

Le Graphène et le Système Immunitaire

Une romance à plusieurs dimensions

Auteurs

Sourav Pr. Mukherjee. Nanosafety and Nanomedicine Laboratory, Division of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Massimo Bottini. Department of Experimental Medicine and Surgery, University of Rome 'Tor Vergata', Rome, Italie.

Bengt Fadeel. Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, Californie. USA.

Résumé

Les matériaux à base de graphène apparaissent comme des matériaux attrayants pour les applications biomédicales. Comprendre comment ces matériaux sont perçus par le système immunitaire et interagissent avec lui est d'une importance fondamentale. La phagocytose est un mécanisme majeur déployé par le système immunitaire pour éliminer les agents pathogènes, les particules et les débris cellulaires. Nous présentons ici des études récentes sur les interactions des matériaux à base de graphène avec différentes cellules phagocytaires, notamment les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Nous discutons de l'importance d'évaluer la contamination des GBM par l'endotoxine, qui peut fausser les résultats. Nous explorons également le rôle de la bio-corona dans les interactions des matériaux à base de graphène avec les cellules immunitaires. Enfin, nous soulignons les preuves récentes d'interactions directes entre les matériaux à base de graphène et la membrane plasmique.

O brave new worlds, that have such people in them !

Edwin A. Abbott, Flatland. A Romance of Many Dimensions (1884).

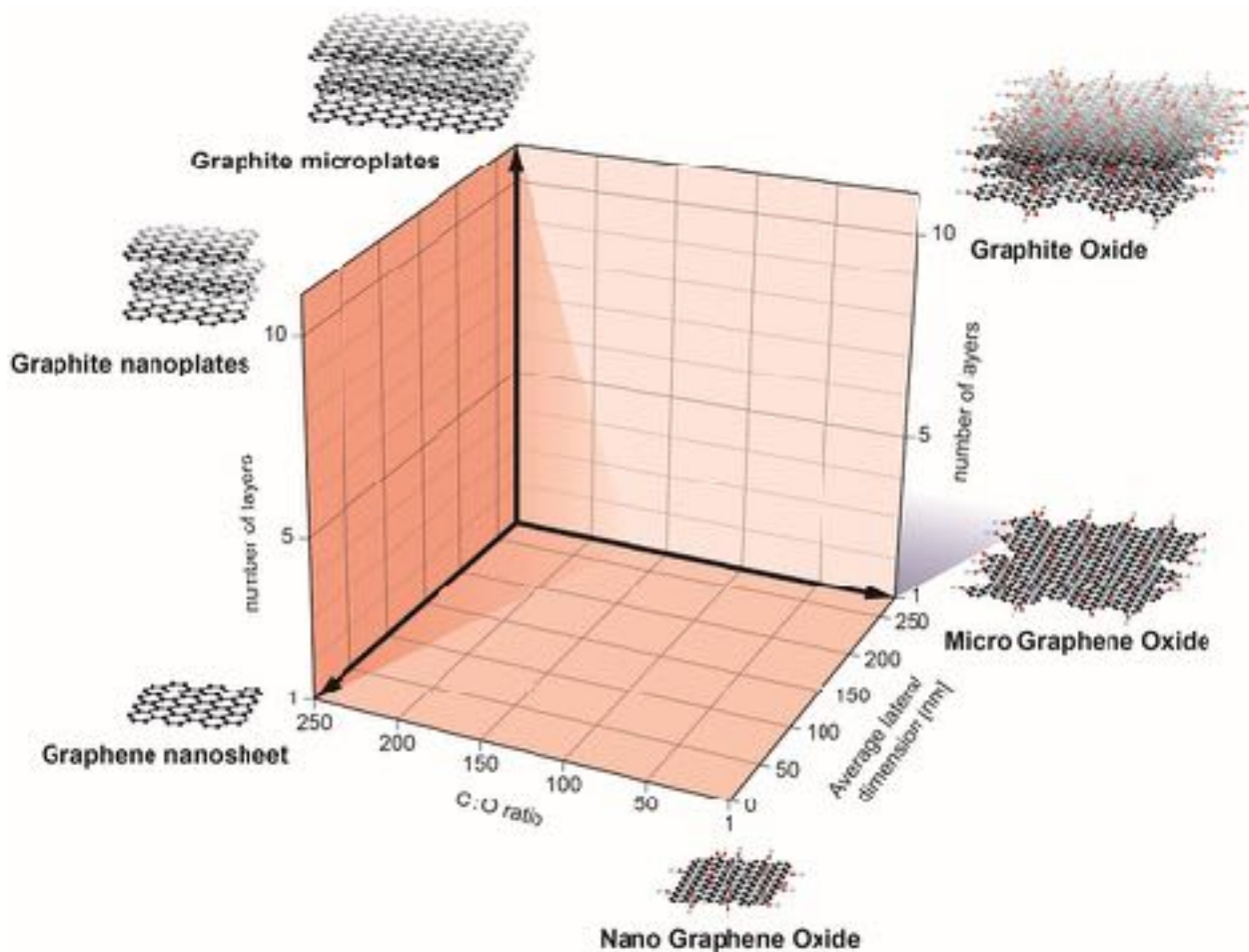
Introduction

Le graphène et ses dérivés ont attiré une attention considérable pour diverses applications en science et technologie (1, 2). L'oxyde de graphène, en particulier, fait l'objet de recherches intensives pour diverses applications biomédicales, notamment l'administration de médicaments et la bioimagerie, et comme biocapteurs (3). L'oxyde de graphène présente des propriétés physicochimiques intéressantes, notamment une grande surface, une facilité de fonctionnalisation de la surface et une stabilité colloïdale supérieure en milieu aqueux (4). Cependant, l'augmentation de la production et de l'utilisation de matériaux à base de graphène nécessite également un examen minutieux de l'impact de ces matériaux sur les cellules et les tissus (5). La compréhension des interactions avec le système immunitaire revêt une importance particulière (6). Une fois à l'intérieur du corps, un matériau étranger rencontrera des cellules phagocytaires du système immunitaire inné, comme les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules représentent la première ligne de défense contre les intrusions étrangères (micro-organismes, particules), et elles éliminent également les débris cellulaires, jouant ainsi un rôle important dans l'homéostasie des tissus. Les macrophages sont impliqués dans l'initiation, la propagation et la résolution de l'inflammation (7), tandis que les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui font le lien entre les branches innées et adaptatives du système immunitaire. Les neutrophiles sont spécialisés dans la destruction des bactéries et d'autres micro-organismes, bien que des études récentes aient suggéré que ces cellules peuvent également orchestrer des réponses immunitaires adaptatives (8). Il est important de noter que les macrophages qui résident dans différents tissus ne sont pas seulement des effecteurs importants de la réponse immunitaire innée, mais qu'ils peuvent également contribuer aux lésions tissulaires aiguës ou chroniques résultant de l'exposition à des substances toxiques par la libération d'une multitude de médiateurs solubles, par exemple des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote, des enzymes protéolytiques et des cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires (9). Ainsi, comme l'ont déjà souligné Laskin et al. (9), les macrophages sont des médiateurs à la fois de "défense et de destruction".

Récemment, un système de classification (Figure 1) a été proposé par les chercheurs du projet phare GRAPHENE, financé par l'UE, comme point de départ pour la catégorisation des différents types de graphène (10). En bref, trois propriétés physico-chimiques des matériaux à base de graphène ont été mises en évidence : (i) le nombre de couches de graphène, (ii) les dimensions latérales moyennes, et (iii) le rapport atomique carbone/oxygène (C/O) ; l'inclusion du rapport C/O comme propriété

fonctionnelle peut être justifiée par le fait que les matériaux à base de graphène sont à la fois structurellement et chimiquement hétérogènes. En effet, comme indiqué par Wick et al. (10), les différents membres de la famille des matériaux à base de graphène ne partagent pas la même surface “standard”. La surface du graphène vierge est hydrophobe alors que dans le cas de l’oxyde de graphène, les surfaces sont constituées d’îlots hydrophobes entrecoupés de régions hydrophiles. Cela pourrait potentiellement influencer les interactions de ces matériaux avec les systèmes biologiques. Nous présentons ici des études récentes sur l'interaction des matériaux à base de graphène avec les cellules du système immunitaire inné, notamment les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Notamment, alors que ces cellules partagent toutes une propension à la phagocytose, nous explorons également les preuves émergentes que les matériaux à base de graphène peuvent exercer des effets directs sur la membrane plasmique des cellules immunitaires en l'absence d'absorption cellulaire. La biodégradation des matériaux à base de carbone par les cellules immunitaires, notamment les neutrophiles et les macrophages, a été mise en évidence dans d'autres articles de synthèse récents (3, 11, 12) et n'est pas abordée ici. Nous concentrerons principalement notre discussion sur les études utilisant des macrophages ou des lignées cellulaires semblables aux macrophages, car il existe peu d'études à ce jour sur les effets des matériaux à base de graphène sur les neutrophiles et les cellules dendritiques. Néanmoins, comme de plus en plus d'études voient le jour, nous commencerons peut-être à comprendre comment le système immunitaire réagit aux objets en 2D - un voyage dans le plat pays.

FIGURE 1. Ci-dessous. Classification des matériaux à base de graphène. Dans le cadre du projet phare GRAPHENE financé par la Commission européenne, trois descripteurs physico-chimiques ont été définis pour permettre la classification des matériaux à base de graphène : le nombre de couches de graphène, la dimension latérale moyenne et le rapport atomique carbone/oxygène. Le cadre de classification proposé aidera à déterminer le rôle des propriétés physicochimiques spécifiques sur le profil de santé et de sécurité des matériaux à base de graphène. Reproduit de : Wick et al. (10) avec la permission de John Wiley & Sons, Inc.



