les rejeter dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de microvésicules qu'elles émettent en situation de stress. Ces microvésicules, qui participent à la communication intercellulaire et sont capables d'acheminer nombre d'effecteurs biologiques (récepteur, enzyme,

miRNA...), pourraient également transporter des nanomatériaux dans les fluides biologiques et les transférer à des cellules naïves à distance. Ce processus de propagation des nanoparticules complique la question du devenir des nanoparticules dans l'organisme, qui peuvent visiter différentes cellules, voire différents types cellulaires avant d'être dégradées, assimilées ou éliminées.

Conclusion

Cet article illustre la notion de cycle de vie des nanoparticules dans l'organisme et les moyens de contrôler ce cycle de vie. Depuis les premières minutes après l'injection jusqu'aux processus d'élimination et de dégradation à long terme, les nanoparticules subissent une variété de transformations orchestrées par les différents environnements biologiques qu'elles rencontrent au cours de leur voyage dans l'organisme (figure 8). Initiées par des interactions avec les protéines plasmatiques, puis par des processus d'internalisation cellulaire et de dégradation dans les lysosomes intracellulaires, les nanoparticules voient

leurs propriétés évoluer au cours du temps. Inversement, le suivi de propriétés physiques caractéristiques, telles que les propriétés magnétiques, apportent des informations sur ces transformations. L'observation à l'échelle nanométrique au sein des tissus est une étape indispensable pour caractériser la distribution subcellulaire, l'évolution morphologique des nanoparticules et leur persistance. Elle suggère des processus non triviaux de dégradation et de recyclage du fer par les protéines endogènes. La mise en évidence de différents paramètres (fonctionnalisation de surface, architecture, forme...) qui affectent le devenir à long terme des nanoparticules permet d'envisager des stratégies d'élaboration pour programmer leur cycle de vie et rendre possible des applications en clinique humaine.

Remerciements. Les auteurs remercient l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) et le CGI (Commissariat à l'Investissement d'Avenir) à travers le Labex SEAM (*Science and Engineering for Advanced Materials and devices*) (ANR 11 LABX 086, ANR 11 IDEX 05 021), le programme Défi Nano du CNRS, la Région Ile de France (convention SESAME E1845 et DIM NanoK) et le projet Européen Magnifyco (Contrat NMP4-SL-2009-228622) and ENCITE (*European Network for Cell Imaging and Tracking Expertise, Grant agreement 201842*). Nous remercions C. Wilhelm, M. Lévy, A. Al Faraj, A. Silva, I. Marangon, D. Elgrabli, M. Devaux, C. Ricolleau, T. Pellegrino, C. Ménager, R. Bazzi, P. Huguounenq, S. Chat, L. Quoc Vuong, Y. Gossuin, A. Luciani, O. Clément, G. Autret, L. Pidial, F. Gendron, Y. Frapart, S. Lajnef et l'entreprise Guerbet.

Références

- Albanese A., Walkey C.D., Olsen J.B., Guo H., Emili A., Chan W.C.W., Secreted Biomolecules Alter the Biological Identity and Cellular Interactions of Nanoparticles. *ACS Nano*, 2014, 8, 5515–5526.
- Arbab A.S., Wilson L.B., Ashari P., Jordan E.K., Lewis B.K., Frank J.A., A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed*, 2005, 18, 383–389.
- Beaumont C., Delaby C., Recycling iron in normal and pathological states. *Semin Hematol*, 2009, 46, 328–338.
- Bertoli F., Davies G.-L., Monopoli M.P., Moloney M., Gun'ko Y.K., Salvati A., Dawson K.A., Magnetic Nanoparticles to Recover Cellular Organelles and Study the Time Resolved Nanoparticle-Cell Interactome throughout Uptake. *Small*, 2014, Apr 16. doi: 10.1002/sml.201303841
- Bourrinet P., Bengel H.H., Bonnemain B., Dencausse A., Idee J.M., Jacobs P.M., Lewis J.M., Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol*, 2006, 41, 313–324.
- Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G.J., Puentes V., Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano*, 2010, 4, 3623–3632.
- Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K.A., Linse S., Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 2050–2055.
- Chaudhury A., Wilhelm C., Chen-Tournoux A., Farahmand P., V.B., Autret G., Larghero J., Desnos T., Hagège A., Gazeau F., Clément O., Menasché P., Can magnetic targeting of magnetically-labeled endothelial progenitor circulating cells optimize intramyocardial cell engraftment? *Cell Transplant*, 2012, 21, 679–691.
- Cheng K., Li T.S., Malliaras K., Davis D.R., Zhang Y., Marban E., Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circ Res*, 2010, 106, 1570–1581.
- Chou L.Y.T., Zagorovsky K., Chan W.C.W., DNA assembly of nanoparticle superstructures for controlled biological delivery and elimination. *Nat Nano*, 2014, 9, 148–155.
- Di Corato R., Espinosa A., Lartigue L., Tharaud M., Chat S., Pellegrino T., Ménager C., Gazeau F., Wilhelm C., Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials*, 2014, 35, 6400–6411.
- Di Corato R., Gazeau F., Le Visage C., Fayol D., Levitz P., Lux F., Letourneur D., Luciani N., Tillement O., Wilhelm C., High-Resolution Cellular MRI: Gadolinium and Iron Oxide Nanoparticles for in-Depth Dual-Cell Imaging of Engineered Tissue Constructs. *ACS Nano*, 2013, 7, 7500–7512.
- Dobrovolskaia M.A., Aggarwal P., Hall J.B., McNeil S.E., Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*, 2008, 5, 487–495.
- Fadeel B., Feliu N., Vogt C., Abdelmonem A.M., Parak W.J., Bridge over troubled waters: understanding the synthetic and biological identities of engineered nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2013, 5, 111–129.
- Fayol D., Luciani N., Lartigue L., Gazeau F., Wilhelm C., Managing Magnetic Nanoparticle Aggregation and Cellular Uptake: a Precondition for Efficient Stem-Cell Differentiation and MRI Tracking. *Adv Healthc Mater*, 2012, 2, 313–325.
- Fayol D., Frasca G., Le Visage C., Gazeau F., Luciani N., Wilhelm C., Use of Magnetic Forces to Promote Stem Cell Aggregation During Differentiation, and Cartilage Tissue Modeling. *Adv Mater*, 2013a, 25, 2611–2616.

