



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. KEVIN GILLOIS

le vendredi 29 janvier 2021

Titre :

Exposition orale à l'argent colloïdal en condition de fonction barrière digestive intègre puis fragilisée: quels impacts croisés sur l'épithélium, le mucus et le microbiote intestinal?

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

MME MURIEL MERCIER-BONIN

M. HERVE ROBERT

Rapporteurs :

M. JEROME GAY-QUEHEILLARD, INERIS
Mme JASMINA VIDIC, INRA JOUY EN JOSAS

Membre(s) du jury :

Mme VASSILIA THEODOROU, EI PURPAN, Président
M. GILLES RIVIERE, ANSES, Membre
M. HERVE ROBERT, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre
Mme MURIEL MERCIER-BONIN, INRA TOULOUSE, Membre

Avant-Propos

Ce projet de thèse a pour objectif d'évaluer, par une caractérisation multi-échelle, les conséquences d'une exposition orale à deux produits commerciaux d'argent colloïdal sur la sphère intestinale, en condition de fonction barrière digestive intègre puis fragilisée par l'application d'un stress psychologique. Ce travail, ayant bénéficié d'un co-financement INRAE AlimH/Région Occitanie, s'inscrit au cœur du projet inter-départements INRAE AlimH/TRANSFORM/MICA « Exposition orale à l'argent des additifs et compléments alimentaires : transformations physico-chimiques et conséquences sur le mucus dans son dialogue avec le microbiote intestinal en condition de stress chronique (NanoStress) » (2018-2019), faisant intervenir différents partenaires académiques aux expertises multidisciplinaires.

Mon travail au sein de Toxalim dans l'équipe Neuro-Gastroentérologie et Nutrition s'est principalement centré sur l'évaluation de la toxicité de deux produits d'argent colloïdal sur des modèles *in vitro* et *in vivo* sur modèle murin, faisant appel à un large spectre d'analyses en biologie cellulaire et physiologie digestive pour évaluer de nombreux paramètres fonctionnels de la barrière intestinale : cytotoxicité, perméabilité intestinale, mucus, inflammation intestinale, ainsi que génotoxicité, grâce à la collaboration avec Julien Vignard et Gladys Mirey de l'équipe Génotoxicité & Signalisation. L'étude physico-chimique de l'argent dans les deux produits d'intérêt a été menée par l'expertise conjointe de l'Unité Biopolymères Interactions Assemblages de l'INRAE de Nantes (BIA - Marie-Hélène Ropers) et de l'Institut des Matériaux Jean Rouxel de Nantes (IMN - Hélène Terrisse). J'ai ainsi pu effectuer un séjour d'une semaine en avril 2018 dans ces deux laboratoires pour m'initier aux techniques analytiques et réaliser les premiers essais de caractérisation. Mon travail a également bénéficié de la forte expertise en imagerie à haute résolution du Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie de Toulouse (CMEAB - Isabelle Fourquaux), du Synchrotron SOLEIL à Gif-sur-Yvette (ligne de lumière LUCIA – Camille Rivard) et du *Luxembourg Institute of Science and Technology* (LIST - Charlotte Stoffels, Sébastien Cambier, Jean-Nicolas Audinot).

Une étude plus approfondie de la fonction barrière intestinale après exposition à l'argent colloïdal a pu être réalisée grâce à l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq (UGSF - Catherine Robbe-Masselot) sur l'analyse des sucres du mucus (ou O-glycobiome) et à l'Institut Micalis de Jouy en Josas pour l'analyse des microbiotes bactérien (Emmanuelle Maguin) et fongique (Mathias Lavie-Richard).

De plus, ce projet de thèse a ouvert de nouvelles collaborations pour des innovations technologiques, telles que celle réalisée avec l'Ecole d'Ingénieurs de PURPAN de Toulouse (Cécile Levasseur) pour l'analyse des organes, contenus et tissus intestinaux après exposition en spectroscopie proche infrarouge.

Le présent manuscrit traduit mon implication dans un travail collaboratif qui, grâce à l'ensemble des partenaires et à sa multidisciplinarité, a pu aboutir à des avancées scientifiques originales et à leur valorisation.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse **Jasmina Vidic**, **Jérôme Gay-Quéheillard** et **Gilles Rivière** pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci à **Vassilia Théodorou** d'avoir accepté d'être la présidente de ce jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse **Hervé Robert** et **Muriel Mercier-Bonin**. La thèse est une aventure scientifique, mais également humaine... ces mots prononcés lors de l'entretien d'embauche ont pris tous leurs sens au cours de ces années passées à vos côtés et je vous remercie de m'avoir conseillé et guidé tout au long de cette aventure riche en rebondissements.

Je remercie l'ensemble des partenaires de ce projet : **Marie-Hélène Ropers**, **Hélène Terrisse**, **Mathias Lavie-Richard**, **Emmanuelle Maguin**, **Catherine Robbe-Masselot**, **Camille Rivard**, **Charlotte Stoffels**, **Sebastien Cambier**, **Jean-Nicolas Audinot**, **Isabelle Fourquaux**, **Muriel Cocaign-Bousquet**, **Laurence Girbal**, **Cécile Levasseur**, **Julien Vignard**, **Anne Fernandez-Vidal** et **Gladys Mirey**. L'aboutissement de ce projet est le fruit de nos échanges et travaux constructifs et passionnants. J'ai eu la chance d'évoluer dans de nombreux domaines de recherche transversaux grâce à vous, alors merci à tous. Je remercie également **Justine Blesson** et **Inès Souni**, vous m'aurez autant appris que l'inverse au cours de vos stages à mes côtés. Question apprentissage, je remercie également l'IUT de Auch pour ces deux années où j'ai pu avoir le plaisir d'enseigner (et en apprendre tout autant) et je remercie tout particulièrement **Yassine Nait Chabane** pour son encadrement et sa gentillesse.

Je remercie également **Marie Hélène Ropers**, **Stéphanie Blanquet** et **Muriel Thomas** pour leur investissement au sein de mon comité de thèse et leurs précieux conseils. Au-delà du comité de thèse, je te remercie Marie-Hélène, ainsi qu'Hélène et Bernard, pour votre accueil chaleureux à Nantes et cette semaine passionnante passée dans le monde des physico-chimistes.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Neuro-gastroentérologie et Nutrition, ceux d'aujourd'hui, mais également ceux d'hier. Plus que des collègues, plus qu'une équipe, vous avez été une famille (et le labo a été « un peu » ma maison d'ailleurs). **Vassilia Théodorou**, c'est un honneur pour moi de t'avoir eu en tant que chef d'équipe, un exemple de positivisme qui apporte un vent de fraîcheur au quotidien. **Mathilde Lévêque** et **Valérie Bézirard**, merci pour votre aide technique, votre énergie et les instants de « décompression » quand tout part en

sucette comme avec toi Mathilde quand la culture cellulaire s'apparentait à une culture fongique ! À **Maiwenn Olier**, **Christine Coméra**, **Hélène Eutamène**, **Hanna Ilchmann**, **Valérie Mils**, **Valérie Bacquié**, **Sandrine Ménard** et **Laurence Guzilack**, merci pour vos échanges chaleureux et vos conseils tout au long de ces plus de trois ans de thèse. À **Catherine Beaufrand** et **Valérie Tondereau**, je fais un remerciement spécial pour avoir fait preuve de patience avec moi et inversement... Valérie je garderai précieusement tes tutos Powerpoint en souvenir de ta grande expertise en outils informatiques. **Corinne Lencina**, ma chère Coco, je te remercie pour tous ces moments passés ensemble, dans et hors du labo... chanceux sont les doctorants qui grandiront à tes côtés et chanceux étais-je de partager le même bureau. En parlant de bureau, je fais une mention spéciale à **Jasper Kamphuis**, **Sophie Yvon**, **Fanny Placide**, **Núria Solà-Tapias**, **Anaïs Mazenc**, la *dream team* du bureau (#cœurcoeurlove). Je ne m'étalerai pas en éloge tant il me faudrait une bonne page, mais si vous voulez en entendre davantage ça sera avec plaisir autour d'une bonne... raclette ! Ce bureau a été THE bureau de l'ambiance et je ne doute pas que l'avenir sera assuré avec **Pedro Gomes**. Pedro je te souhaite bonne chance et bon courage pour ta thèse, en particulier en ce qui concerne supporter ta voisine !

Au-delà d'une équipe, c'est l'ensemble d'une unité de recherche chaleureuse dans laquelle j'ai évolué, tant au niveau des différentes équipes de recherche que du service de gestion administrative, de maintenance, d'entretien et de restauration... alors merci à tous du fond du cœur ! J'ai des remerciements tous particuliers pour des personnes avec qui j'ai passé beaucoup de temps et que je n'ai pas encore cité. **Yann Malaisé**, merci pour ta sympathie, ta pédagogie au début de ma thèse et tes fous rires légendaires. **Marie Beslay** et **Adèle Guillard**, vous représentez, avec la *dream team*, ce qu'il y a sûrement de plus beau au cours d'une thèse... la construction d'amitiés uniques forgées dans le fer et qui, je l'espère, persisteront longtemps. Merci également à **Laura Soler-Vasco**, **Chloé Terciolo** et **Manon Neves** pour votre sympathie et votre humour... les pauses cafés prenaient une tout autre dimension avec vous. J'ai une pensée toute particulière également pour la com'animation et les graines de Toxalim, pour lesquelles j'ai eu un investissement remarquable (d'après moi-même, une source très fiable). C'est formidable l'énergie que vous investissez pour la vie de l'unité et je suis heureux d'y avoir participé. Je remercie également les membres des plateformes TRIX, EZOP, ainsi que de la plateforme d'imagerie du site d'Auzeville pour leur accueil, leur encadrement et leur aide technique.

Communications scientifiques & Distinctions

Publications

Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives.

Gillois, K., Lévêque, M., Théodorou, V., Robert, H., Mercier-Bonin, M., 2018.

Microorganisms 6, 53.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms6020053>

Repeated exposure of Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX intestinal cell models to (nano)silver in vitro: Comparison of two commercially available colloidal silver products.

Gillois, K., Stoffels, C., Lévêque, M., Fourquaux, I., Blesson, J., Mils, V., Cambier, S., Vignard, J., Terrisse, H., Mirey, G., Audinot, J.-N., Théodorou, V., Ropers, M.-H., Robert, H., Mercier-Bonin, M., 2020.

Sci. Total Environ. 754, 142324.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142324>

Communications orales

Exposition à l'argent colloïdal sous forme nanoparticulaire : quels impacts sur la fonction barrière de l'intestin ?

Gillois, K., Ropers, M.-H., Lévêque, M., Terrisse, H., Théodorou, V., Robert, H., Mercier-Bonin, M.

*Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Toulouse, France
Mars 2019*

Repeated exposure of (nano)silver on *in vitro* human intestinal models: comparison of two commercially available colloidal silver products

Gillois, K., Stoffels, C., Lévêque, M., Fourquaux, I., Blesson, J., Mils, V., Cambier, S., Vignard, J., Terrisse, H., Mirey, G., Audinot, J.N., Théodorou, V., Ropers, M.-H., Robert, H., Mercier-Bonin M.,

*Soumis à EUROTOX 2020 (6-9 septembre 2020, Copenhague, Danemark) mais reporté à
Septembre 2021 en raison de la crise sanitaire COVID-19*

Communication affichée

Silver and food: what impact on gut epithelium, microbiota and mucus under physiological or psychological stress conditions?