L'importance de l'évaluation des endotoxines

Les endotoxines, également connues sous le nom de lipopolysaccharides, sont de grosses molécules (200 à 1 000 kDa), hydrophobes et thermostables, qui font partie de la membrane externe des bactéries gram négatives (13). Les lipopolysaccharides sont un puissant médiateur inflammatoire qui active les cellules immunitaires par l'intermédiaire de récepteurs de reconnaissance des formes, ce qui entraîne la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, par exemple le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α et l'interleukine (IL)-1 β (14). Étant donné que de nombreux supports médicamenteux ou dispositifs de diagnostic basés sur des nanomatériaux sont conçus pour cibler le système immunitaire (ou pour éviter les interactions avec celui-ci), il est de plus en plus important de comprendre la réponse immunitaire à ces matériaux (15,

16). Dans ce contexte, il est particulièrement important de savoir que les nanobiomatériaux et les produits pharmaceutiques sont couramment contaminés par des endotoxines qui peuvent entraîner un choc septique et une défaillance des organes s'ils sont administrés aux patients (17). La détection des endotoxines dans les produits pharmaceutiques est effectuée à l'aide de deux méthodes différentes. Le test pyrogène du lapin permet de détecter les pyrogènes en général par la mesure du développement de la fièvre après l'injection de l'échantillon testé ; il est coûteux et nécessite l'utilisation d'un grand nombre d'animaux (18). Le deuxième type de méthode de détection des endotoxines, le test au lysat d'améboocytes de *Limulus* (LAL), est basé sur le sang de populations sauvages de limules. Alors que le test pyrogène du lapin ne peut détecter qu'indirectement la présence d'endotoxines, le test LAL est plus spécifique aux endotoxines car il tire parti de la protéase à sérine sensible aux LPS, le facteur C. Une fois activé, le facteur C induit une cascade de coagulation conduisant à l'amplification du stimulus lipopolysaccharides et à la formation d'un caillot de gel ferme. Tous les tests LAL sont en principe basés sur cette cascade de coagulation, mais ils ont été encore modifiés pour permettre la détermination quantitative des endotoxines (18). Ces deux tests ont une longue histoire d'utilisation pour les produits pharmaceutiques et les dispositifs médicaux traditionnels et sont couramment utilisés dans le développement de médicaments. Plus récemment, le test du facteur C recombinant (rFC) et le test d'activation des macrophages ont été reconnus comme des alternatives au test LAL.

Le test d'activation des macrophages, qui imite la réaction fébrile humaine, a été établi comme un test alternatif pour les tests pyrogènes (19). Il est important de noter que la directive européenne 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques impose le remplacement des tests sur animaux lorsqu'il existe des alternatives validées. Bien que le test LAL soit connu pour être très sensible, plusieurs laboratoires ont signalé des problèmes d'interférence de divers types de nanomatériaux avec un ou plusieurs des formats de test LAL (20-22). En effet, il a été démontré que les nanomatériaux à base de carbone, y compris les matériaux à base de graphène, interfèrent avec le test LAL, ce qui peut conduire à des résultats erronés ou masquer les effets des matériaux eux-mêmes (23, 24). Dans une étude récente, les auteurs ont suggéré que des cycles répétés d'autoclavage peuvent réduire la teneur en endotoxines des nanomatériaux à base de carbone, y compris le graphène vierge, et que les matériaux natifs par rapport aux matériaux dépyrogénés provoquent des réponses distinctes des macrophages *in vitro* (25). Cependant, le test chromogène LAL a été utilisé pour évaluer la contamination par les endotoxines, ce qui remet en question le fonctionnement de la procédure de dépyrogénéation proposée (25). Les

cellules rapporteuses TLR4 ont été suggérées comme un test alternatif pour évaluer la contamination par l'endotoxine des nanoparticules de métal/oxyde métallique (21). Cependant, des travaux récents ont impliqué que l'oxyde de graphène pourrait déclencher la mort cellulaire dans les macrophages via TLR4 (discuté ci-dessous), ce qui signifie que l'utilisation de telles cellules rapporteuses pourrait également donner des résultats ambigus. Mukherjee et al. (23) ont mis au point un nouveau test de détection des endotoxines pour contourner les problèmes d'interférences des matériaux à base de graphène. Ce test, appelé test d'expression du TNF- α (TET), est basé sur la détection de la sécrétion de TNF- α dans des macrophages primaires humains dérivés de monocytes, incubés en présence ou en l'absence d'un inhibiteur d'endotoxine spécifique. Il a été démontré que lorsque des doses non cytotoxiques de matériaux à base de graphène étaient appliquées, le TET permettait une détection non équivoque du LPS avec une sensibilité comparable à celle du test LAL. Des directives pour la préparation d'oxyde de graphène sans endotoxine ont également été présentées (23).

Formation Bio-Corona : Un abri contre la tempête

Lorsqu'un nanomatériau est introduit dans un système vivant, il interagit avec des molécules biologiques (protéines, lipides, etc.), ce qui entraîne la formation d'un "bio-corona" à la surface (26), ou, en termes immunologiques, le nanomatériau est opsonisé (processus par lequel les agents pathogènes ou les cellules sont rendus plus sensibles à la phagocytose). Des études détaillées de différents types de nanoparticules ont montré que la formation de bio-corona ne dépend pas seulement de la taille ou de la courbure de la surface de la particule, mais aussi des propriétés de surface telles que le degré d'hydrophobie (27-29). Il a été démontré que la bio-couronne modulait l'absorption cellulaire des nanomatériaux (30), et une étude récente a suggéré que les protéines présentes dans la couronne protéique d'origine sont retenues sur les nanoparticules jusqu'à ce qu'elles atteignent les lysosomes (31). De plus, l'adsorption des protéines peut atténuer les effets cytotoxiques des nanomatériaux. En effet, des études *in vitro* ont montré que l'adsorption de protéines sériques réduit la cytotoxicité des nanotubes de carbone. (32) ainsi que de l'oxyde de graphène (33), et sur la base d'une combinaison d'approches expérimentales et théoriques, il a été suggéré que la bio-corona atténue la cytotoxicité de l'oxyde de graphène en limitant sa pénétration dans la membrane cellulaire (34). En outre, des études de modélisation ont suggéré que le graphène, en raison de sa nature hydrophobe, peut interrompre les interactions hydrophobes protéine-protéine (35). En effet, il est important de reconnaître les

différences de propriétés physicochimiques entre les différents membres de la famille des GBM, notamment en ce qui concerne l'interaction potentielle avec les protéines. Le graphène est essentiellement une feuille unique atomiquement mince d'atomes de carbone liés sp^2 , alors que l'oxyde de graphène est une feuille de graphène oxydée, dérivée par des groupes carbonyle et carboxyle sur les bords et présentant des groupes époxyde et hydroxyle sur le plan basal (36). De plus, le graphène et l'oxyde de graphène ont des énergies de surface différentes - un paramètre important affectant la dispersibilité. Ainsi, le graphène est hydrophobe et dispersable dans les solvants organiques alors que l'oxyde de graphène peut être dispersé dans l'eau (37). Cette dernière propriété provient principalement des groupes carboxyle ionisables du bord, le plan basal étant essentiellement un réseau d'îlots hydrophobes de cycles benzéniques non oxydés entourés de groupes polaires (38). De plus, les petits feuillets de l'oxyde de graphène sont plus hydrophiles que les plus grands en raison d'une plus grande densité de charge, ce qui pourrait avoir un impact sur les bio-interactions.

Les nanomatériaux injectés par voie intraveineuse peuvent adsorber une large gamme de protéines dans le sang (39). La bio-corona des protéines sanguines se forme rapidement, et il a été démontré qu'elle affecte l'hémolyse et l'activation des thrombocytes (40). En outre, l'activation du complément à la surface des nanomatériaux est particulièrement préoccupante lorsqu'il s'agit d'applications cliniques. En effet, des protéines du complément ont été systématiquement identifiées dans ou sur les coronas des nanoparticules (28, 30, 40, 41). Le système du complément est un composant critique de l'immunité innée dans le sang ; il s'agit d'une cascade protéolytique généralement déclenchée par trois voies distinctes (classique, lectine et alternative) qui convergent pour générer le même ensemble de molécules effectrices au niveau du troisième composant du complément (C3) (42). Les protéines du complément opsonisent les agents pathogènes et les cellules pour les englober par l'intermédiaire des récepteurs du complément et pourraient, en théorie, favoriser également l'absorption des nanomatériaux. Cependant, certains facteurs du complément peuvent au contraire conférer des propriétés "furtives" aux nanomatériaux en empêchant toute autre activation du complément, comme le montre une étude récente sur l'oxyde de graphène. (43). L'activation du complément libère également deux molécules effectrices puissantes (C3a et C5a) qui jouent un rôle important dans le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires ainsi que dans l'anaphylaxie, une réaction allergique grave qui se déclenche rapidement et peut entraîner la mort (44). Plusieurs rapports ont documenté l'activation du complément par différents types de nanomatériaux, y compris les nanomatériaux à base de carbone tels que les nanotubes de carbone (45, 46) et l'oxyde de graphène (47, 48). La question est la suivante : les

surfaces des particules peuvent-elles être modifiées pour éviter l'adsorption de protéines et/ou l'activation imprévue du complément ? La fixation de polymères tels que le poly(éthylène glycol) (PEG) sur les surfaces des particules est une approche courante en nanomédecine, et l'opinion traditionnelle veut que la PEGylation empêche complètement l'adsorption des protéines, empêchant ainsi la clairance des particules par le système réticulo-endothélial. Cependant, si cela était vrai, comment expliquer l'activation du complément sur les particules PEGylées ? Ces dernières années, l'opinion a émergé que la PEGylation des nanomatériaux ne bloque que partiellement l'adsorption des protéines et peut même favoriser la formation d'une bio-couronne distincte par rapport à la couronne formée sur les nanomatériaux vierges (49, 50). En effet, dans une étude récente utilisant des cellules RAW264.7 semblables à des macrophages, il a été démontré que l'adsorption de protéines spécifiques était nécessaire pour empêcher l'absorption de particules de polystyrène recouvertes de PEG ou de poly(éthylène phosphate) (PEEP) (51).