- Fayol D., Le Visage C., Ino J., Gazeau F., Letourneur D., Wilhelm C., Design of Biomimetic Vascular Grafts With Magnetic Endothelial Patterning. *Cell Transplant*, 2013b, 22, 2105–2118.
- Hubbs A.F., Mercer R.R., Benkovic S.A., Harkema J., Sriram K., Schwegler-Berry D., Goravanahally M.P., Nurkiewicz T.R., Castranova V., Sargent L.M., Nanotoxicology—A Pathologist's Perspective. *Toxicol Pathol*, 2011, 39, 301–324.
- Javed Y., Lartigue L., Hugounenq P., Vuong Q.L., Gossuin Y., Bazzi R., Wilhelm C., Ricolleau C., Gazeau F., Alloyeau D., Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small*, 2014, May 3. Doi: 10.1002/sml.201400281.
- Kolosnjaj-Tabi J., Wilhelm C., Clément O., Gazeau F., Cell labeling with magnetic nanoparticles: Opportunity for magnetic cell imaging and cell manipulation. *J Nanobiotechnol*, 2013, 11, S7.
- Kolosnjaj-Tabi J., Di Corato R., Lartigue L., Marangon I., Guardia P., Silva A.K.A., Luciani N., Clément O., Flaud P., Singh J.V., Decuzzi P., Pellegrino T., Wilhelm C., Gazeau F., Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle “Destructurators” of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano*, 2014, 8, 4268–4283.
- Lartigue L., Wilhelm C., Servais J., Factor C., Dencausse A., Bacri J.-C., Luciani N., Gazeau F., Nanomagnetic Sensing of Blood Plasma Protein Interactions with Iron Oxide Nanoparticles: Impact on Macrophage Uptake. *ACS Nano*, 2012, 6, 2665–2678.
- Lartigue L., Alloyeau D., Kolosnjaj-Tabi J., Javed Y., Guardia P., Riedinger A., Péchoux C., Pellegrino T., Wilhelm C., Gazeau F., Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano*, 2013, 7, 3939–3952.
- Lévy M., Lagarde F., Maraloiu V.A., Blanchin M.G., Gendron F., Wilhelm C., Gazeau F., Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology*, 2010, 21, 395103.
- Lévy M., Gazeau F., Bacri J.C., Wilhelm C., Devaud M., Modeling magnetic nanoparticle dipole-dipole interactions inside living cells. *Phys Rev B*, 2011a, 84, 075480–070754.
- Lévy M., Luciani N., Alloyeau D., Elgrabli D., Deveaux V., Péchoux C., Chat S., Wang G., Vats N., Gendron F., Factor C., Lotersztajn S., Luciani A., Wilhelm C., Gazeau F., Long term *in vivo* biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 2011b, 32, 3988–3999.
- Lévy M., Wilhelm C., Luciani N., Devaux V., Gendron F., Luciani A., Devaud M., Gazeau F., Nanomagnetism reveals the intracellular clustering of nanoparticles in the organism. *Nanoscale*, 2011c, 3, 4402–4410.
- Lévy M., Wilhelm C., Devaud M., Levitz P., Gazeau F., How cellular processing of superparamagnetic nanoparticles affects their magnetic behavior and NMR relaxivity. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012, 7, 373–383.
- Loeue S., Vincent B.B., Gazeau F., Nanomedicine metaphors: From war to care. Emergence of an ecological approach. *Nano Today*, 2013, 8, 560–565.
- Lowry G.V., Gregory K.B., Apte S.C., Lead J.R., Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ Sci Technol*, 2012, 46, 6893–6899.
- Luciani N., Wilhelm C., Gazeau F., The role of cell-released microvesicles in the intercellular transfer of magnetic nanoparticles in the monocyte/macrophage system. *Biomaterials*, 2010, 31, 7061–7069.
- Lundqvist M., Stigler J., Cedervall T., Berggard T., Flanagan M.B., Lynch I., Elia G., Dawson K., The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*, 2011, 5, 7503–7509.
- Marangon I., Boggetto N., Ménard-Moyon C., Venturelli E., Béoutis M.-L., Péchoux C., Luciani N., Wilhelm C., Bianco A., Gazeau F., Intercellular Carbon Nanotube Translocation Assessed by Flow Cytometry Imaging. *Nano Letters*, 2012, 12, 4830–4837.
- Meddahi-Pellé A., Legrand A., Marcellan A., Louedec L., Letourneur D., Leibler L., Organ Repair, Hemostasis, and *In Vivo* Bonding of Medical Devices by Aqueous Solutions of Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53, 6369–6373.
- Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A., Dawson K.A., Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nano*, 2012, 7, 779–786.
- Park J.-H., von Maltzahn G., Xu M.J., Fogal V., Kotamraju V.R., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J., Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 981–986.
- Perrault S.D., Chan W.C.W., *In vivo* assembly of nanoparticle components to improve targeted cancer imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 11194–11199.
- Rivera-Gil P., De Koker S., De Geest B.G., Parak W.J., Intracellular processing of proteins mediated by biodegradable polyelectrolyte capsules. *Nano Lett*, 2009, 9, 4398–4402.
- Salvati A., Pitek A.S., Monopoli M.P., Prapainop K., Bombelli F.B., Hristov D.R., Kelly P.M., Aberg C., Mahon E. and Dawson K.A., Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nano*, 2013, 8, 137–143.
- Silva A.A., Wilhelm C., Kolosnjaj-Tabi J., Luciani N. and Gazeau F. Cellular Transfer of Magnetic Nanoparticles Via Cell Microvesicles: Impact on Cell Tracking by Magnetic Resonance Imaging. *Pharm Res*, 2012, 29, 1392–1403.
- Silva A.K., Di Corato R., Pellegrino T., Chat S., Pugliese G., Luciani N., Gazeau F., Wilhelm C., Cell-derived