Gillois, K., Ropers, M.-H., Lévêque, M., Théodorou, V., Robert, H., Mercier-Bonin, M.

EuroScience Open Forum (ESOF) 2018, Toulouse, France

Juillet 2018

Distinction

1st poster prize, student poster competition

Silver and food: what impact on gut epithelium, microbiota and mucus under physiological or psychological stress conditions?

Gillois, K., Ropers, M.-H., Lévêque, M., Théodorou, V., Robert, H., Mercier-Bonin, M.

EuroScience Open Forum (ESOF) 2018, Toulouse, France

Juillet 2018

Médiation Scientifique

Bénévole au sein de l'association *Pint of Science*

(organisateur événementiel)

2019 & 2020

Membre organisateur de l'atelier « **le fabuleux voyage dans l'intestin** »

Nuit européenne des chercheur.e.s (NEC), Toulouse,

2018 & 2019

Activités d'encadrement

Inès Sounni – L1 Science de la vie, Université Toulouse III Paul Sabatier

Stage d'une durée de 4 semaines

Juin 2018

Justine Blesson – 2nd année DUT Génie Biologique, IUT Paul Sabatier, Auch

Stage d'une durée de 10 semaines

Avril-Juin 2019

Sommaire

Avant-Propos.....	2
Remerciements	4
Communications scientifiques & Distinctions	6
Sommaire.....	8
Liste des abréviations	11
Liste des figures.....	13
Résumé	16
Abstract.....	18
Introduction bibliographique	19
Partie 1 - Nanomatériaux et nanoparticules d'argent.....	20
1. Généralités sur les nanomatériaux	20
1.1. Définition.....	20
1.2. Classification des nanomatériaux	20
1.3. Les nanoparticules métalliques	22
2. Les nanoparticules d'argent	26
2.1. Synthèse des nanoparticules d'argent	26
2.2. Les méthodes d'analyse et de caractérisation	27
2.3. Application des nanoparticules d'argent dans le secteur agro-alimentaire	36
2.4. Estimation de l'exposition humaine à l'argent : focus sur les nanoparticules d'argent	44
Partie 2 - Fonction digestive et barrière intestinale.....	47
1. Le processus de digestion	47
2. Les acteurs de la fonction barrière intestinale.....	48
2.1. L'épithélium intestinal.....	49

2.2. Le microbiote intestinal	57
2.3. Le mucus intestinal	61
3. Fragilisation de la barrière intestinale induite par le stress psychologique.	68
3.1. Généralités sur le stress.....	68
3.2. Effet du stress sur la fonction barrière intestinale chez l’Homme.....	69
3.3. Les modèles animaux de stress psychologique et leurs effets sur la fonction barrière intestinale.....	70
Partie 3 - Devenir et toxicité de l’argent nanoparticulaire et/ou ionique au cours d’une exposition orale	74
1. Le devenir de l’argent au cours d’une exposition orale	74
1.1. Conséquences de la digestion sur les propriétés de l’argent.....	74
1.2. Biodistribution de l’argent dans les tissus	77
2. Toxicité de l’argent sous sa forme nanoparticulaire et/ou ionique	80
2.1. Mécanismes de toxicité cellulaire.....	80
2.2. Toxicité <i>in vitro</i> de l’argent sur la fonction barrière intestinale	84
2.3. Toxicité <i>in vivo</i> de l’argent : impact sur la fonction barrière intestinale	89
Objectifs de la thèse.....	93
Résultats expérimentaux.....	96
Partie 1 Exposition répétée des modèles cellulaires intestinaux Caco-2 et Caco- 2/HT29-MTX au (nano)argent : comparaison de deux produits d'argent colloïdal disponibles dans le commerce	97
Partie 2 Exposition orale à l’argent colloïdal commercial Mesosilver™ ou AgC chez la souris mâle adulte : biodistribution de l’argent et conséquences sur la fonction barrière intestinale intègre ou fragilisée par un stress psychologique chronique	118
1. Introduction.....	118
2. Matériels et méthodes	120
2.1. Argent colloïdal	120
2.2. Animaux.....	120

2.3. Protocoles expérimentaux.....	121
2.4. ICP-MS	122
2.5. Cartographie en micro-fluorescence X et micro-absorption X.....	123
2.6. Spectroscopie proche infrarouge	125
2.7. Perméabilité intestinale <i>in vivo</i>	126
2.8. Concentration de la lipocaline-2 colique	127
2.9. Expression génique dans le jéjunum et le côlon	127
2.10. Epaisseur du mucus dans le côlon distal.....	130
2.11. O-glycosylation des mucines jéjunales et coliques.....	131
2.12. Composition du microbiote fécal.....	133
2.13. Analyses statistiques	134
3. Résultats et Discussion	135
3.1. Détermination de la biodistribution de l'argent lors d'une exposition orale sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC à forte dose	135
3.2. Mise en évidence par spectroscopie proche infrarouge des modifications organiques induites chez la souris par une exposition orale sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC à faible et forte doses	142
3.3. Effet d'une exposition orale sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC à faible dose sur la fonction barrière intestinale : rôle du stress psychologique chronique WAS	146
4. Conclusion	162
Discussion générale	163
Conclusion générale	183
Références bibliographiques	185
Annexe.....	223

Liste des abréviations

- μ XAS : *X-ray Absorption Spectroscopy*
- μ XRF : *X-ray fluorescence*
- ACP : *Analyse en Composantes Principales*
- ACTH : *Adreno CorticoTropic Hormone*
- Ag⁺ : *Ion argent*
- AgNP : *Nanoparticule d'argent*
- ANSES : *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*
- CRH : *Corticotropin Releasing Hormone*
- DLS : *Dynamic Light Scattering*
- DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DSS : *Dextran Sulfate Sodium salt*
- EDTA : *Acide éthylènediaminetétraacétique*
- EDX : *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*
- EFSA : *European Food Safety Authority*
- EPA : *Environmental Protection Agency*
- FD4 : *Fluorescéine isothiocyanate-dextran de poids moléculaire 4 kDa*
- FDA : *Food and Drug Administration*
- GalNAc : *N-acétylgalactosamine*
- HPA : *Hypothalamic–Pituitary–Adrenal (axis)*
- ICP : *Inductively Coupled Plasma*
- ICP-AES : *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy*
- ICP-MS : *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*
- JAM : *Junctional Adhesion Molecule*
- LCN-2 : *Lipocaline-2*
- LDH : *Lactate déshydrogénase*
- LPS : *Lipopolysaccharide*
- MET : *Microscopie Électronique à Transmission*
- MICI : *Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin*
- MLC : *Myosin Light-Chain*
- MLCK : *Myosin Light-Chain Kinase*

NM : Nanomatériau
OTU : *Operational Taxonomic Unit*
p.c. : Poids corporel
PVN : *Paraventricular Nucleus*
PVP : Poly-vinylpyrrolidone
ROS : *Reactive Oxygen Species*
RSS : *Repeated Restraint Stress*
SII : Syndrome de l'Intestin Irritable
SIMS : *Secondary Ion Mass Spectrometry*
SiNP : Nanoparticule de silice
SPR : *Surface Plasmon Resonance*
SRB : *Sulfate-Reducing Bacteria*
SSPT : Syndrome de Stress Post-Traumatique
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TEER : *Trans-Epithelial Electrical Resistance*
TiO₂ : Dioxyde de titane
UCMS : *Unpredictable Chronic Mild Stress*
UV-Vis : UltraViolet-visible (spectrométrie)
WAS : *Water Avoidance Stress*
XANES : *X-ray Absorption Near Edge Structure*
ZO : Zonula occludens

Liste des figures

Figure 1 : classification des nanomatériaux selon leur forme (Krug et Wick, 2011)..	21
Figure 2 : les différentes compositions des nanomatériaux (Peters et al., 2014)	22
Figure 3 : nombre de produits contenant des nanomatériaux sur le marché en fonction de leur composition. (Vance et al., 2015).....	22
Figure 4 : pourcentage de molécules en surface en fonction du diamètre des particules. (Oberdörster et al., 2005)	23
Figure 5 : domaines d'application des nanoparticules métalliques (les applications indiquées ne sont pas exhaustives). (D'après Iavicoli et al., 2018).....	24
Figure 6 : estimation de la production annuelle de différentes nanoparticules métalliques sur l'année 2015. (Adapté de Janković and Plata, 2019)	25
Figure 7 : nombre de produits contenant différentes nanoparticules métalliques et estimation de la production annuelle mondiale des nanoparticules d'argent jusqu'à l'année 2025. (Pulit-Prociak and Banach, 2016; Vance et al., 2015)	25
Figure 8 : image obtenue par MET de nanoparticules d'argent avec le spectre EDX associé. (Adapté de Pardha-Saradhi et al., 2014).....	28
Figure 9 : représentation schématique de la résonance de plasmon de surface.....	29
Figure 10 : image par MET et couleur et profil d'absorbance de nanoparticules d'argent en solution, présentant différentes formes et tailles. (Adapté de Cheon et al., 2019)	29
Figure 11 : principe de fonctionnement du système CytoViva™, couplant l'imagerie hyperspectrale à l'imagerie en champ sombre. (Ghaeli et al., 2017)	31
Figure 12 : nombre de produits contenant des nanomatériaux, et plus particulièrement des nanoparticules d'argent, dans le secteur agro-alimentaire sur le marché et en développement au cours de l'année 2014. (Peters et al., 2014).....	37
Figure 13 : exemples de confiseries enrobées d'argent et feuillet d'argent alimentaire	39
Figure 14 : images par MET de deux enrobages de confiseries composés de E174, dissous dans de l'eau distillée (Verleysen et al., 2015).....	39
Figure 15 : exemples de produits d'argent colloïdal disponibles sur une plateforme de e-commerce en France.....	41
Figure 16 : composition en argent de divers produits d'argent colloïdal commercialisés. (Cascio et al., 2015).....	42

Figure 17: paramètres généraux des différentes phases digestives. (D'après Guerra et al., 2012).....	48
Figure 18: structure de l'épithélium intestinal humain. (Adapté de DeSesso and Jacobson, (2001))	50
Figure 19 : structure des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales intestinales (Suzuki, 2013)	55
Figure 20 : répartition du microbiote bactérien le long du tractus digestif et de la lumière à la muqueuse intestinale chez l'Homme. (Donaldson et al., 2015)	58
Figure 21: organisation structurelle du mucus dans l'intestin grêle et le côlon (Johansson et Hansson, 2016).....	63
Figure 22 : les différentes étapes post-transcriptionnelles avant sécrétion du mucus et structuration du réseau de MUC2 formant les deux couches distinctes du mucus dans le côlon. (Adapté de Ijssennagger et al. (2016) et McGuckin et al. (2011)).....	65
Figure 23 : régulation de la réponse au stress par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. (Oakley and Cidlowski, 2013).....	69
Figure 24 : fonction barrière intestinale intègre et fragilisée par un stress psychologique chronique.....	73
Figure 25 : exemple d'une digestion artificielle de nanoparticules d'argent incluant les phases salivaire, gastrique et intestinale. (Kästner et al., 2017).....	75
Figure 26 : représentation schématique des mécanismes de toxicité induits par l'argent nanoparticulaire (AgNP) et/ou ionique (Ag ⁺) sur la cellule bactérienne et la cellule de mammifère.	80
Figure 27 : exemple de spectre MALDI des O-glycanes perméthylés issus des mucines intestinales purifiées. (Alquier-Bacquié, 2017).....	132
Figure 28 : suivi du poids, de la consommation alimentaire et de la prise hydrique des animaux ayant été exposés par la boisson au Mesosilver™ , à l'AgC ou à l'eau du robinet (contrôle) sur une durée de 28 jours	136
Figure 29 : concentration en argent, déterminée par ICP-MS, dans les organes, tissus et contenus intestinaux des souris exposées 28 jours au Mesosilver™ ou à l'AgC par la boisson.	137
Figure 30 : cartographie du foie et du contenu colique en micro- fluorescence X (μXRF).	140
Figure 31 : identification de la forme (Ag ⁺ /Ag ⁰) de l'argent dans le contenu colique après exposition au Mesosilver™ par analyse XANES.	141