Le choix du revêtement polymère est important. Luo et ses collaborateurs (52) ont signalé que l'enrobage de PEG empêchait l'absorption de l'oxyde de graphène par les macrophages péritonéaux murins, tandis que l'enrobage de poly(éther imide) (PEI) cationique favorisait l'absorption à faible dose, mais compromettait la viabilité cellulaire à forte dose. Dans une autre étude récente, les auteurs ont prouvé que l'oxyde de graphène PEGylé d'une taille latérale d'environ 200 nm induisait des réponses immunitaires (libération de cytokines) dans les macrophages péritonéaux murins ; il est intéressant de noter que des niveaux d'activation comparables ont également été observés après la PEGylation d'un matériau 2D non carboné, le disulfure de molybdène (MoS₂) (53). Les auteurs ont émis l'hypothèse que la signalisation des intégrines pourrait expliquer l'augmentation des réponses cytokines dans les cellules exposées au PEG-oxyde de graphène. Dans l'ensemble, l'étude suggère que la PEGylation ne sert pas à passiver les surfaces des matériaux 2D. Xu et al. (54) ont préparé une série de dérivés de l'oxyde de graphène, notamment de l'oxyde de graphène aminé (GO-NH₂), de l'oxyde de graphène fonctionnalisé par du poly(acrylamide) (GO-PAM), de l'oxyde de graphène fonctionnalisé par de l'acide poly(acrylique) (GO-PAA) et de l'oxyde de graphène fonctionnalisé par du PEG (GO-PEG), et ont comparé leur toxicité avec celle de l'oxyde de graphène vierge. Les matériaux oxyde de graphène présentaient tous des dimensions latérales comprises entre 100 et 500 nm et le potentiel ζ était négatif pour tous les matériaux dans le milieu de culture cellulaire en raison de l'adsorption des protéines. Parmi ces dérivés d'oxyde de graphène, GO-PEG et GO-PAA ont induit moins de toxicité envers les cellules macrophages murines J774A.1 que l'oxyde de graphène vierge, et GO-PAA s'est avéré

être le plus biocompatible, à la fois in vitro et chez la souris (54). Il a été suggéré que les différences de biocompatibilité étaient dues à des différences de composition de la bio-corona, en particulier la présence ou non d'immunoglobuline G (IgG) ; GO-PAA et GO-PEG avaient une teneur en IgG inférieure dans leurs coronas protéiques (30-40%) que l'oxyde de graphène, GO-NH₂ et GO-PAM (50-70%). L'IgG est une opsonine bien connue qui joue un rôle clé dans l'élimination des agents pathogènes. Cette étude indique des stratégies pour une conception sûre de l'oxyde de graphène pour des applications biomédicales et souligne l'importance de la bio-corona (54).

Effets sur les macrophages : Effraction et pénétration

Les macrophages (“gros mangeurs”) sont des phagocytes professionnels issus de la moelle osseuse ; ces cellules sont appelées monocytes lorsqu'elles sont présentes dans la circulation périphérique et “macrophages” lorsqu'elles résident dans les tissus. La phagocytose des agents pathogènes par les macrophages est facilitée par l'opsonisation par les immunoglobulines et les composants du système du complément, mais l'engloutissement peut aussi être non spécifique. Nous avons constaté que les macrophages primaires humains dérivés de monocytes engloutissaient efficacement l'oxyde de graphène sans signes de mort cellulaire aiguë (24 h) (Figure 2). L'oxyde de graphène a été trouvé dans des vésicules fermées par une membrane dans le cytoplasme, ce qui suggère une absorption par endocytose. D'autres études récentes utilisant des cellules THP.1 semblables à des macrophages ont suggéré que la phagocytose influence dans une certaine mesure le degré de cytotoxicité d'oxyde de graphène (55). Cependant, alors que l'inhibition de la phagocytose a atténué la cytotoxicité d'oxyde de graphène monocouche, les effets d'oxyde de graphène multicouche se sont avérés similaires, qu'il y ait ou non phagocytose. En outre, d'autres études récentes ont signalé que les feuilles d'oxyde de graphène ayant de grandes dimensions latérales pouvaient s'aligner avec la membrane plasmique des macrophages (effet dit de “masquage”) et l'hypothèse a été émise que cette disposition parallèle des feuilles d'oxyde de graphène à la surface des cellules pouvait soit favoriser leur internalisation, soit isoler les cellules de leur environnement, compromettant ainsi la viabilité et/ou la fonction des cellules (56). De même, Ma et al. (57) ont rapporté que les grandes feuilles d'oxyde de graphène présentaient une “adsorption” plus forte sur la membrane plasmique des cellules J774.A1 de type macrophage murin, avec une phagocytose moindre, tandis que les petites feuilles d'oxyde de graphène étaient plus facilement absorbées par les cellules.

Les auteurs ont également constaté que les grandes feuilles d'oxyde de graphène favorisaient une polarisation pro-inflammatoire des macrophages, tant *in vitro* qu'*in vivo*. En revanche, d'autres chercheurs ont signalé que les petites feuilles d'oxyde de graphène provoquaient des effets plus profonds sur les cellules immunitaires humaines (monocytes) par rapport aux grandes feuilles d'oxyde de graphène(58). Li et al. (59) ont suggéré, sur la base d'études expérimentales et théoriques, que les feuilles de graphène de taille micrométrique pénètrent dans les cellules en perçant ou en tranchant la membrane (absorption "edge-first"). En fait, plusieurs études menées ces dernières années sur différents modèles cellulaires ont suggéré que l'oxyde de graphène pouvait exercer des effets directs sur la membrane plasmique des cellules, avec ou sans mort cellulaire. Par exemple, on a constaté que des feuilles d'oxyde de graphène de taille micrométrique induisaient la formation de vacuoles dans le compartiment cytosolique des cellules, entraînant une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire aux petites molécules ; cette vacuolisation n'a été observée que dans les cellules qui surexprimaient le canal de l'eau, l'aquaporine (AQP1) (60). Il a également été démontré que l'oxyde de graphène compromettait la fonction de la membrane plasmique et du cytosquelette dans diverses lignées cellulaires sans signes significatifs de mort cellulaire, et des interactions avec les intégrines de la membrane cellulaire ont été impliquées dans ce processus (61). Les auteurs ont proposé que ce phénomène puisse être exploité pour sensibiliser les cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques, mais il n'a pas été démontré que ces effets étaient spécifiques aux cellules cancéreuses. En outre, on a constaté que le graphène monocouche produisait des trous (pores) dans les membranes des cellules de carcinome pulmonaire A549 et des cellules RAW264.7 semblables à des macrophages, entraînant une perte substantielle de viabilité cellulaire (62). La formation des pores s'est produite même en présence de sérum, et des simulations de dynamique moléculaire ont suggéré que la formation des pores dépendait de l'extraction des lipides. En effet, des études expérimentales et théoriques précédentes ont suggéré que le comportement antibactérien du graphène provient de la formation de pores dans la paroi cellulaire bactérienne (63), peut-être en raison de l'extraction des lipides des membranes bactériennes (64). Enfin, dans une autre étude récente, il a été démontré que des feuilles d'oxyde de graphène de taille nanométrique induisaient un remaniement de la membrane dans une variété de lignées cellulaires différentes avec l'excrétion concomitante de fragments de membrane (65). Le mécanisme sous-jacent n'a pas été révélé, bien que l'on sache que les modifications des niveaux de Ca^{2+} dans la cellule régulent la formation de ces protubérances membranaires induites par l'actine. Ainsi, il semble que matériaux à base de graphène soient capables d'interagir avec les cellules de différentes manières, notamment en les masquant, en les perçant, en les ébouriffant

ou en les décollant, en formant des pores (éventuellement par extraction des lipides membranaires) et/ou en les internalisant dans les cellules. Comment donner un sens à des observations aussi disparates ? Tout d'abord, il pourrait y avoir des différences importantes dans le matériau d'essai lui-même, notamment l'épaisseur et les dimensions latérales (et, bien sûr, la dose de matériau ajoutée aux cultures cellulaires). De plus, des différences dans les conditions de culture cellulaire (y compris le fait que le milieu de culture cellulaire soit complété ou non par du sérum) peuvent entrer en jeu. En effet, il a été noté que la composition du milieu de culture cellulaire lui-même pouvait affecter de manière critique la façon dont l'oxyde de graphène (et d'autres nanomatériaux) interagit avec les cellules (66). Enfin, le fait que différents modèles cellulaires soient utilisés peut expliquer les différences frappantes dans les résultats cellulaires des études rapportées ici. Ainsi, il est important de comprendre que les lignées cellulaires transformées ne sont qu'un modèle de cellules normales, et que les lignées cellulaires dites "macrophages" ne récapitulent pas complètement le comportement des macrophages primaires (67). Il est également important de réaliser qu'il existe de nombreuses populations de macrophages différentes et que le phénotype ou l'état d'activation des macrophages peut affecter la façon dont ces cellules répondent aux nanomatériaux, comme nous et d'autres l'avons récemment montré (68, 69). Néanmoins, il semble que l'oxyde de graphène puisse avoir des effets directs sur la membrane cellulaire et des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre ces interactions. Cela est évidemment important si les GBM doivent être utilisés comme des transporteurs "intelligents" d'une charge thérapeutique vers des populations cellulaires spécifiques de l'organisme.