- vesicles as a bioplatfrom for the encapsulation of theranostic nanomaterials. *Nanoscale*, 2013, 5, 11374–11384.
- Smirnov P., Gazeau F., Beloeil J.C., Doan B.T., Wilhelm C., Gillet B., Single-cell detection by gradient echo 9.4 T MRI: a parametric study. *Contrast Media Mol Imaging*, 2006, 1, 165–174.
- Smirnov P., Poirier-Quinot M., Wilhelm C., Lavergne E., Ginefri J.C., Combadière B., Clément O., Darrasse L., Gazeau F., *In vivo* single cell detection of tumor-infiltrating lymphocytes with a clinical 1.5 Tesla MRI system. *Magn Reson Med*, 2008, 60, 1292–1297.
- Szalay B., Tátrai E., Nyíró G., Vezér T., Dura G., Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in *in vivo* and *in vitro* experiments. *J Appl Toxicol*, 2012, 32, 446–453.
- Thomas C.R., George S., Horst A.M., Ji Z., Miller R.J., Peralta-Videa J.R., Xia T., Pokhrel S., Mädler L., Gardea-Torresdey J.L., Holden P.A., Keller A.A., Lenihan H.S., Nel A.E., Zink J.I., Nanomaterials in the Environment: From Materials to High-Throughput Screening to Organisms. *ACS Nano*, 2011, 5, 13–20.
- Wilhelm C., Gazeau F., Nanoparticules magnétiques au cœur des cellules : des outils pour les thérapies cellulaires. *Biologie Aujourd'hui*, 2012, 206, 273–284.
- Wilhelm C., Gazeau F., Roger J., Pons J.N., Bacri J.C., Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir*, 2002, 18, 8148–8155.