Figure 32 : analyse en composantes principales des spectres obtenus par spectroscopie proche infrarouge sur les animaux contrôles, exposés au Mesosilver™ ou à l'AgC par la boisson (environ 3 mg/kg p.c./jour) ou par gavage (0,15 mg/kg p.c./jour) sur une durée totale de 28 jours.....	143
Figure 33 : suivi du poids, de la consommation alimentaire des animaux ayant été exposés au Mesosilver™ , à l'AgC ou à l'eau du robinet (contrôle) par gavage sur une durée de 28 jours.....	146
Figure 34 : effet du WAS sur la défécation des animaux.....	147
Figure 35 : effets d'une exposition orale sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur la perméabilité intestinale et sur le taux de lipocaline-2 (LCN-2).....	148
Figure 36 : effet d'une exposition sub-chronique d'une durée de 28 jours à 0,15 mg/kg p.c./jour de Mesosilver™ ou d'AgC sur l'expression d'ARNm dans le jéjunum.....	150
Figure 37 : effet d'une exposition sub-chronique d'une durée de 28 jours à 0,15 mg/kg p.c./jour de Mesosilver™ ou d'AgC sur l'expression d'ARNm dans le côlon.....	151
Figure 38 : effets d'une exposition sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur le mucus.....	153
Figure 39 : effets d'une exposition sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur la O-glycosylation des mucines dans le jéjunum et le côlon.....	155
Figure 40 : comparaison des effets du WAS entre notre étude et celle de Da Silva et al. (2014) sur la proportion des O-glycanes classés en fonction de leur masse (inférieure ou supérieure à 1000 Da).....	156
Figure 41 : effets d'une exposition sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur le microbiote bactérien fécal.....	160
Figure 42 : effets d'une exposition sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur le microbiote fongique fécal.....	161
Figure 43 : modèle de monoculture Caco-2 cultivée sur système Transwell inversé et exposée de façon répétée au Mesosilver™.....	176
Figure 44 : effet d'une exposition (10 jours) à la corticostérone via l'eau de boisson (35 µg/mL) sur la perméabilité intestinale.....	182

Résumé

L'argent colloïdal, défini comme une suspension de particules d'argent, majoritairement de taille nanométrique (<100 nm), dans un liquide, est une catégorie de produits disponibles dans le commerce et vendu pour les bienfaits annoncés pour la peau mais également pour une meilleure santé digestive. En effet, il est connu pour ses propriétés antimicrobiennes, spécifiques à l'argent sous forme de nanoparticules (AgNP) et/ou sous forme ionique (Ag⁺), via des mécanismes tels que la déstabilisation de la membrane cellulaire ou encore la production d'espèces réactives de l'oxygène. L'intérêt des nanoparticules réside dans les propriétés mécaniques, physico-chimiques ou biologiques uniques que leur confèrent leurs dimensions réduites. Toutefois, les dangers liés à l'usage de l'argent colloïdal pour l'organisme sont encore peu documentés et représentent une inquiétude croissante en santé publique.

Les données sur l'ingestion d'argent colloïdal et son impact sur la fonction barrière de l'intestin, première surface d'exposition par voie orale, sont manquantes. À ce jour, les études menées sur les effets de l'argent ionique (sous forme AgNO₃ principalement) ou nanoparticulaire (nanoparticules modèles synthétisées en conditions de laboratoire) sur l'épithélium, le mucus et le microbiote intestinal sont parcellaires, parfois contradictoires, et ne prennent pas en considération les interrelations entre ces différents acteurs. Par ailleurs, les études de la littérature ont systématiquement été réalisées en condition de fonction barrière de l'intestin intègre. Or, une condition de barrière fragilisée, provoquée notamment par un stress psychologique chronique, peut être retrouvée pour une partie de la population générale. Ces personnes peuvent être d'autant plus sensibles aux bénéfices santé annoncés sur le bien-être intestinal.

Nos travaux portent, pour la première fois, sur l'évaluation des conséquences d'une exposition répétée à deux produits d'argent colloïdal disponibles sur le marché à des doses « réalistes », tant sur des modèles cellulaires *in vitro* mimant l'épithélium intestinal (avec ou sans production de mucus), qu'*in vivo* lors d'une exposition orale sub-chronique de 28 jours chez la souris mâle adulte en condition de fonction barrière intestinale intègre ou fragilisée par l'induction d'un stress psychologique chronique. Une composition distincte entre les deux produits a été mise en évidence en termes de proportion entre les formes AgNP et Ag⁺, conduisant à des différences de toxicité observées à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces travaux montrent, pour la première fois, les effets sur la fonction barrière intestinale de produits

commercialisés et directement consommés par l'Homme au cours d'une exposition répétée, soulignant l'importance de considérer la composition exacte de ces produits et la nécessité de prendre en compte l'action conjointe du stress chimique et du stress psychologique.

Abstract

Colloidal silver is defined as a suspension of silver particles in a liquid, mostly in nanometric size (<100 nm). It can be found in various commercially available products sold for the advertised benefits for the skin but also for a better digestive health. Indeed, silver is well-known for its antimicrobial properties, in the form of nanoparticles (AgNPs) and/or ions (Ag⁺), via mechanisms such as the destabilization of the cell membrane or the production of reactive oxygen species. The interest of nanoparticles lies in their unique mechanical, physicochemical or biological properties, conferred by their nano-sized dimensions. However, the risks associated with the use of colloidal silver in human health are still poorly documented and represent a growing concern for the general population.

Data on the ingestion of colloidal silver and its impact on the intestinal barrier function, as the first orally exposed surface, are lacking. To date, studies on the effects of Ag⁺ (mainly AgNO₃) or AgNPs (model nanoparticles synthesized under laboratory conditions) on the epithelium, mucus and gut microbiota are sparse, sometimes contradictory, and do not take into account the interactions between these different protagonists of the gut barrier. Furthermore, studies in the literature have been carried out under conditions of intact gut barrier. However, an impaired intestinal barrier function, induced in particular by chronic psychological stress, may be a characteristic of a part of the general population. Such people may be all the more sensitive to the health benefits, and particularly gut health, claimed with the use of colloidal silver.

Our work focuses, for the first time, on the gut toxicity of two commercially available colloidal silver products after repeated oral exposure at “realistic” doses. We considered both *in vitro* cell models, mimicking the intestinal epithelium with or without mucus secretion, and *in vivo* models during a 28-day sub-chronic oral exposure in adult male mice characterized by an intact intestinal barrier function, or impaired by chronic psychological stress. A distinct composition between the two products was demonstrated in terms of the AgNPs/Ag⁺ proportion, leading to differences in toxicity observed both *in vitro* and *in vivo*. This work has shown for the first time the impact of colloidal silver products, available on the market and directly consumed by humans, on the intestinal barrier function during repeated exposure. It also underlines the importance of considering the exact composition of these products and the need to assess the combined effects of chemical and psychological stressors.

The background features abstract, overlapping geometric shapes in various shades of blue, creating a modern and dynamic visual effect. The shapes are primarily triangles and polygons, some with gradients, set against a white central area.

Introduction bibliographique

Partie 1 - Nanomatériaux et nanoparticules d'argent

1. Généralités sur les nanomatériaux

1.1. Définition

A l'heure actuelle, il n'existe pas de définition unique acceptée au niveau international pour les nanomatériaux (NM) (Boverhof et al., 2015). Dans le cadre d'une recommandation, la Commission Européenne a proposé en octobre 2011 la définition d'un NM comme étant « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm », précisant que « lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50 % fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil compris entre 1 % et 50 % ». De plus, la Commission Européenne intègre à cette définition tout matériau présentant « une surface spécifique en volume supérieure à $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ » (Potočnik, 2011). Outre-Atlantique, l'administration américaine *Food and Drug Administration* (FDA) définit également les NM comme « des matériaux qui ont au moins une dimension dans la plage d'environ 1 à 100 nm et qui présentent des propriétés dépendantes de la dimension » (FDA, 2011). Ainsi, les risques liés à l'utilisation des NM pour l'environnement et pour la santé humaine sont directement liés à leurs dimensions géométriques. Certaines propriétés spécifiques peuvent cependant apparaître pour des dimensions supérieures à 100 nm et, dans ce sens, l'administration britannique a porté la limite supérieure pour les NM à 200 nm (Haskel et al., 2010).

1.2. Classification des nanomatériaux

Les NM produits par l'Homme correspondent à une très grande diversité d'objets qui peuvent être classifiés en fonction de leur composition ou de leur forme.

1.2.1. Classification selon leur forme

La forme est un paramètre important pour la caractérisation des NM (Figure 1) :

- Les nanoparticules : ce terme désigne des nano-objets dont les trois dimensions se situent à l'échelle nanométrique et inclut des nanoparticules métalliques telles que l'argent (AgNP), le fer, le dioxyde de titane (TiO₂), etc.
- Les nanofibres et nanotubes : deux dimensions sont à l'échelle nanométrique et la troisième dimension est significativement supérieure à 100 nm (nanotubes de carbone, nanofibres de polyester, nanotubes de nitrure de bore, etc.).
- Les nano-feuillets : une dimension caractéristique de l'objet se situe à l'échelle nanométrique et les deux autres dimensions sont significativement supérieures à 100 nm (nano-feuillets d'argile, etc.)

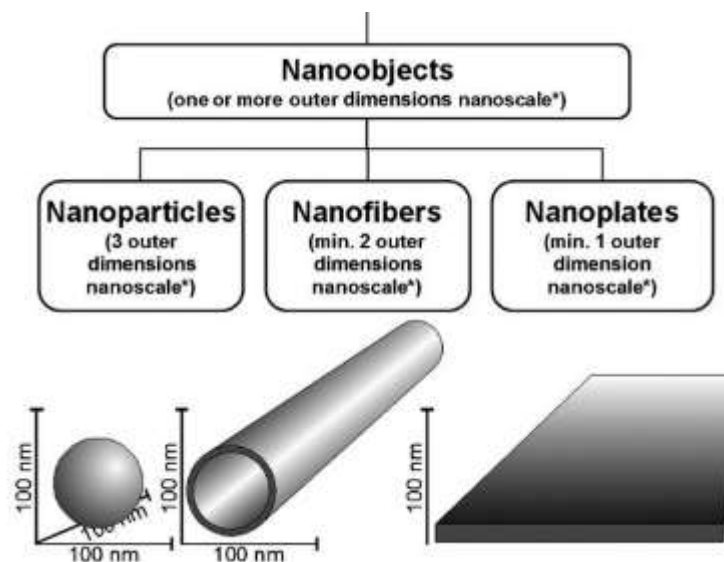


Figure 1 : classification des nanomatériaux selon leur forme (Krug et Wick, 2011)

1.2.2. Classification selon leur composition

Les NM peuvent également être classifiés en fonction de leur composition (Figure 2) :

- Les NM inorganiques : ils incluent les argiles, les NM carbonés (graphènes, fullerènes, nanotubes de carbone) et également les métaux tels que l'argent (Ag), l'or (Au) et les oxydes métalliques comme le dioxyde de titane (TiO₂) ou l'oxyde de zinc (ZnO).
- Les NM organiques : ils incluent l'ensemble des formes organiques telles que les micelles ou les liposomes. Ils peuvent être notamment utilisés en tant que vecteurs pour des principes actifs dans le secteur pharmaceutique et médical (Peters et al., 2011).