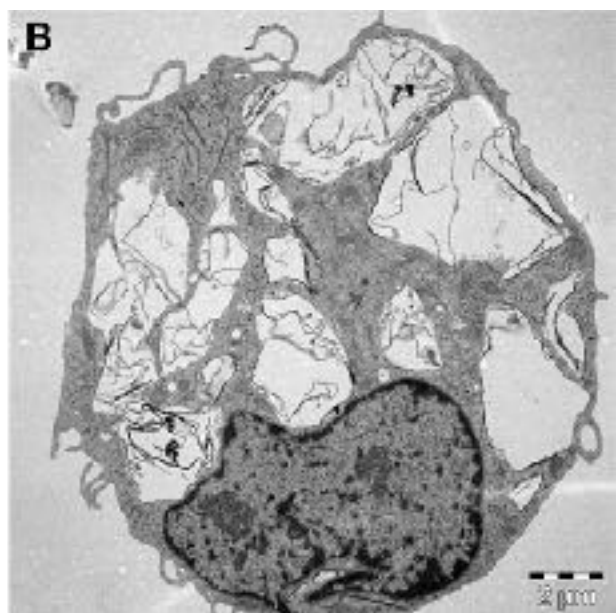
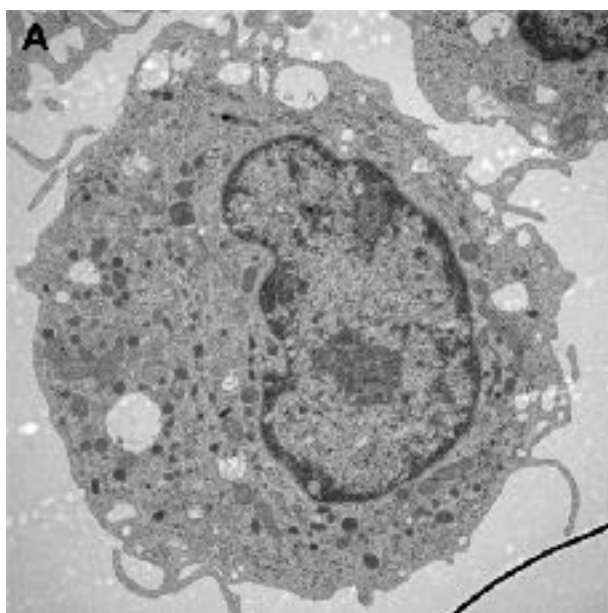


FIGURE 2. Les macrophages sont des cellules phagocytaires professionnelles capables d'ingérer de l'oxyde de graphène de taille micrométrique. Ces images TEM montrent des macrophages primaires humains dérivés de monocytes, cultivés pendant 24 heures dans un milieu cellulaire seul (A) ou avec 10 µg/mL d'oxyde de graphène (B). Les cellules ont facilement internalisé l'oxyde de graphène (présent dans des vésicules cytoplasmiques) sans signes ultrastructuraux de mort cellulaire. Les cellules ont été maintenues dans un milieu RPMI-1640 complété par 10% de sérum fœtal bovin. TEM : Kjell Hultenby, service central de microscopie électronique, Karolinska Institutet.

Effets sur les macrophages : Activation des inflammasomes

Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques qui activent la caspase-1, ce qui entraîne la maturation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (70). L'activation des inflammasomes est importante pour la défense de l'hôte et la clairance des pathogènes. De plus, l'activation de l'inflammasome est impliquée dans le développement de diverses maladies inflammatoires chroniques, et l'inflammasome NLRP3 est activé par des signaux de "danger" endogènes tels que l'urate monosodique, l'agent causal de la goutte (71), et par les cristaux de cholestérol présents dans les lésions athérosclérotiques (72). De plus, un ensemble émergent de publications montre que les nanomatériaux à base de carbone, y compris les nanotubes de carbone à multiparois longs et fibreux (73, 74) ainsi que les nano-oignons de carbone sphériques de petite taille (75) et les sphères de carbone creuses (76), sont capables d'activer le complexe inflammasome dans les cellules phagocytaires (macrophages) avec la sécrétion ultérieure d'IL-1 β . Il a été récemment démontré que l'oxyde de graphène déclenche la production d'IL-1 β dans les cellules myéloïdes (THP. 1) et épithéliales (BEAS-2B), respectivement (77). Nous avons constaté que le GO de dimensions latérales variables déclenchait l'inflammasome dans des macrophages primaires humains dérivés de monocytes et nous avons noté que l'absorption cellulaire de l'oxyde de graphène était nécessaire à la production d'IL-1 β (Mukherjee et al., observations non publiées). De même, Cho et al. (55) ont signalé que l'inhibition de la phagocytose abolissait la sécrétion d'IL-1 β dans les cellules THP.1 exposées à de l'oxyde de graphène monocouche, mais pas dans les cellules exposées à de l'oxyde de graphène multicouche. Dans l'ensemble, une série de nanomatériaux à base de carbone, y compris non seulement des matériaux en forme de fibres, mais aussi des particules sphériques et des matériaux plats comme l'oxyde de graphène, déclenchent l'activation de l'inflammasome. Il va sans dire qu'il est important d'exclure toute

contamination du matériau testé par l'endotoxine lors de la réalisation de telles expériences, car le LPS est connu pour agir comme un co-signal pour l'activation de l'inflammasome (78). En effet, l'endotoxine est souvent utilisée pour stimuler les cellules in vitro lors de l'évaluation de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (73), ce qui est certainement pertinent dans le contexte d'un défi microbien. Cependant, il est pertinent de se demander comment l'inflammasome est activé lors d'une inflammation induite par un milieu stérile (nanomatériau). Dans une publication récente, Jessop et al. (79) ont fourni des preuves du rôle de la boîte 1 du groupe à haute mobilité (HMGB1) dans l'activation de l'inflammasome induite par les nano-tubes de carbone à multiparois in vitro et in vivo. Les cristaux de cholestérol sont connus pour agir comme des signaux de "danger" et une étude récente a démontré que les cristaux de cholestérol déclenchaient la libération par les neutrophiles de pièges extracellulaires pour neutrophiles (NET) (voir ci-dessous) qui, à leur tour, amorçaient les macrophages pour la libération de cytokines (80). Cette découverte suggère qu'un signal de "danger" peut entraîner une inflammation stérile par son interaction avec les neutrophiles. D'autres études devraient déterminer si la libération de HMGB1 ou d'autres signaux de "danger" joue un rôle dans l'activation de l'inflammasome induite par l'oxyde de graphène.

Les récepteurs Toll-like (TLR) sont des récepteurs de reconnaissance de motifs qui reconnaissent des molécules structurellement conservées exprimées par des microbes, ce qui entraîne l'activation de réponses immunitaires (81). Il a été suggéré que le TLR4, le récepteur de reconnaissance de motifs pour le LPS (endotoxine), reconnaît une multitude d'autres facteurs endogènes, allant des protéines aux ions métalliques. Cependant, l'activation directe d'un seul récepteur par un tel éventail de signaux moléculaires est difficile à expliquer d'un point de vue structural, et il faut prendre soin d'exclure une éventuelle contamination par l'endotoxine (82). D'autre part, il a été suggéré que les TLRs pourraient détecter la présence de taches hydrophobes sur une variété de molécules, ce qui pourrait expliquer la promiscuité apparente de cette classe de récepteurs de reconnaissance des formes (83). Il est intéressant de noter que Qu et al. (84) ont rapporté que l'oxyde de graphène d'une taille d'environ 1-2 μm induisait une mort cellulaire dépendante de TLR4 dans des macrophages de souris dérivés de la moelle osseuse et ont présenté des preuves que cela se produisait, au moins en partie, par un mécanisme paracrine dépendant du TNF α . Dans des travaux antérieurs, Chen et al. (85) ont montré que l'oxyde de graphène induisait l'autophagie et la sécrétion de cytokines de manière TLR-dépendante dans la lignée cellulaire de macrophages de souris RAW264.7. En revanche, nos études récentes ont suggéré que l'oxyde de graphène déclenche l'activation de l'inflammasome avec la sécrétion

d'IL-1 β dans les macrophages primaires humains dérivés de monocytes sans engager la voie de signalisation TLR (Mukherjee et al., résultats non publiés). Notamment, aucune mort cellulaire n'a été observée dans les macrophages exposés à l'oxyde de graphène, ce qui contraste fortement avec les études susmentionnées. Des précautions ont été prises pour contrôler la contamination par l'endotoxine avant l'exposition des cellules. Nous suggérons que les tests d'endotoxine devraient être obligatoires lors de l'étude des interactions putatives de l'oxyde de graphène avec les TLR.

Dans la plupart des exemples présentés ici, l'impact de l'oxyde de graphène sur des macrophages isolés ou des cellules semblables à des macrophages a été étudié. Bien que ces études puissent fournir des informations importantes sur le mode d'entrée de l'oxyde de graphène dans les cellules et sur les voies de signalisation affectées à la suite d'interactions cellulaires, des études sur des organismes vivants sont nécessaires pour évaluer la réponse globale à l'oxyde de graphène et l'interaction entre les deux branches du système immunitaire. Shurin et al. (86) ont récemment fourni une analyse détaillée de la façon dont l'exposition à l'oxyde de graphène module la réponse allergique pulmonaire. À cette fin, les auteurs ont utilisé un modèle murin d'asthme induit par l'ovalbumine et ont constaté que l'oxyde de graphène, administré au stade de la sensibilisation, augmentait l'hyperréactivité des voies aériennes (AHR) et le remodelage des voies aériennes, alors qu'en même temps, les niveaux des cytokines Th2, IL-4, IL-5 et IL-13 étaient supprimés dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (BAL) des souris exposées (86). De plus, l'exposition à l'oxyde de graphène pendant la sensibilisation à l'ovalbumine a diminué l'accumulation d'éosinophiles et augmenté le recrutement de macrophages dans le liquide de LBA. L'exposition à l'oxyde de graphène a également augmenté la production par les macrophages des chitinases de mammifères, de la chitinase 3-like 1 et de l'AMCase, dont l'expression est associée à l'asthme (87), et la modélisation moléculaire a suggéré que l'oxyde de graphène pourrait interagir directement avec les chitinases, affectant leur activité (Figure 3). L'ensemble de ces résultats indique que l'exposition pulmonaire à l'oxyde de graphène déclenche un nouveau mécanisme de remodelage des voies respiratoires et de procréation assistée induit par les nanomatériaux dans un modèle murin d'asthme, indépendant de l'inflammation éosinophile des voies respiratoires et des réponses immunitaires à médiation Th2, avec l'implication possible de chitinases mammaliennes (86).