- Les NM combinés : ils correspondent principalement à des NM inorganiques dont la surface a été modifiée avec une matrice organique afin de favoriser, par exemple, la dispersion dans un milieu ou la biodisponibilité d'un principe actif (Kango et al., 2013).

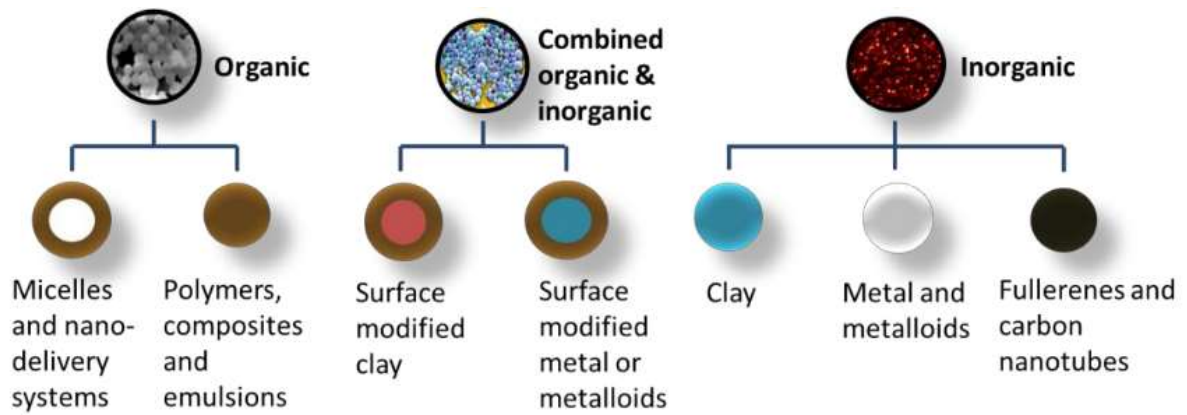


Figure 2 : les différentes compositions des nanomatériaux (Peters et al., 2014)

1.3. Les nanoparticules métalliques

Fin 2019, ce sont plus de 1800 produits manufacturés qui étaient répertoriés dans le *Nanotechnology Consumer Products Inventory*¹. Pour les produits manufacturés dont la composition est connue, les nanoparticules métalliques représenteraient la plus grande part des NM dans les produits disponibles sur le marché (Aitken et al., 2006; Vance et al., 2015) (Figure 3).

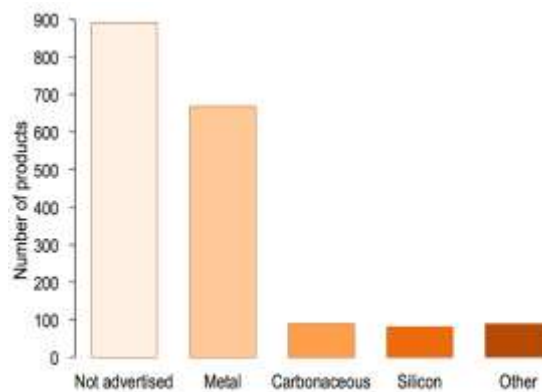


Figure 3 : nombre de produits contenant des nanomatériaux sur le marché en fonction de leur composition. (Vance et al., 2015)

¹ www.nanotechproject.org/consumerproducts, rapport consulté en décembre 2019

L'intérêt croissant porté aux nanoparticules métalliques réside dans les propriétés uniques conférées par leur taille. En effet, à la dimension nanométrique, l'augmentation du rapport surface/volume conduit à un nombre de molécules en surface plus important, modifiant leurs propriétés et leur réactivité (Figure 4). Ainsi l'or, inerte sous sa forme macrométrique, est un excellent conducteur électrique sous sa forme nanométrique (Huang et al., 2003). À cette dimension, les propriétés optiques sont modifiées ce qui confère, par exemple, la couleur blanche au TiO₂ (Chen and Mao, 2007). De plus, l'augmentation du nombre d'atomes en surface favorise les interactions avec l'environnement proche, donnant au cuivre, au zinc et plus particulièrement à l'argent des propriétés antibactériennes (Hajipour et al., 2012; Vidic, 2013).

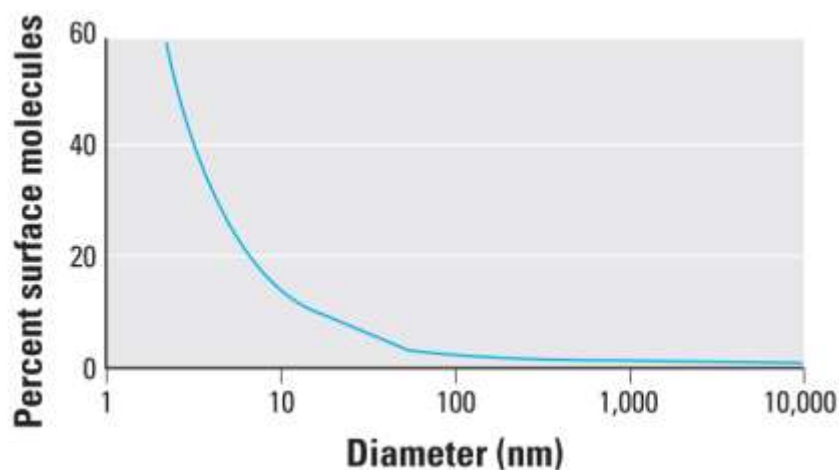


Figure 4 : pourcentage de molécules en surface en fonction du diamètre des particules. Le nombre de molécules en surface augmente de façon exponentielle lorsque le diamètre des particules diminue à moins de 100 nm, modifiant les propriétés physico-chimiques et biologiques de celles-ci. (Oberdörster et al., 2005)

Aujourd'hui, les applications des nanoparticules métalliques sont vastes et concernent de nombreux secteurs industriels tels que l'électronique, la construction, l'aéronautique, l'agroalimentaire ou la médecine (Figure 5).

Industrie automobile 	Applications : Catalyseur Additif pour carburant Peinture Construction	Aluminium Cuivre Platine Palladium
Secteur pharmaceutique 	Applications : Imagerie Traitement antibactérien Biocapteur / Biomarqueur Transport de principe actif Additif	Aluminium Cuivre Or Fer Argent Dioxyde de titane Oxyde de zinc
Industrie chimique 	Applications : Catalyseur Batterie Système de revêtement	Aluminium Cuivre Platine Fer Silice Argent
Secteur du bâtiment 	Applications : Isolation thermique Retardateur de flamme Peinture	Aluminium Cuivre Fer Dioxyde de titane Oxyde de zinc
Industrie cosmétique 	Applications : Crème solaire Shampooing Déodorant Dentifrice	Aluminium Cuivre Or Silice Fer Argent Dioxyde de titane Oxyde de zinc
Secteur de l'électronique 	Applications : Fibre optique Capteur Conduction électrique Puce semi-conductrice	Aluminium Cuivre Cobalt Or Fer Oxyde de zinc
Industrie du textile 	Applications : Textile pour sportifs Processus de fabrication	Argent Fer Silice Dioxyde de titane Oxyde de zinc Aluminium Cuivre
Industrie agro-alimentaire 	Applications : Emballage alimentaire Additif alimentaire Alimentation animale	Aluminium Cuivre Argent Dioxyde de titane Silice

Figure 5 : domaines d'application des nanoparticules métalliques (les applications indiquées ne sont pas exhaustives).
 (D'après Iavicoli et al., 2018)

Les nanoparticules métalliques de dioxyde de titane, dioxyde de silicium et oxyde de zinc représentent les productions les plus importantes dans le monde. À titre d'exemple, en 2015, la production de TiO_2 est estimée entre 60 000 et 150 000 tonnes (Janković and Plata, 2019; Pult-Prociak and Banach, 2016) (Figure 6). Avec une production annuelle plus faible, estimée entre 135 et 420 tonnes, les AgNP sont pourtant présentes dans une large gamme de produits sur le marché (Figure 7A), en particulier dans les secteurs médical et agro-alimentaire. De plus, les prévisions de production des AgNP jusqu'en 2025 indiquent une croissance mondiale continue, quel que soit le scénario envisagé (« pessimiste » ou « optimiste » ; Vance et al., 2015) (Figure 7B).

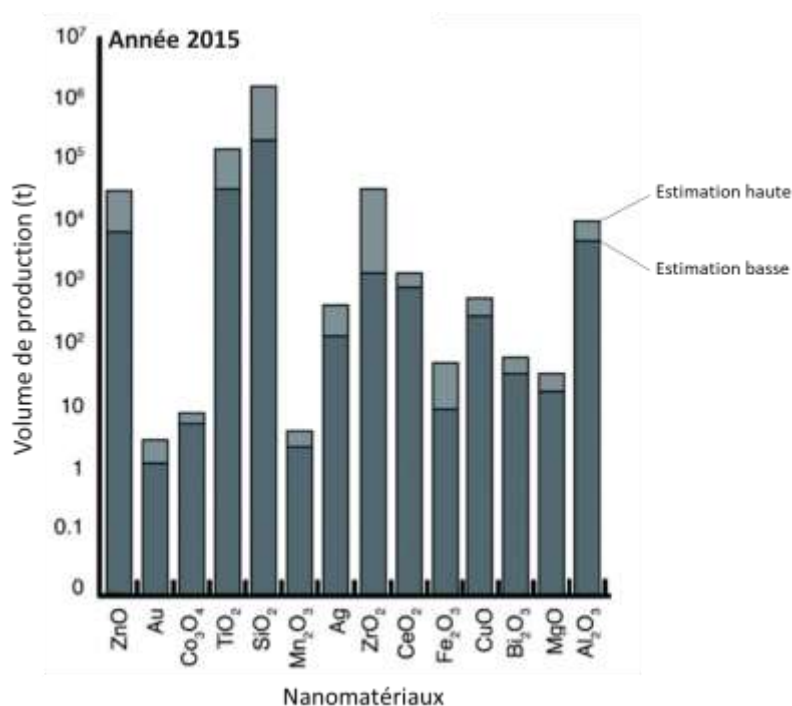


Figure 6 : estimation de la production annuelle de différentes nanoparticules métalliques sur l'année 2015. Les volumes de production sont indiqués en échelle logarithmique. (Adapté de Janković and Plata, 2019)