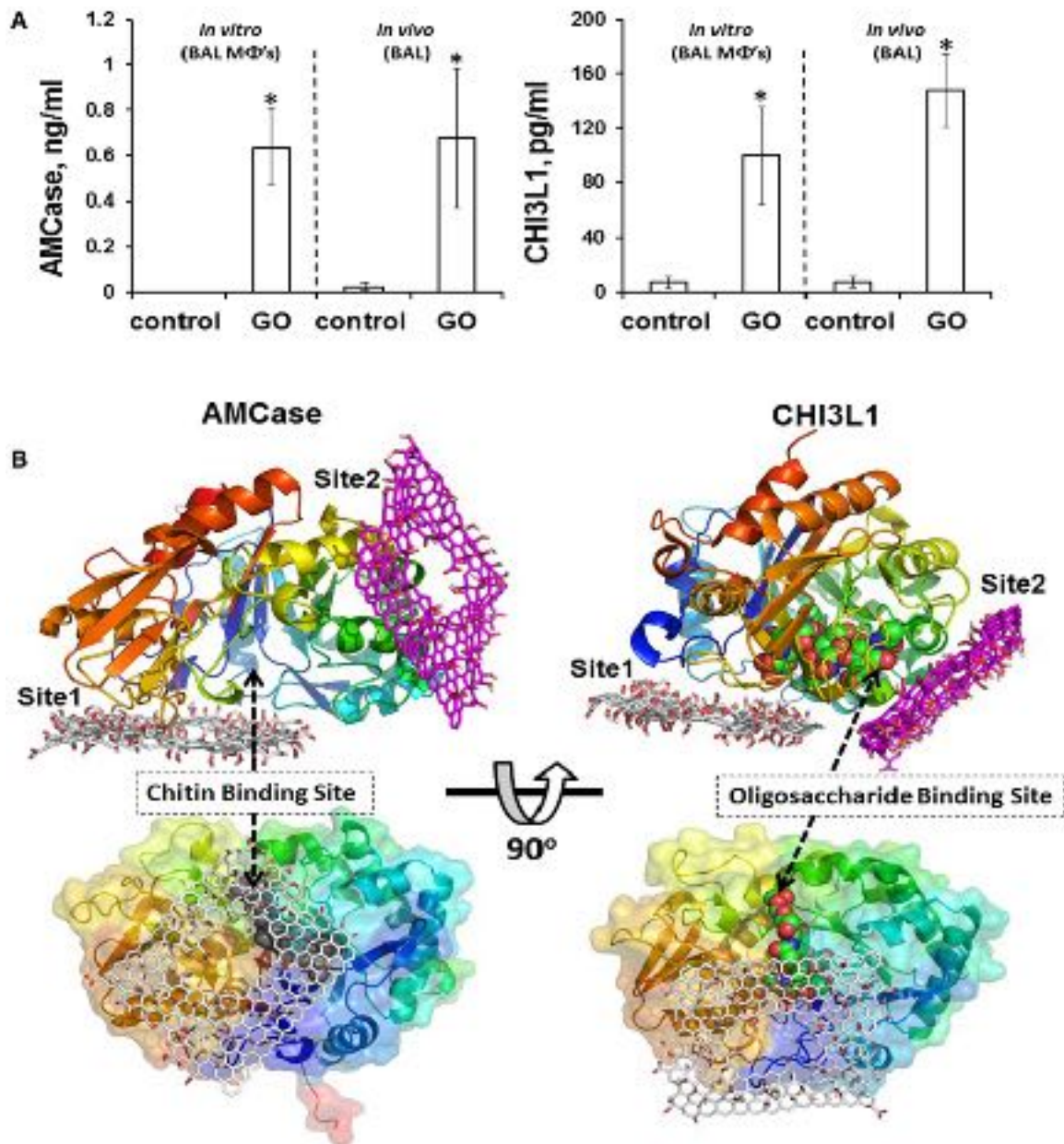


FIGURE 3. L'oxyde de graphène déclenche la production par les macrophages des chitinasés de mammifères, la chitinase 3-like 1 (CHI3L1) et la chitinase acide de mammifère (AMCase), dont l'expression est associée à l'asthme. (A) L'oxyde de graphène stimule l'accumulation d'AMCase et de CHI3L1 dans les poumons de souris. Les niveaux de CHI3L1 et d'AMCase ont été mesurés dans le liquide LBA de souris 7 jours après l'exposition à l'oxyde de graphène, ou dans les surnageants de macrophages cultivés isolés du liquide LBA de souris exposées à l'oxyde de graphène

ou au véhicule 24 heures après l'exposition. (B) La modélisation moléculaire suggère que l'oxyde de graphène peut interagir directement avec les chitinases. Les deux sites de liaison prédits de l'oxyde de graphène, le site 1 et le site 2, sont représentés pour AMCase et CHI3L1, respectivement. L'occlusion de l'entrée du site de liaison à la chitine dans l'AMCase pourrait entraîner l'inhibition de son activité. Reproduit de : Shurin et al. (86), avec la permission de The American Chemical Society.

Effets sur les neutrophiles : Enchevêtrés dans le bleu

Les neutrophiles sont le type de globules blancs le plus abondant et jouent un rôle clé dans la défense contre les agents pathogènes envahissants. Les neutrophiles utilisent diverses stratégies pour éliminer les microbes envahisseurs : (i) absorption microbienne suivie d'une destruction intracellulaire par un ensemble d'enzymes protéolytiques et oxydatives, (ii) dégranulation et sécrétion de facteurs antimicrobiens tels que la myéloperoxydase conduisant à la destruction extracellulaire des microbes, et (iii) libération de neutrophiles avec piégeage et destruction non phagocytaire des microbes (88, 89). Les neutrophiles consistent en un réseau de fibres chromatiniennes décorées de protéines antimicrobiennes telles que l'élastase neutrophile et la myéloperoxydase pour permettre la destruction extracellulaire des bactéries ou des champignons. Il est intéressant de noter que les neutrophiles sont apparemment capables de détecter la taille des microbes et de libérer les neutrophiles de manière sélective en réponse à des agents pathogènes de grande taille, minimisant ainsi le risque de dommages tissulaires associés à la libération des neutrophiles (90). De plus, de plus en plus de preuves suggèrent que la libération de neutrophiles peut également se produire dans des inflammations stériles et non infectieuses, et peut contribuer aux dommages tissulaires (91). Par exemple, il a été démontré que les cristaux d'urate monosodique, l'agent responsable de la goutte, induisent la libération de neutrophiles (92). Les cristaux de cholestérol peuvent également déclencher la formation de neutrophiles, entraînant l'amorçage des macrophages pour la libération de cytokines (80). En outre, dans une étude très récente, l'exposition à de fortes doses de nanoparticules de polystyrène et de nanodiamants a déclenché une inflammation "autolimitée" (résolutive) induite par les neutrophiles chez les souris (93). Aucune formation de neutrophiles n'a été observée en réponse à de grandes particules (100-1 000 nm). Nous avons récemment observé le déclenchement de neutrophiles en fonction de la taille dans des neutrophiles humains primaires exposés à de l'oxyde de graphène, avec un effet plus prononcé pour les feuilles de l'oxyde de graphène de taille micrométrique par rapport

aux feuilles de l'oxyde de graphène de dimensions latérales nanométriques ; nous avons également observé une perturbation des radeaux lipidiques dans les neutrophiles incubés avec de l'oxyde de graphène (Mukherjee et al., résultats non publiés). Nous avons pris soin de contrôler la contamination par les endotoxines, car le LPS est connu pour préparer les neutrophiles à la production de neutrophiles. Les effets des matériaux à base de graphène sur les neutrophiles in vivo pourraient avoir un impact négatif sur la défense immunitaire innée ; ceci reste à étudier.

Effets sur les cellules dendritiques : Aide et complicité

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (94) et, à ce titre, elles sont indispensables à la régulation de l'équilibre entre l'immunité (qui signifie littéralement "exemption", c'est-à-dire la capacité d'un organisme à résister aux micro-organismes) et la tolérance (c'est-à-dire l'indifférence ou la non-réactivité à l'égard de substances qui, autrement, provoqueraient une réponse immunitaire ; un état actif plutôt que passif). Les cellules dendritiques absorbent les molécules étrangères ainsi que les protéines dérivées de l'hôte et les transforment au niveau intracellulaire en antigènes qui sont présentés dans le contexte des molécules d'histocompatibilité majeure de classe I et II à la surface des cellules. Dans une étude in vitro récente, on a constaté que l'oxyde de graphène pur supprime la présentation d'antigènes aux cellules T en utilisant l'ovalbumine comme antigène modèle (95). Les cellules dendritiques ont été exposées à l'oxyde de graphène avant d'être chargées d'ovalbumine, puis mélangées avec des cellules T CD8⁺ B3Z86/90.14 (B3Z) spécifiques du peptide ovalbumine 257-264 (SIINFEKL) anti-souris à restriction H-2Kb. La production d'IL-2 a été suivie comme un signe d'activation des cellules T lors de la reconnaissance de l'épitope ovalbumine 257-264 dans le contexte des molécules H-2Kb (histocompatibilité majeure de classe I). Il est intéressant de noter que si l'oxyde de graphène a également stimulé la maturation des cellules dendritiques, l'effet immunosuppresseur de l'oxyde de graphène était dominant (95). D'autres études sont nécessaires pour comprendre si tous les matériaux à base de graphène se comportent de cette manière. En fait, comme nous le verrons plus loin, certaines variétés de l'oxyde de graphène se sont révélées prometteuses en tant que porteurs d'antigènes.

Les adjuvants couramment utilisés (c'est-à-dire les agents qui sont ajoutés à un vaccin pour stimuler la réponse immunitaire à un antigène spécifique) comprennent des substances telles que l'huile minérale et l'alun ou d'autres composés inorganiques.