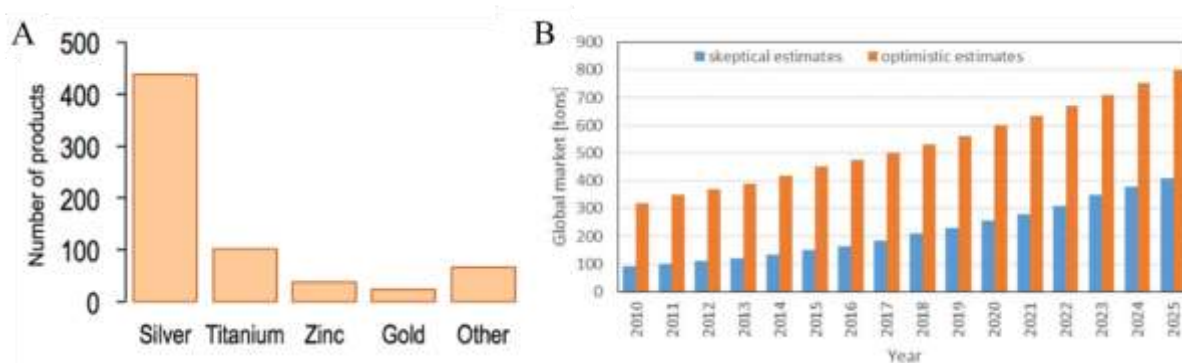


Figure 7 : nombre de produits contenant différentes nanoparticules métalliques (A) et estimation de la production annuelle mondiale des nanoparticules d'argent jusqu'à l'année 2025 (B). (Pult-Prociak and Banach, 2016; Vance et al., 2015)

2. Les nanoparticules d'argent

2.1. Synthèse des nanoparticules d'argent

Les AgNP peuvent être produites par diverses approches détaillées par Iravani et al. (2014). On distingue ainsi deux types d'approche : l'approche descendante (“top-down”) et l'approche ascendante (“bottom-up”).

2.1.1. *L'approche descendante*

L'approche dite « descendante » consiste à former des nanoparticules à partir des formes micro- ou macro-métriques principalement par action physique ou mécanique. La synthèse par action mécanique (formation de poudre par forte compression et/ou distorsion mécanique) est particulièrement utilisée en industrie pour les nanoparticules nécessitant d'importantes quantités à produire, comme pour le titane ou la silice, mais reste cependant très marginale dans la production des AgNP. Par ailleurs peu coûteuse, cette approche présente cependant le désavantage de former des nanoparticules dont la taille et la forme sont hétérogènes, pouvant directement affecter leurs propriétés. La synthèse des AgNP peut également être réalisée par ablation laser d'argent métallique en solution (Dolgaev et al., 2002; Mafuné et al., 2000).

2.1.2. *L'approche ascendante*

Les approches ascendantes sont plus diverses, faciles d'application et conduisent à une production de nanoparticules de taille mieux contrôlée. Les techniques les plus utilisées sont les synthèses par réduction chimique à partir de la forme ionique de l'argent (Ag^+). De nombreux catalyseurs chimiques, tels que le citrate de sodium ou le polyéthylène glycol (PEG), permettent ainsi la réduction des ions Ag^+ en argent métallique Ag^0 . Durant les premières phases, des amas d'argent métallique se forment à partir des ions Ag^+ en solution, et vont conduire par la suite à la formation d'AgNP dont la taille peut être finement régulée en fonction de la durée du traitement. Une étape de stabilisation des nanoparticules formées est souvent nécessaire afin de prévenir tout phénomène ultérieur d'agglomération ou d'oxydation. Le polyvinylpyrrolidone (PVP) et le PEG sont des agents de revêtement (« coating ») permettant de limiter les interactions entre les particules. Une autre méthode de stabilisation couramment utilisée consiste à créer des charges négatives à la surface des AgNP par l'ajout de citrate afin de provoquer des phénomènes de répulsion électrostatique entre les nanoparticules (Schubert

and Chanana, 2018). À la fin du processus de synthèse, les AgNP en solution peuvent, malgré les étapes de stabilisation, se présenter sous forme d'agglomérats ou, pour une certaine proportion, s'oxyder en argent ionique. De plus, la présence de particules de plus grande taille et d'autres éléments chimiques liés au processus de synthèse n'est pas à exclure (Bouwmeester et al., 2011; Cascio et al., 2015; Rogers et al., 2018). Afin de pallier aux risques de contaminations liés à l'utilisation de catalyseurs chimiques, des approches par synthèse biologique sont en fort développement. Elles reposent sur les capacités réductrices de certaines espèces bactériennes, de levures ou d'extraits végétaux capables de former des AgNP à partir d'une solution d'Ag⁺ (Rafique et al., 2017).

2.2. Les méthodes d'analyse et de caractérisation

L'essor des nanotechnologies a été permis par le développement de techniques permettant la caractérisation des nanomatériaux produits. Aujourd'hui, de nombreuses approches complémentaires sont mises en œuvre pour déterminer les caractéristiques principales des nanoparticules, telles que leur taille, leur forme ou encore leur composition. Nous allons maintenant présenter les principales techniques couramment utilisées pour la caractérisation des AgNP au cours de leur synthèse (sous forme de poudre ou en solution), mais également, du fait de leur importance dans le domaine de la nanotoxicologie, celles permettant la détection et la localisation des nanoparticules dans les cellules et tissus biologiques (Tableau 1).

2.2.1. *La microscopie électronique à transmission*

La microscopie électronique à transmission (MET) permet la détermination de la taille et de la forme des nanoparticules et son utilisation est quasi-systématique dans les études de la littérature en nanotoxicologie. Un microscope électronique repose sur les mêmes principes qu'un microscope optique, mais utilise un faisceau d'électrons au lieu de la lumière. La longueur d'onde plus faible du faisceau d'électrons, comparativement à un faisceau lumineux, permet d'obtenir une résolution très largement supérieure (>0,1 nm) (Smith, 2008). À la sortie du canon d'électrons, le faisceau est concentré par une première lentille dont l'ouverture restreint le faisceau à la zone d'observation de l'échantillon. En traversant l'échantillon coupé en sections très fines (de l'ordre de quelques dizaines à centaines de nanomètres), le faisceau d'électrons induit un rayonnement d'électrons, qui va être transmis par une série de lentilles magnétiques à un capteur fluorescent dont le signal est transformé en image optique.

Il est également possible de combiner la microscopie électronique avec une analyse chimique de l'échantillon par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (ou EDX, abréviation de l'anglais "*Energy Dispersive X-ray spectroscopy*"). Cette technique repose sur l'analyse des photons émis par l'échantillon lors de l'excitation par le faisceau d'électrons. En effet, les niveaux d'énergie émis dépendent des éléments chimiques composant l'échantillon. Un exemple obtenu avec des AgNP est présenté sur la Figure 8.

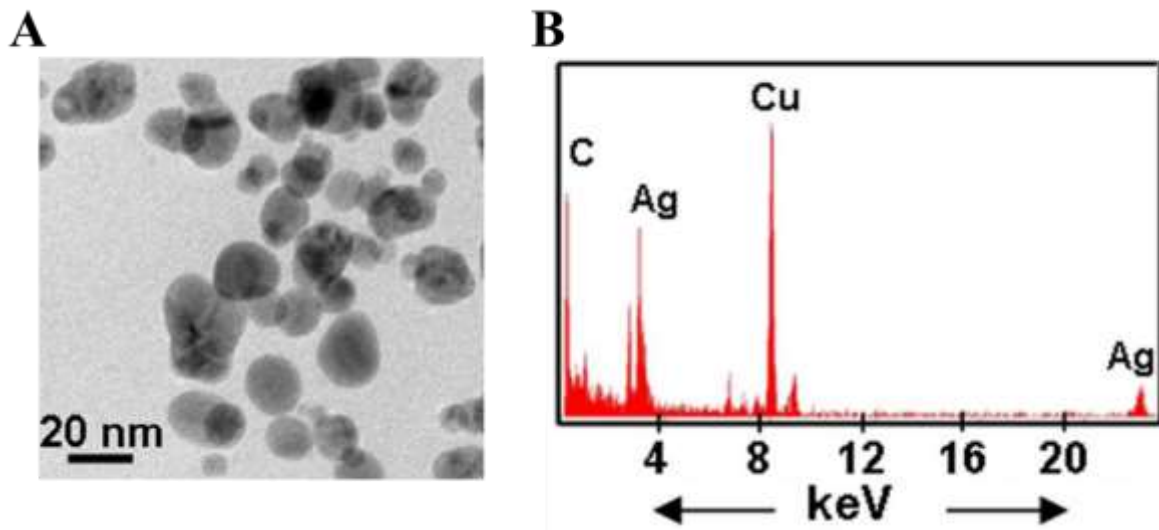


Figure 8 : image obtenue par MET de nanoparticules d'argent (A) avec le spectre EDX associé (B). La suspension contenant les nanoparticules d'argent a été déposée sur une grille en cuivre (d'où l'apparition du pic Cu sur le spectre EDX) et séchée avant observation.
(Adapté de Pardha-Saradhi et al., 2014)

2.2.2. La spectrométrie en UltraViolet-visible

La spectrométrie en UltraViolet-visible (UV-vis) est une approche simple, rapide et peu onéreuse à mettre en place pour la caractérisation des nanoparticules métalliques, telles que l'or et l'argent, en suspension. Aux dimensions nanométriques, des électrons libres oscillent autour des nanoparticules dans une bande dite de conduction. Lorsque la fréquence de la source lumineuse incidente correspond à la fréquence d'oscillation des électrons libres, un phénomène de résonance se produit, appelé résonance de plasmon de surface (ou SPR, abréviation de l'anglais "*Surface Plasmon Resonance*") (Figure 9). Ce phénomène se traduit par l'apparition d'une couleur dans la suspension contenant les nanoparticules, pouvant être mesurée par spectrophotométrie dans le domaine du visible. Cette couleur observable est dépendante de la taille, de la forme et de la composition des nanoparticules (Cheon et al., 2019; Jana et al., 2016) (Figure 10).

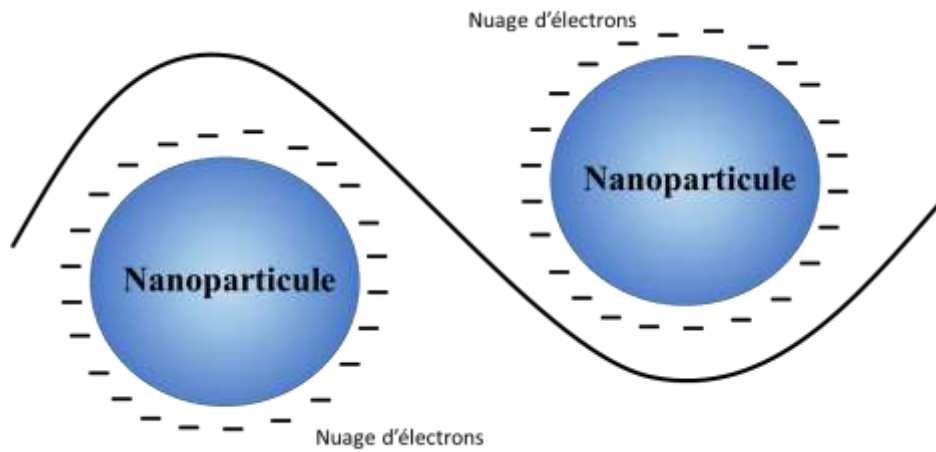


Figure 9 : représentation schématique de la résonance de plasmon de surface.

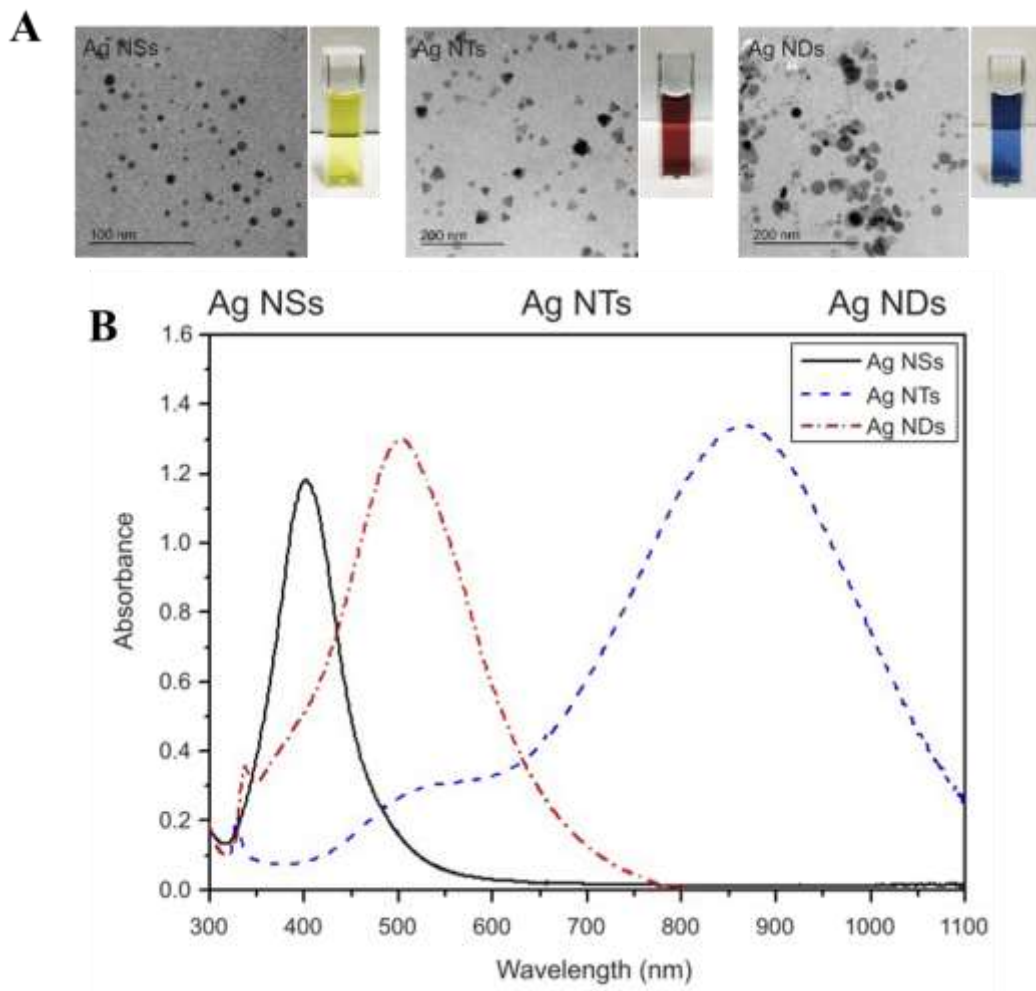


Figure 10 : image par MET et couleur (A) et profil d'absorbance (B) de nanoparticules d'argent en suspension, présentant différentes formes et tailles. AgNS : sphère ; AgNT : triangle ; AgND : disque. (Adapté de Cheon et al., 2019)

2.2.3. *La diffusion dynamique de la lumière*

La diffusion dynamique de la lumière (ou DLS, abréviation de l'anglais “*Dynamic Light Scattering*”) est une technique non destructive très répandue de par sa rapidité et sa simplicité d'utilisation. Elle permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules en suspension. La DLS repose sur le principe du mouvement Brownien par mesure du coefficient de diffusion, indicateur de la taille (Mainard and Jacob, 2016). Le mouvement Brownien correspond au déplacement aléatoire des particules qui sont soumises aux chocs avec les molécules en solution. Ces mouvements aléatoires sont détectés, sur un temps déterminé, par la diffusion de la lumière émise par un faisceau lumineux au contact de la particule. Plus la particule est petite, plus le mouvement Brownien est important. Le diamètre hydrodynamique de la particule prend en compte la présence d'une couche d'hydratation. La valeur du diamètre hydrodynamique obtenue par DLS est par conséquent supérieure à la taille réelle de la particule et dépendante des phénomènes d'agglomération s'opérant en solution. L'indice de polydispersité (PDI) donne une information sur la distribution en taille et il est communément admis qu'une valeur supérieure à 0,7 ne permet pas une analyse correcte des données obtenues en DLS, due à une hétérogénéité trop forte.

Les dispositifs peuvent être adaptés à la mesure de la mobilité électrophorétique des particules en solution (ELS, abréviation de l'anglais “*Electrophoretic Light Scattering*”), permettant de déterminer leur potentiel zêta. Ce dernier représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entourent quand elle est en solution (Bhattacharjee, 2016). Il est indicateur de la stabilité des particules en suspension, car il donne une information sur les forces électrostatiques attractives ou répulsives qui s'opèrent entre les particules. Lorsque le potentiel zêta tend vers zéro, les forces de répulsion diminuent, induisant des phénomènes d'agglomération des particules en solution (Pate and Safier, 2016).

2.2.4. *L'imagerie hyperspectrale en champ sombre : la technologie CytoViva™*

La technologie CytoViva™ repose sur le couplage de l'imagerie hyperspectrale avec l'imagerie en champ sombre (Figure 11). L'imagerie hyperspectrale est une technique non destructive permettant d'acquérir une signature spectrale, spécifique d'un élément, pour chaque pixel d'une image. En effet, elle combine l'imagerie et la spectroscopie en acquérant une image sur un grand nombre de bandes spectrales étroites afin d'obtenir une signature sur une large

gamme du spectre électromagnétique (400-1000 nm)². Contrairement à la microscopie dite en « champ clair », reposant sur l'analyse de la lumière transmise au travers d'un échantillon, la microscopie en champ sombre ne mesure que la lumière réfléchie par la matière. Cette mesure a pour avantage de limiter fortement l'apparition de bruit de fond et permet une plus grande résolution (Zamora-Perez et al., 2018). La combinaison de ces deux techniques d'imagerie permet d'obtenir une analyse spectrale d'échantillons à une forte résolution (>3 nm), plus particulièrement pour la détection de nano-éléments dans les tissus biologiques. A titre d'illustration, Mehennaoui et al. (2018) ont pu mettre en évidence la bioaccumulation et la répartition tissulaire des AgNP chez un crustacé (*Gammarus fossarum*).

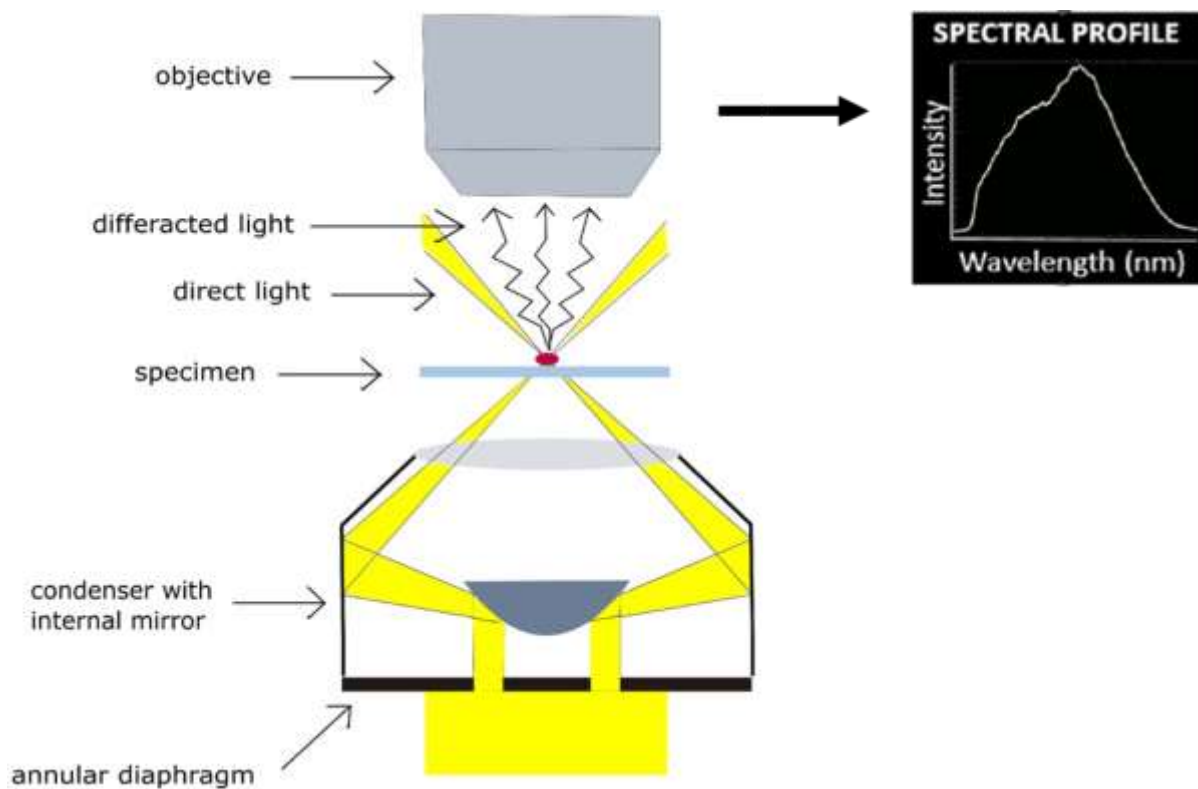


Figure 11 : principe de fonctionnement du système CytoViva™ couplant l'imagerie hyperspectrale à l'imagerie en champ sombre. (Ghaeli et al., 2017)

2.2.5. Les spectrométries à plasma à couplage inductif

Les spectrométries à plasma à couplage inductif (ou ICP, abréviation de l'anglais “Inductively Coupled Plasma”) regroupent différentes techniques reposant sur l'analyse

² <https://CytoViva™.com/products/hyperspectral-imaging-2/hyperspectral-imaging/>

chimique quantitative des éléments présents dans un échantillon (Mermet, 1999). Les limites de détection peuvent être très faibles (ng/L) en fonction de l'approche utilisée et de l'élément considéré (Evans Analytical, 2007). L'échantillon, préalablement dissous dans une solution acide, est injecté sous forme d'aérosol dans un plasma d'argon à très haute température (de l'ordre de 5000 K). L'échantillon ionisé peut être analysé par détection optique ou par spectrométrie de masse.

a) ICP-AES (ou ICP-OES)

La spectrométrie d'émission atomique - plasma à couplage inductif (ICP-AES, abréviation de l'anglais "*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy*"), également appelée spectrométrie d'émission optique - plasma à couplage inductif (ICP-OES, abréviation de l'anglais "*Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy*"), repose sur la détection optique des éléments ionisés. Pendant l'ionisation, chaque atome émet un photon dont l'énergie est dépendante de la nature de l'élément. Cette énergie émise sous forme de lumière, à différentes longueurs d'onde selon les éléments en présence, peut être analysée par l'intermédiaire d'un phototube (détecteur). L'intensité mesurée est proportionnelle à la concentration de l'élément considéré, la conversion s'effectuant grâce à l'utilisation de solutions étalon. Bien que généralement facile d'utilisation, cette approche présente, pour l'argent, des limites de détection relativement élevées, de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ (Evans Analytical, 2007).

b) ICP-MS

Dans la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS, abréviation de l'anglais "*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*"), les atomes ionisés de l'échantillon sont analysés dans un spectromètre de masse en mesurant leur rapport masse sur charge (m/z), rapport spécifique à chaque élément. Tout comme l'ICP-AES, l'intensité du pic mesurée est proportionnelle à la concentration de l'élément considéré, la conversion s'effectuant grâce aux solutions étalon. Cette technique est plus sensible que l'ICP-AES et permet de quantifier des concentrations plus faibles d'argent, de l'ordre du ng/L. L'ICP-MS est une technique particulièrement utilisée pour les études de biodistribution des AgNP après une exposition orale chez le modèle rongeur (Bergin et al., 2016; Juling et al., 2016; Loeschner et al., 2011; Park et al., 2011), ainsi que pour l'étude de l'absorption (Imai et al., 2017; Van der Zande et al., 2016; Vila et al., 2018) et de la translocation (Imai et al., 2017; Saez-Tenorio et

al., 2019; Vila et al., 2018; Williams et al., 2016) des AgNP sur des modèles d'épithélium *in vitro*.