Cependant, bien que ces composés soient utilisés en clinique depuis de nombreuses années, leur mécanisme d'action précis reste mal compris (96). Des études récentes ont montré que l'adjuvant d'aluminium, l'alun, déclenchait la libération d'IL-1 β dans les macrophages et les cellules dendritiques d'une manière dépendante de NLRP3 (97), et que les souris déficientes en Nalp3 ne parvenaient pas à développer une réponse anticorps significative à un antigène administré avec des adjuvants d'aluminium (98). En revanche, l'adjuvant complet et incomplet de Freund (c'est-à-dire l'huile minérale avec ou sans mycobactéries inactivées) semble agir de manière indépendante de l'inflammasome. Sun et al. (99) ont démontré que les adjuvants à base d'aluminium peuvent être modifiés pour optimiser leurs propriétés immunostimulantes. Plus précisément, les auteurs ont synthétisé une bibliothèque de nanorobots d'oxyhydroxyde d'aluminium (AIOOH) et les ont comparés à de l'alun commercial. Ils ont pu montrer que la forme, la cristallinité et la teneur en hydroxyle jouaient un rôle important dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (99). Rettig et al. (100) ont apporté la preuve que la taille des particules peut également influencer la réponse immunitaire au "danger". En utilisant de l'ARN simple brin (un signal de "danger" connu) mélangé à de la protamine pour former des particules de différentes tailles, les auteurs ont pu montrer que la taille des particules déterminait le déclenchement d'une réponse immunitaire antivirale ou antibactérienne/antifongique. Ils ont suggéré que cela était dû, au moins en partie, à la phagocytose sélective des particules de taille nanométrique par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, qui produisaient de l'interféron- α . Il sera intéressant d'étudier les effets potentiels des GBM de différentes dimensions latérales sur les cellules dendritiques et de voir si ces matériaux pourraient également être exploités comme adjuvants pour stimuler les réponses immunitaires. Les GBMs pourraient également s'avérer avantageux en tant que porteurs d'antigènes. Li et al. (101) ont exploité le fait que l'oxyde de graphène peut spontanément adsorber des protéines pour explorer l'utilisation de ce matériau pour l'administration intracellulaire de vaccins. À l'aide d'un modèle in vitro, les auteurs ont pu montrer que les protéines adsorbées par l'oxyde de graphène étaient efficacement internalisées par les cellules dendritiques, ce qui a conduit à une présentation croisée de l'antigène aux cellules T CD8+. Dans une étude in vivo plus récente, il a été démontré que l'oxyde de graphène modifié par un polymère (oxyde de graphène-PEG-PEI) avec des dimensions latérales à l'échelle nanométrique agissait comme un transporteur d'antigènes pour faire passer les antigènes dans les cellules dendritiques (102). En outre, par rapport à l'antigène Uréase B d'*Helicobacter pylori* libre et au vaccin à base d'adjuvant d'aluminium cliniquement approuvé (Alum-Ure B), l'oxyde de graphène-PEG-PEI-Ure B s'est avéré induire une immunité cellulaire plus forte lors de l'administration intradermique (102). L'oxyde de graphène pur ou l'oxyde de graphène-PEG n'ont pas

eu le même effet. La surface élevée de l'oxyde de graphène, qui permet une grande capacité de chargement d'antigènes, ainsi que la charge positive conférée par le revêtement polymère pourraient contribuer à expliquer cet effet. La possibilité que l'oxyde de graphène en soi puisse avoir des propriétés adjuvantes doit également être explorée, à la lumière du fait que les petites et grandes feuilles de l'oxyde de graphène déclenchent l'inflammasome NLRP3 (discuté ci-dessus). Enfin, Meng et al. (103) ont récemment rapporté que des feuilles de l'oxyde de graphène de très petite taille décorées avec le composé antioxydant carnosine modulent l'immunité innée et améliorent l'immunité adaptative. Les auteurs ont pu montrer que l'oxyde de graphène modifié de manière covalente avec de la carnosine, lorsqu'il est mélangé avec l'antigène modèle, l'ovalbumine, favorise des réponses anticorps robustes et durables spécifiques à l'ovalbumine, augmente l'efficacité de la prolifération des lymphocytes et améliore l'activation des cellules T CD4+ et T CD8+. Les auteurs ont proposé que l'oxyde de graphène-carnosine puisse être utile comme adjuvant pour améliorer efficacement les réponses immunitaires humorales et innées in vivo.

Remarques finales

Dans le présent essai, nous avons mis en évidence les recherches récentes sur les interactions des matériaux à base de graphène, en particulier de l'oxyde de graphène, avec le système immunitaire, en axant notre discussion principalement sur les études in vitro. Bien que nous soyons loin d'une compréhension complète de ces interactions, on peut se demander s'il existe des conclusions générales à ce stade. Une question technique, mais non triviale, lors de la réalisation d'études sur les matériaux à base de graphène et les cellules immunocompétentes, concerne l'importance de connaître non seulement le matériel d'essai (10), et de savoir s'il y a des traces d'endotoxine car cela peut avoir un impact sur les réponses immunitaires ultérieures, mais aussi le système d'essai, c'est-à-dire le modèle cellulaire, y compris la composition du milieu cellulaire, et si celui-ci est complété ou non par du sérum. En outre, il est important de réaliser que la membrane plasmique n'est pas seulement une barrière impassible entre l'intérieur d'une cellule et l'espace extracellulaire, mais qu'elle sert également de plateforme importante pour la communication cellulaire entre les cellules, et entre l'extérieur et l'intérieur d'une cellule (104). Cela est vrai en particulier pour les cellules immunocompétentes qui sont spécialisées dans la détection et l'échantillonnage de leur environnement. Il découle de cet argument que les effets d'un biomatériau sur la membrane cellulaire pourraient avoir des ramifications pour la communication et la

fonction des cellules immunitaires. Il est intéressant de noter qu'il a été démontré précédemment que l'adjuvant, l'alun, déclenchait des réponses dans les cellules dendritiques en modifiant les structures lipidiques de la membrane, ce qui démontre que la signalisation immunitaire n'est pas toujours médiée par les récepteurs et suggère que la membrane plasmique pourrait se comporter comme un "capteur" de structures solides (105). Ainsi, l'impact d'un biomatériau n'est pas nécessairement lié à l'internalisation ou non du matériau, car des effets directs sur la membrane plasmique pourraient également entrer en jeu. Dans le domaine de la nanotoxicologie, beaucoup de temps et d'efforts ont été consacrés à la détermination de la dose de nanoparticules délivrée aux cellules et internalisée par celles-ci, mais pour les matériaux atomiquement minces avec de grandes dimensions latérales, certains résultats toxicologiques peuvent dépendre des effets directs sur la membrane plasmique, et pas seulement de l'absorption cellulaire du matériau. En d'autres termes, alors que nous continuons à étudier les réponses immunologiques aux matériaux à base de graphène et à d'autres matériaux en 2D, nous ne devons pas oublier que l'étude d'interactions apparemment superficielles peut apporter des informations importantes.

Ou, comme l'a dit un jour l'actrice Ava Gardner, «*Au fond, je suis plutôt superficielle* ».

Contributions des auteurs

Bengt Fadeel a rédigé le manuscrit, avec la contribution de Sourav Pr. Mukherjee et Massimo Bottini. La version finale du manuscrit a été discutée et approuvée par tous les auteurs participants.

Déclaration de conflit d'intérêts

Les auteurs déclarent que la recherche a été menée en l'absence de toute relation commerciale ou financière qui pourrait être interprétée comme un conflit d'intérêts potentiel.

Financements

Ce travail a été soutenu par des subventions accordées à BF par la Commission européenne (Flagship Project GRAPHENE, subvention n° 696656) et le Conseil suédois de la recherche (subvention n° 2016-02040).

Références et Liens

1. Kostarelos K, Novoselov KS. Materials science. Exploring the interface of graphene and biology. *Science* (2014) 344:261–3. doi:10.1126/science.1246736

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

2. Ferrari AC, Bonaccorso F, Fal'ko V, Novoselov KS, Roche S, Bøggild P, et al. Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems. *Nanoscale* (2015) 7(11):4598–810. doi:10.1039/c4nr01600a

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

3. Bhattacharya K, Mukherjee SP, Gallud A, Burkert SC, Bistarelli S, Bellucci S, et al. Biological interactions of carbon-based nanomaterials: from coronation to degradation. *Nanomedicine* (2016) 12(2):333–51. doi:10.1016/j.nano.2015.11.011

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

4. Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong BH, Min DH, Kostarelos K. Prospects and challenges of graphene in biomedical applications. *Adv Mater* (2013) 25(16):2258–68. doi:10.1002/adma.201203700

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

5. Sanchez VC, Jachak A, Hurt RH, Kane AB. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chem Res Toxicol* (2012) 25(1):15–34. doi:10.1021/tx200339h

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

6. Farrera C, Fadeel B. It takes two to tango: understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. *Eur J Pharm Biopharm* (2015) 95(Pt A):3–12. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.007

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

7. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* (1999) 17:593–623. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

8. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* (2006) 6(3):173–82. doi:10.1038/nri1785

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

9. Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2011) 51:267–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

10. Wick P, Louw-Gaume AE, Kucki M, Krug HF, Kostarelos K, Fadeel B, et al. Classification framework for graphene-based materials. *Angew Chem Int Ed Engl* (2014) 53(30):7714–8. doi:10.1002/anie.201403335

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

11. Kotchey GP, Hasan SA, Kapralov AA, Ha SH, Kim K, Shvedova AA, et al. A natural vanishing act: the enzyme-catalyzed degradation of carbon nanomaterials. *Acc Chem Res* (2012) 45(10):1770–81. doi:10.1021/ar300106h

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

12. Chen M, Qin X, Zeng G. Biodegradation of carbon nanotubes, graphene, and their derivatives. *Trends Biotechnol* (2017). doi:10.1016/j.tibtech.2016.12.001

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

13. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* (1994) 8:217–25.

[PubMed Abstract](#) | [Google Scholar](#)

14. Bishop RE. Fundamentals of endotoxin structure and function. *Contrib Microbiol* (2005) 12:1–27. doi:10.1159/000081687

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

15. Vallhov H, Qin J, Johansson SM, Ahlborg N, Muhammed MA, Scheynius A, et al. The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. *Nano Lett* (2006) 6(8):1682–6. doi:10.1021/nl060860z

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

16. Delogu LG, Stanford SM, Santelli E, Magrini A, Bergamaschi A, Motamedchaboki K, et al. Carbon nanotube-based nanocarriers: the importance of keeping it clean. *J Nanosci Nanotechnol* (2010) 10(8):5293–301. doi:10.1166/jnn.2010.3083

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

17. Dobrovolskaia MA, Germolec DR, Weaver JL. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nat Nanotechnol* (2009) 4(7):411–4. doi:10.1038/nnano.2009.175

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

18. Li Y, Boraschi D. Endotoxin contamination: a key element in the interpretation of nanosafety studies. *Nanomedicine (Lond)* (2016) 11(3):269–87. doi:10.2217/nm.15.196

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

19. Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Poole S, Mistry Y, et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *J Immunol Methods* (2005) 298:161–73. doi:10.1016/j.jim.2005.01.010

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

20. Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Ding H, Ljubimova J, McNeil SE. Ambiguities in applying traditional *Limulus* amebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. *Nanomedicine (Lond)* (2010) 5:555–62. doi:10.2217/nnm.10.29

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

21. Smulders S, Kaiser JP, Zuin S, Van Landuyt KL, Golanski L, Vanoirbeek J, et al. Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. *Part Fibre Toxicol* (2012) 9:41. doi:10.1186/1743-8977-9-41

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

22. Kucki M, Cavelius C, Kraegeloh A. Interference of silica nanoparticles with the traditional *Limulus* amebocyte lysate gel clot assay. *Innate Immun* (2014) 20:327–36. doi:10.1177/1753425913492833

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

23. Mukherjee SP, Lozano N, Kucki M, Del Rio-Castillo AE, Newman L, Vázquez E, et al. Detection of endotoxin contamination of graphene based materials using the TNF- α expression test and guidelines for endotoxin-free graphene oxide production. *PLoS One* (2016) 11(11):e0166816. doi:10.1371/journal.pone.0166816

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

24. Yang M, Nie X, Meng J, Liu J, Sun Z, Xu H. Carbon nanotubes activate *Limulus* amebocyte lysate coagulation by interface adsorption. *ACS Appl Mater Interfaces* (2017) 9(10):8450–4. doi:10.1021/acsami.7b00543

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

25. Lahiani MH, Gokulan K, Williams K, Khodakovskaya MV, Khare S. Graphene and carbon nanotubes activate different cell surface receptors on macrophages before and after deactivation of endotoxins. *J Appl Toxicol* (2017). doi:10.1002/jat.3477

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

26. Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* (2012) 7(12):779–86. doi:10.1038/nnano.2012.207

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

27. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(7):2050–5. doi:10.1073/pnas.0608582104

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

28. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(38):14265–70. doi:10.1073/pnas.0805135105

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

29. Saha K, Rahimi M, Yazdani M, Kim ST, Moyano DF, Hou S, et al. Regulation of macrophage recognition through the interplay of nanoparticle surface functionality and protein corona. *ACS Nano* (2016) 10(4):4421–30. doi:10.1021/acsnano.6b00053

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

30. Walkey CD, Olsen JB, Song F, Liu R, Guo H, Olsen DW, et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* (2014) 8(3):2439–55. doi:10.1021/nn406018q

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

31. Bertoli F, Garry D, Monopoli MP, Salvati A, Dawson KA. The intracellular destiny of the protein corona: a study on its cellular internalization and evolution. *ACS Nano* (2016) 10(11):10471–9. doi:10.1021/acsnano.6b06411

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

32. Ge C, Du J, Zhao L, Wang L, Liu Y, Li D, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(41):16968–73. doi:10.1073/pnas.1105270108

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

33. Chong Y, Ge C, Yang Z, Garate JA, Gu Z, Weber JK, et al. Reduced cytotoxicity of graphene nanosheets mediated by blood-protein coating. *ACS Nano* (2015) 9(6):5713–24. doi:10.1021/nn5066606

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

34. Duan G, Kang SG, Tian X, Garate JA, Zhao L, Ge C, et al. Protein corona mitigates the cytotoxicity of graphene oxide by reducing its physical interaction with cell membrane. *Nanoscale* (2015) 7(37):15214–24. doi:10.1039/c5nr01839k

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

35. Luan B, Huynh T, Zhao L, Zhou R. Potential toxicity of graphene to cell functions via disrupting protein-protein interactions. *ACS Nano* (2015) 9(1):663–9. doi:10.1021/nn506011j

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

36. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev* (2010) 39(1):228–40. doi:10.1039/b917103g

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

37. Wang S, Zhang Y, Abidi N, Cabrales L. Wettability and surface free energy of graphene films. *Langmuir* (2009) 25(18):11078–81. doi:10.1021/la901402f

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

38. Kim J, Cote LJ, Kim F, Yuan W, Shull KR, Huang J. Graphene oxide sheets at interfaces. *J Am Chem Soc* (2010) 132(23):8180–6. doi:10.1021/ja102777p

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

39. Moghimi SM, Hunter AC, Andresen TL. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2012) 52:481–503. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

40. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol* (2013) 8(10):772–81. doi:10.1038/nnano.2013.181

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

41. Sacchetti C, Motamedchaboki K, Magrini A, Palmieri G, Mattei M, Bernardini S, et al. Surface polyethylene glycol conformation influences the protein corona of polyethylene glycol-modified single-walled carbon nanotubes: potential implications on biological performance. *ACS Nano* (2013) 7(3):1974–89. doi:10.1021/nn400409h

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

42. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* (2010) 11(9):785–97. doi:10.1038/ni.1923

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

43. Belling JN, Jackman JA, Yorulmaz Avsar S, Park JH, Wang Y, Potroz MG, et al. Stealth immune properties of graphene oxide enabled by surface-bound complement factor H. *ACS Nano* (2016) 10(11):10161–72. doi:10.1021/acsnano.6b05409

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

44. Moghimi SM, Andersen AJ, Hashemi SH, Lettiero B, Ahmadvand D, Hunter AC, et al. Complement activation cascade triggered by PEG-PL engineered nanomedicines

and carbon nanotubes: the challenges ahead. *J Control Release* (2010) 146(2):175–81. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.003

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

45. Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green ML, Sim RB. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol* (2006) 43(3): 193–201. doi:10.1016/j.molimm.2005.02.006

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

46. Andersen AJ, Robinson JT, Dai H, Hunter AC, Andresen TL, Moghimi SM. Single-walled carbon nanotube surface control of complement recognition and activation. *ACS Nano* (2013) 7(2):1108–19. doi:10.1021/nn3055175

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

47. Tan X, Feng L, Zhang J, Yang K, Zhang S, Liu Z, et al. Functionalization of graphene oxide generates a unique interface for selective serum protein interactions. *ACS Appl Mater Interfaces* (2013) 5(4):1370–7. doi:10.1021/am302706g

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

48. Wibroe PP, Petersen SV, Bovet N, Laursen BW, Moghimi SM. Soluble and immobilized graphene oxide activates complement system differently dependent on surface oxidation state. *Biomaterials* (2016) 78:20–6. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.028

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

49. Mahon E, Salvati A, Baldelli Bombelli F, Lynch I, Dawson KA. Designing the nanoparticle-biomolecule interface for “targeting and therapeutic delivery”. *J Control Release* (2012) 161(2):164–74. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.009

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

50. Schöttler S, Landfester K, Mailänder V. Controlling the stealth effect of nanocarriers through understanding the protein corona. *Angew Chem Int Ed Engl* (2016) 55(31): 8806–15. doi:10.1002/anie.201602233

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

51. Schöttler S, Becker G, Winzen S, Steinbach T, Mohr K, Landfester K, et al. Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat Nanotechnol* (2016) 11(4):372–7. doi:10.1038/nnano.2015.330

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

52. Luo N, Ni D, Yue H, Wei W, Ma G. Surface-engineered graphene navigate divergent biological outcomes toward macrophages. *ACS Appl Mater Interfaces* (2015) 7(9):5239–47. doi:10.1021/am5084607

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

53. Luo N, Weber JK, Wang S, Luan B, Yue H, Xi X, et al. PEGylated graphene oxide elicits strong immunological responses despite surface passivation. *Nat Commun* (2017) 8:14537. doi:10.1038/ncomms14537

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

54. Xu M, Zhu J, Wang F, Xiong Y, Wu Y, Wang Q, et al. Improved in vitro and in vivo biocompatibility of graphene oxide through surface modification: poly(acrylic acid)-functionalization is superior to PEGylation. *ACS Nano* (2016) 10(3):3267–81. doi:10.1021/acsnano.6b00539

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

55. Cho YC, Pak PJ, Joo YH, Lee HS, Chung N. In vitro and in vivo comparison of the immunotoxicity of single- and multi-layered graphene oxides with or without pluronic F-127. *Sci Rep* (2016) 6:38884. doi:10.1038/srep38884

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

56. Russier J, Treossi E, Scarsi A, Perrozzi F, Dumortier H, Ottaviano L, et al. Evidencing the mask effect of graphene oxide: a comparative study on primary human and murine phagocytic cells. *Nanoscale* (2013) 5(22):11234–47. doi:10.1039/c3nr03543c

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

57. Ma J, Liu R, Wang X, Liu Q, Chen Y, Valle RP, et al. Crucial role of lateral size for graphene oxide in activating macrophages and stimulating pro-inflammatory responses in cells and animals. *ACS Nano* (2015) 9(10):10498–515. doi:10.1021/acsnano.5b04751

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

58. Orecchioni M, Jasim DA, Pescatori M, Manetti R, Fozza C, Sgarrella F, et al. Molecular and genomic impact of large and small lateral dimension graphene oxide sheets on human immune cells from healthy donors. *Adv Healthc Mater* (2016) 5(2): 276–87. doi:10.1002/adhm.201500606