2.2.6. *La spectrométrie de masse des ions secondaires*

La spectrométrie de masse des ions secondaires (ou SIMS, de l'abréviation "*Secondary Ion Mass Spectrometry*") est une analyse par spectrométrie de la composition des ions secondaires produits par pulvérisation ionique de la surface de l'échantillon. Ces ions secondaires sont accélérés vers un spectromètre de masse qui permet leur séparation en fonction de leur masse et de leur charge, spécifique de la nature de chaque élément. Différentes approches SIMS existent, reposant sur différentes sources d'ions primaires dont l'énergie est variable. L'instrumentation Nano-SIMS utilise un faisceau d'ions césium tandis que le HIM-SIMS (de l'anglais "*Helium Ion Microscope - Secondary Ion Mass Spectrometry*") utilise un faisceau d'ions hélium, ce dernier permettant d'atteindre une résolution proche du nanomètre (Dowsett et al., 2017). Cette technique permet de détecter de très faibles quantités d'éléments présents dans un échantillon biologique à partir de coupes, avec la limitation que cette technique est destructive. Les approches par Nano-SIMS et HIM-SIMS sont très récentes et dans le cadre des AgNP, l'instrumentation HIM-SIMS a été utilisée pour la caractérisation de différentes formes d'AgNP (Fizeşan et al., 2019) et l'instrumentation Nano-SIMS pour l'absorption des AgNP par l'algue verte *Raphidocelis subcapitata* (Sekine et al., 2017).

2.2.7. *La fluorescence X et la spectroscopie d'absorption X*

La fluorescence X (ou XRF, abréviation de l'anglais "*X-ray fluorescence*") est une technique permettant d'obtenir des informations sur la composition élémentaire d'un échantillon. En travaillant avec un faisceau de rayons X focalisé et en déplaçant l'échantillon par rapport au faisceau, des cartographies chimiques élémentaires de l'échantillon peuvent être enregistrées (micro-fluorescence X - μ XRF). Les informations obtenues permettent de déterminer la localisation et la co-localisation des éléments ainsi que leur abondance relative. Lorsque l'énergie d'un rayonnement X est équivalente à l'énergie de transition d'un électron depuis le cœur de l'atome vers un niveau du continuum, l'électron est éjecté de l'orbitale avec une énergie donnée et un seuil d'absorption E_0 est observé. Ces énergies de seuil sont spécifiques d'un élément donné. Les phénomènes de diffusion par les atomes voisins de l'électron éjecté entraînent des interférences pouvant être mesurées sur le spectre d'absorption et donner une information sur la nature de l'environnement de l'atome. L'utilisation du

rayonnement Synchrotron pour ces analyses apporte à la fois une très bonne sensibilité et une résolution spatiale élevée. De plus, une telle instrumentation offre la possibilité d'accorder l'énergie des rayons X d'excitation en fonction des éléments que l'on souhaite cartographier, ceci dans des échantillons très divers : sous vide ou sous flux de gaz, à différentes températures (cryostat, four), sous pression, en milieu aqueux, etc.

La cartographie en fluorescence X peut être combinée à la micro-spectroscopie d'absorption X afin d'obtenir des informations sur l'état d'oxydation et l'environnement d'un atome par les techniques de XANES ("*X-ray Absorption Near Edge Structure*") et EXAFS ("*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*"). Un spectre XANES peut permettre l'identification directe d'un composé ou d'un groupement chimique. La combinaison de ces deux approches a notamment été utilisée pour identifier la présence d'AgNP, dont une partie sous forme dissoute, dans les poumons après une exposition par voie respiratoire chez la souris (Smulders et al., 2015).

Tableau 1 : aperçu général des techniques analytiques applicables à la caractérisation des nanoparticules

Méthode	Abréviation	Résolution spatiale	Limite de détection	Avantages	Limites	Informations analysées
Microscopie électronique à transmission	MET	>0,1 nm		Haute résolution Réalizable sur tissu biologique Large surface analysable sur coupe de tissu	Préparation des échantillons Analyse sous vide Temps d'acquisition des images et des spectres élémentaires (avec EDX) élevé Coût relativement élevé	Taille Distribution en taille Forme État d'agglomération Composition élémentaire (en combinaison avec EDX)
Spectrométrie en UltraViolet-visible	UV-Vis			Rapide et facile Très faible coût Permet un suivi général d'une suspension de nanoparticules	Mesure indirecte Technique à faible sensibilité Réalizable uniquement en solution	Taille Concentration Forme État d'agglomération
Diffusion dynamique de la lumière / Diffusion électrophorétique de la lumière	DLS / ELS	>3 nm		Rapide et facile Faible coût Permet un suivi général d'une suspension de nanoparticules	En solution uniquement Peu robuste dans des échantillons avec une forte polydispersité en taille de (nano)particules	Taille hydrodynamique État d'agglomération Potentiel zêta (ELS)
Imagerie hyperspectrale en champ sombre	CytoViva™	>3 nm		Haute résolution Champ Large Détection globale rapide d'un élément d'intérêt	Préparation des échantillons Traitement des données	Taille Forme Composition élémentaire
Spectrométries à plasma à couplage inductif	ICP		µg/L (ICP-AES) ng/L (ICP-MS)	Analyse quantitative à haute sensibilité Préparation relativement rapide des échantillons	Pas d'information sur la taille ou la répartition entre formes nanoparticulaire et ionique	Composition élémentaire Concentration
Spectrométrie de masse des ions secondaires	SIMS	>0,5 nm (HIM-SIMS)		Analyse de la composition élémentaire à forte résolution	Préparation des échantillons Technique destructrice	Composition élémentaire Co-localisation
Fluorescence X	XRF			Permet de mesurer l'état d'oxydation des nanoparticules et la co-localisation avec d'autres éléments	Préparation des échantillons Temps de détection Traitement des données Coût élevé	Composition élémentaire Etat d'oxydation Interaction avec l'environnement proche
Spectroscopie d'absorption X	XAS					

2.3. Application des nanoparticules d'argent dans le secteur agro-alimentaire

Avant l'avènement des antibiotiques, l'argent a été couramment utilisé dans le milieu médical au début du 20^{ème} siècle pour ses propriétés antimicrobiennes sous la forme de sels d'argent. Il a été employé pour le traitement de différentes infections internes ou externes et ce ne sont pas moins de 18 sels d'argent qui étaient listés dans la Merck Index First Edition (1889) pour des applications médicales (Medici et al., 2019). Aujourd'hui son usage s'est diversifié au-delà du seul secteur médical et l'argent, notamment sous sa forme nanoparticulaire, est présent dans l'industrie agro-alimentaire dans différentes catégories de produits avec une ouverture potentielle à de nouveaux secteurs (Figure 12). Il est particulièrement utilisé dans la composition des matériaux au contact des denrées alimentaires. Ainsi, les AgNP peuvent être retrouvées dans la composition de films alimentaires, mais également sur le revêtement interne de contenants alimentaires (type boîte Tupperware) dans le but d'améliorer la conservation des aliments (Artiaga et al., 2015; Echevoyen et Nerín, 2013). Il est à noter également que les AgNP ont été testées dans les élevages de volailles (Pineda et al., 2012) et de cochons (Fondevila et al., 2009) en tant qu'alternative aux antibiotiques. Outre ces cas de figure, l'Homme peut être directement exposé à l'argent sous forme nanoparticulaire et/ou ionique par l'ingestion de l'additif alimentaire E174 ou par la consommation d'argent colloïdal, que nous allons aborder plus en détail ci-après.