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

59. Li Y, Yuan H, von dem Bussche A, Creighton M, Hurt RH, Kane AB, et al. Graphene microsheets enter cells through spontaneous membrane penetration at edge asperities and corner sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110(30):12295–300. doi:10.1073/pnas.1222276110

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

60. Wu C, Wang C, Zheng J, Luo C, Li Y, Guo S, et al. Vacuolization in cytoplasm and cell membrane permeability enhancement triggered by micrometer-sized graphene oxide. *ACS Nano* (2015) 9(8):7913–24. doi:10.1021/acsnano.5b01685

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

61. Zhu J, Xu M, Gao M, Zhang Z, Xu Y, Xia T, et al. Graphene oxide induced perturbation to plasma membrane and cytoskeletal meshwork sensitize cancer cells to chemotherapeutic agents. *ACS Nano* (2017) 11(3):2637–51. doi:10.1021/acsnano.6b07311

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

62. Duan G, Zhang Y, Luan B, Weber JK, Zhou RW, Yang Z, et al. Graphene-induced pore formation on cell membranes. *Sci Rep* (2017) 7:42767. doi:10.1038/srep42767

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

63. Pham VT, Truong VK, Quinn MD, Notley SM, Guo Y, Baulin VA, et al. Graphene induces formation of pores that kill spherical and rod-shaped bacteria. *ACS Nano* (2015) 9(8):8458–67. doi:10.1021/acsnano.5b03368

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

64. Tu Y, Lv M, Xiu P, Huynh T, Zhang M, Castelli M, et al. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. *Nat Nanotechnol* (2013) 8(8):594–601. doi:10.1038/nnano.2013.125

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

65. Sun C, Wakefield DL, Han Y, Muller DA, Holowka DA, Baird BA, et al. Graphene oxide nanosheets stimulate ruffling and shedding of mammalian cell plasma membranes. *Chem* (2016) 1(2):273–86. doi:10.1016/j.chempr.2016.06.019

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

66. Bussy C, Kostarelos K. Culture media critically influence graphene oxide effects on plasma membranes. *Chem* (2017) 2(3):322–3. doi:10.1016/j.chempr.2017.01.015

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

67. Lunov O, Syrovets T, Loos C, Beil J, Delacher M, Tron K, et al. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano* (2011) 5(3):1657–69. doi:10.1021/nn2000756

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

68. Gallud A, Bondarenko O, Feliu N, Kupferschmidt N, Atluri R, Garcia-Bennett A, et al. Macrophage activation status determines the internalization of mesoporous silica particles of different sizes: exploring the role of different pattern recognition receptors. *Biomaterials* (2017) 121:28–40. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.12.029

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

69. MacParland SA, Tsoi KM, Ouyang B, Ma XZ, Manuel J, Fawaz A, et al. Phenotype determines nanoparticle uptake by human macrophages from liver and blood. *ACS Nano* (2017) 11(3):2428–43. doi:10.1021/acsnano.6b06245

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

70. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:407–20. doi:10.1038/nri.2016.58

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

71. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* (2006) 440(7081):237–41. doi:10.1038/nature04516

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

72. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* (2010) 464(7293):1357–61. doi:10.1038/nature08938

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

73. Palomäki J, Välimäki E, Sund J, Vippola M, Clausen PA, Jensen KA, et al. Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS Nano* (2011) 5(9):6861–70. doi:10.1021/nn200595c

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

74. Sun B, Wang X, Ji Z, Wang M, Liao YP, Chang CH, et al. NADPH oxidase-dependent NLRP3 inflammasome activation and its important role in lung fibrosis by multiwalled carbon nanotubes. *Small* (2015) 11(17):2087–97. doi:10.1002/smll.201402859

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

75. Yang M, Flavin K, Kopf I, Radics G, Hearnden CH, McManus GJ, et al. Functionalization of carbon nanoparticles modulates inflammatory cell recruitment

and NLRP3 inflammasome activation. *Small* (2013) 9(24):4194–206. doi:10.1002/sml.201300481

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

76. Andón FT, Mukherjee SP, Gessner I, Wortmann L, Xiao L, Hultenby K, et al. Hollow carbon spheres trigger inflammasome-dependent IL-1 β secretion in macrophages. *Carbon N Y* (2017) 113:243–51. doi:10.1016/j.carbon.2016.11.049

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

77. Wang X, Duch MC, Mansukhani N, Ji Z, Liao YP, Wang M, et al. Use of a pro-fibrogenic mechanism-based predictive toxicological approach for tiered testing and decision analysis of carbonaceous nanomaterials. *ACS Nano* (2015) 9(3):3032–43. doi:10.1021/nn507243w

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

78. Bhattacharya K, Andón FT, El-Sayed R, Fadeel B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on pulmonary inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* (2013) 65(15):2087–97. doi:10.1016/j.addr.2013.05.012

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

79. Jessop F, Holian A. Extracellular HMGB1 regulates multi-walled carbon nanotube-induced inflammation in vivo. *Nanotoxicology* (2015) 9(3):365–72. doi:10.3109/17435390.2014.933904

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

80. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* (2015) 349(6245):316–20. doi:10.1126/science.aaa8064

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

81. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* (2014) 14(8):546–58. doi:10.1038/nri3713

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

82. Manček-Keber M, Jerala R. Postulates for validating TLR4 agonists. *Eur J Immunol* (2015) 45(2):356–70. doi:10.1002/eji.201444462

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

83. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* (2004) 4(6):469–78. doi:10.1038/nri1372

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

84. Qu G, Liu S, Zhang S, Wang L, Wang X, Sun B, et al. Graphene oxide induces toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent necrosis in macrophages. *ACS Nano* (2013) 7(7): 5732–45. doi:10.1021/nn402330b

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

85. Chen GY, Yang HJ, Lu CH, Chao YC, Hwang SM, Chen CL, et al. Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials* (2012) 33(27):6559–69. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.064

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

86. Shurin MR, Yanamala N, Kisin ER, Tkach AV, Shurin GV, Murray AR, et al. Graphene oxide attenuates Th2-type immune responses, but augments airway remodeling and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *ACS Nano* (2014) 8(6):5585–99. doi:10.1021/nn406454u

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

87. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* (2004) 304(5677):1678–82. doi:10.1126/science.1095336

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

88. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (2004) 303(5663):1532–5. doi:10.1126/science.1092385

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

89. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* (2009) 30(11):513–21. doi:10.1016/j.it.2009.07.011

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

90. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* (2014) 15(11):1017–25. doi:10.1038/ni.2987

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

91. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med* (2017) 23(3):279–87. doi:10.1038/nm.4294

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

92. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med* (2014) 20(5):511–7. doi:10.1038/nm.3547

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

93. Muñoz LE, Bilyy R, Biermann MH, Kienhöfer D, Maueröder C, Hahn J, et al. Nanoparticles size-dependently initiate self-limiting NETosis-driven inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113(40):E5856–65. doi:10.1073/pnas.1602230113

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

94. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* (2012) 30:1–22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

95. Tkach AV, Yanamala N, Stanley S, Shurin MR, Shurin GV, Kisin ER, et al. Graphene oxide, but not fullerenes, targets immunoproteasomes and suppresses antigen presentation by dendritic cells. *Small* (2013) 9(9–10):1686–90. doi:10.1002/sml.201201546

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

96. De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. *Eur J Immunol* (2008) 38(8):2068–71. doi:10.1002/eji.200838648

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

97. Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* (2008) 181(6):3755–9. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3755

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

98. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* (2008) 453(7198):1122–6. doi:10.1038/nature06939

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

99. Sun B, Ji Z, Liao YP, Wang M, Wang X, Dong J, et al. Engineering an effective immune adjuvant by designed control of shape and crystallinity of aluminum oxyhydroxide nanoparticles. *ACS Nano* (2013) 7(12):10834–49. doi:10.1021/nn404211j

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

100. Rettig L, Haen SP, Bittermann AG, von Boehmer L, Curioni A, Krämer SD, et al. Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling. *Blood* (2010) 115(22):4533–41. doi:10.1182/blood-2009-11-247817

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

101. Li H, Fierens K, Zhang Z, Vanparijs N, Schuijs MJ, Van Steendam K, et al. Spontaneous protein adsorption on graphene oxide nanosheets allowing efficient intracellular vaccine protein delivery. *ACS Appl Mater Interfaces* (2016) 8(2):1147–55. doi:10.1021/acsami.5b08963

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

102. Xu L, Xiang J, Liu Y, Xu J, Luo Y, Feng L, et al. Functionalized graphene oxide serves as a novel vaccine nano-adjuvant for robust stimulation of cellular immunity. *Nanoscale* (2016) 8(6):3785–95. doi:10.1039/c5nr09208f

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

103. Meng C, Zhi X, Li C, Li C, Chen Z, Qiu X, et al. Graphene oxides decorated with carnosine as an adjuvant to modulate innate immune and improve adaptive immunity in vivo. *ACS Nano* (2016) 10(2):2203–13. doi:10.1021/acsnano.5b06750

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

104. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* (2010) 327(5961):46–50. doi:10.1126/science.1174621

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

105. Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med* (2011) 17(4):479–87. doi:10.1038/nm.2306

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Keywords: graphene, macrophage, endotoxin, inflammasome, pattern recognition receptors

Citation: Mukherjee SP, Bottini M and Fadeel B (2017) Graphene and the Immune System: A Romance of Many Dimensions. *Front. Immunol.* 8:673. doi: 10.3389/fimmu.2017.00673

Received: 08 April 2017; **Accepted:** 24 May 2017;

Published: 13 June 2017

Edited by:

Paola Italiani, Consiglio Nazionale Delle Ricerche (CNR), Italy

Reviewed by:

[Seyed Moein Moghimi](#), Durham University, United Kingdom

[Aldo Tagliabue](#), ALTA, Italy

Copyright: © 2017 Mukherjee, Bottini and Fadeel. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

***Correspondence:** Bengt Fadeel, bengt.fadeel@ki.se

Disclaimer: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article or claim that may be made by its manufacturer is not guaranteed or endorsed by the publisher.