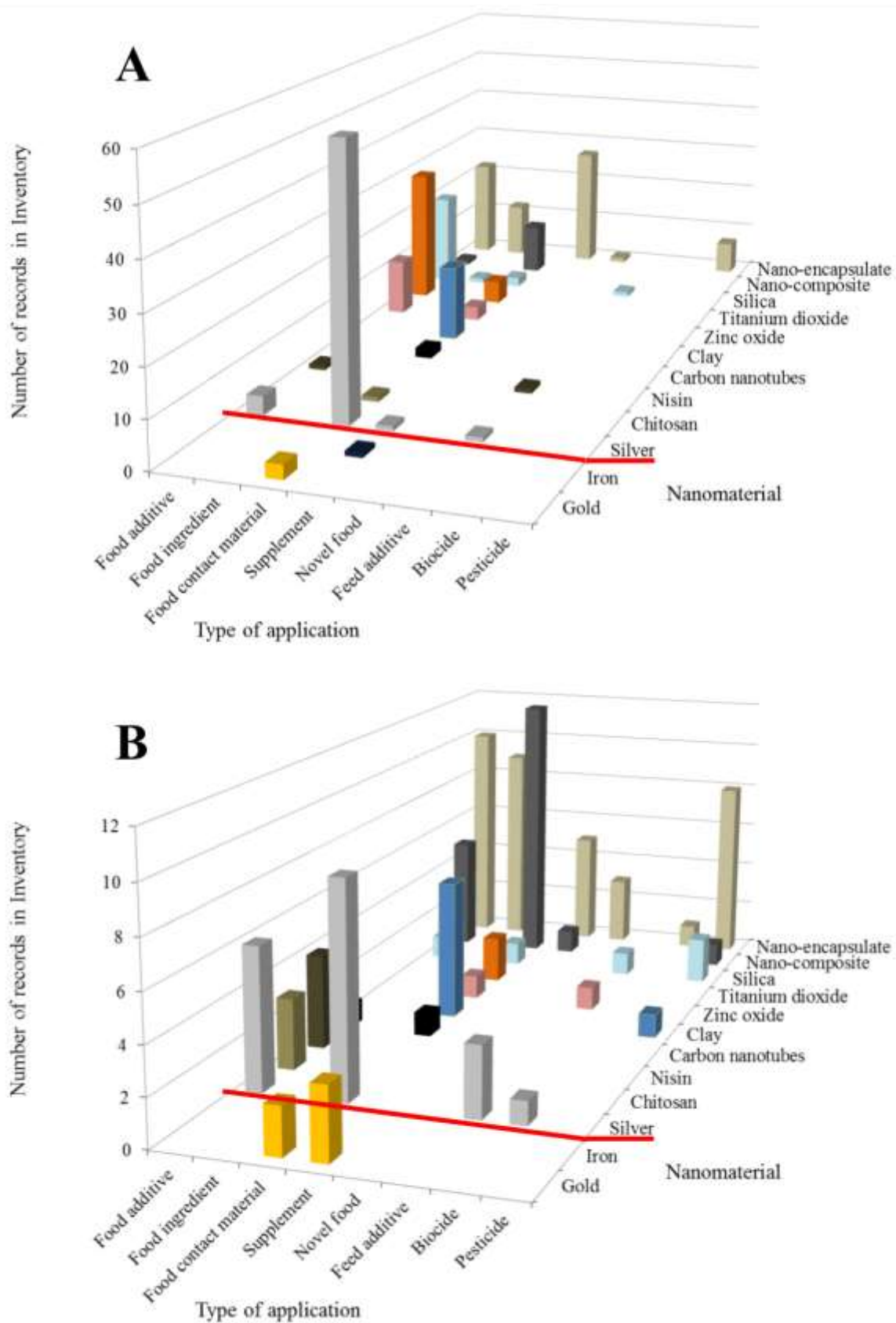


Figure 12 : nombre de produits contenant des nanomatériaux, et plus particulièrement des nanoparticules d'argent, dans le secteur agro-alimentaire sur le marché (A) et en développement (B) au cours de l'année 2014. (Peters et al., 2014)

2.3.1. L'additif alimentaire argent (E174)

Un additif alimentaire est défini comme « une substance qui n'est pas habituellement consommée comme un aliment ou utilisée comme un ingrédient dans l'alimentation. Ces composés sont ajoutés aux denrées dans un but technologique au stade de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement, du transport ou de l'entreposage des denrées et se retrouvent donc dans la composition du produit fini »³. Pour le produit alimentaire dans lequel il est ajouté, un additif alimentaire peut avoir différentes fonctions pour garantir sa conservation, sa stabilité ou encore améliorer son aspect visuel et gustatif.

Non autorisé aux États-Unis, l'argent est autorisé au sein de l'Union Européenne en tant qu'additif alimentaire sous l'appellation E174 (*Règlement n° 1333/2008 du Parlement Européen et du Conseil*). Il peut être utilisé *quantum satis* dans la confection d'enrobages de confiseries et chocolats ainsi que dans la confection de liqueurs⁴ (Figure 13). Ce terme réglementaire « *quantum satis* » indique que les quantités utilisées pour un produit sont décidées par l'industriel et il n'implique donc pas de limites d'utilisation. L'additif E174 se présente sous la forme de fins feuillets métalliques comme les feuillets d'or ; peu d'informations sur ses caractéristiques sont accessibles auprès des fournisseurs et des industriels. En particulier, il existe des lacunes importantes dans l'identification et la caractérisation chimique de l'additif E174 en termes de libération potentielle d'argent sous sa forme nanoparticulaire et/ou ionique (EFSA, 2016). L'étude de Verleysen et al. (2015) a fourni des premiers éléments de réponse, révélant la présence d'AgNP sphériques d'une dizaine de nanomètres après dissolution de billes enrobées de E174 dans l'eau (Figure 14). De tels résultats soulèvent le questionnement des effets de la digestion sur cet additif et les risques associés à sa consommation chez l'Homme.

³ <https://www.anses.fr/fr/content/le-point-sur-les-additifs-alimentaires>

⁴ https://webgate.ec.europa.eu/foods_system/main/index.cfm?event=substance.view&identifier=43

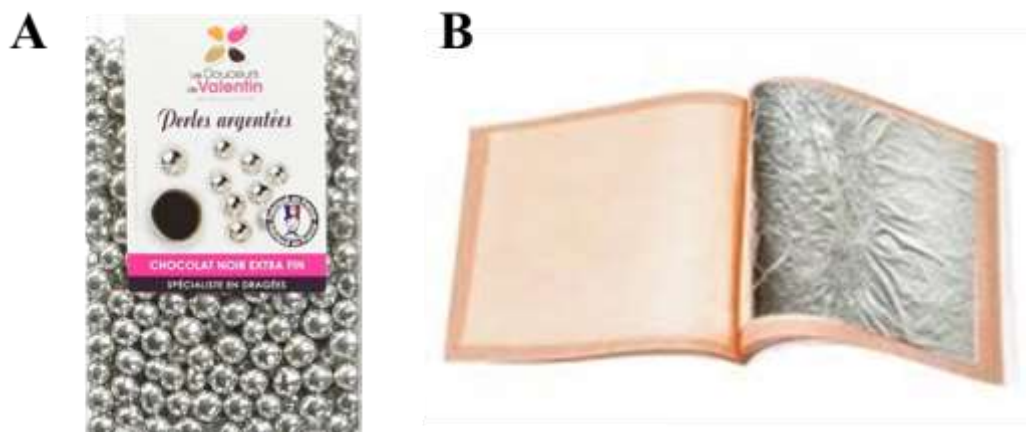


Figure 13 : exemples de confiseries enrobées d'argent (A) et feuillet d'argent alimentaire (B)

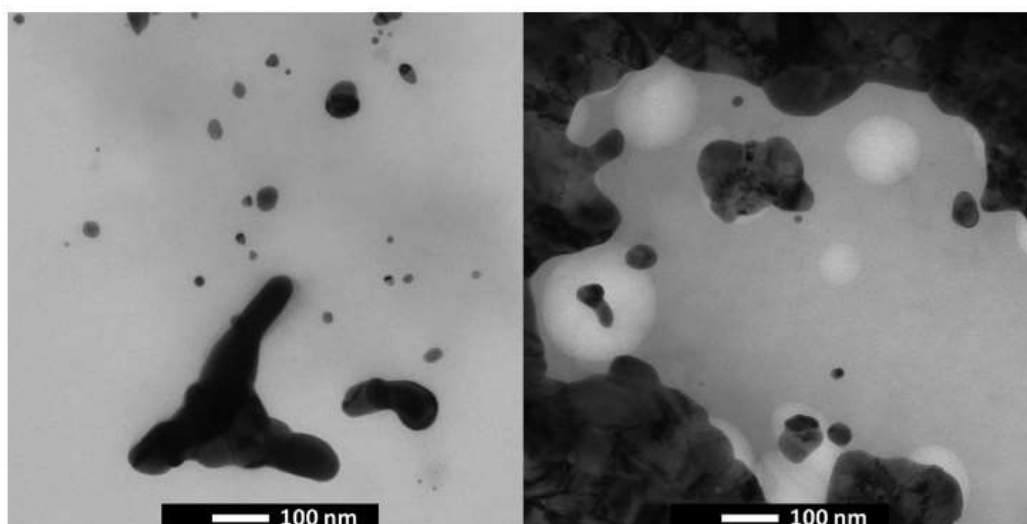


Figure 14 : images par MET de deux enrobages de confiseries composés de E174, dissous dans de l'eau distillée (Verleysen et al., 2015).

2.3.2. L'argent colloïdal

Par sa désignation de colloïde, l'argent colloïdal est par définition une suspension de particules d'argent en solution, communément de l'eau (FDA, 1999). Il est couramment utilisé en usage externe pour ses propriétés antimicrobiennes (notamment pour favoriser la cicatrisation de la peau) et il peut également être aujourd'hui consommé sous forme de complément alimentaire.

a) Les compléments alimentaires

Un complément alimentaire est défini par la Commission Européenne comme étant « une denrée alimentaire dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constitue une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant des effets nutritionnels ou physiologiques seuls ou combinés, [...] destinées à être prises en unités mesurées de faibles quantités » (Directive 2002/46/CE). Sous le terme « nutriment » sont considérés les vitamines, les minéraux, mais aussi d'autres substances ayant un effet nutritionnel. Contrairement aux médicaments, ces produits ne nécessitent pas d'autorisation de mise sur le marché ni d'évaluation préalable de la sécurité et de l'efficacité. L'industriel est seul responsable de la conformité des compléments alimentaires mis sur le marché, en accord avec les dispositions réglementaires en vigueur, tant en matière de sécurité que d'information du consommateur.

Il existe de nombreux compléments alimentaires visant à améliorer les apports nutritionnels des consommateurs afin de maintenir une bonne santé (produits minceur, améliorant la digestion ou encore renforçant le système immunitaire, etc.). La part de la population consommant des compléments alimentaires est en constante croissance chaque année, étant passée en France de 12 % à 19 % chez les enfants et de 20 % à 29 % chez les adultes entre 2006-2007 et 2014-2015 (ANSES INCA3, 2017). Cette augmentation est mondialisée, les estimations chiffrant le marché mondial à 230 milliards de dollars américains d'ici 2027 contre 108 milliards en 2015^{5,6}.

b) Réglementations et usages de l'argent colloïdal en tant que complément alimentaire

L'argent ne fait pas partie des minéraux essentiels pour l'Homme et ne figure plus en tant que minéral autorisé dans les compléments alimentaires au sein de l'Union Européenne (Directive 2002/46/CE). Ainsi il n'est plus autorisé sous le terme de complément alimentaire, mais il est toujours disponible sous le terme de cosmétique pour une application externe. Cependant, bien que difficilement estimable, la consommation par voie orale d'argent colloïdal est d'actualité, encouragée par différents médias grand public pour les bienfaits annoncés sur le renforcement du système immunitaire et par un conditionnement des produits favorisant la prise orale (spray pour la gorge, présence de verre doseur). Hors Union Européenne, la

⁵ https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-dietary-supplements-market_, consulté juillet 2020

⁶ https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/dietary-supplements-market.asp_, consulté juillet 2020

réglementation de certains pays, tels que le Canada⁷ et l’Australie⁸, est comparable à celle de l’Union Européenne, interdisant la prise orale d’argent colloïdal. Cependant, pour de nombreux pays à travers le monde, aucune réglementation spécifique ne semble s’appliquer. À titre d’exemple, les pays asiatiques présentent un fort développement de produits contenant des AgNP, potentiellement sous forme d’argent colloïdal (Sim et al., 2018). Aux États-Unis, l’argent colloïdal n’est pas interdit à la vente pour une consommation orale, bien que la FDA ne reconnaisse pas les produits associés comme sûrs et efficaces (FDA, 1999). Quelles que soient les réglementations appliquées aux différents pays, les plateformes de e-commerces permettent désormais un accès facilité à ces produits, l’offre accessible en France étant très diversifiée (Figure 15).



Figure 15 : exemples de produits d’argent colloïdal disponibles sur une plateforme de e-commerce en France.

c) Composition de l’argent colloïdal

Bien que le terme « colloïde » sous-entende la présence de particules, les produits vendus en tant qu’argent colloïdal peuvent présenter une grande variabilité dans leur composition. Différents paramètres sont à considérer dans la caractérisation de ces produits : la

⁷ <https://healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2019/70821a-eng.php>

⁸ <https://www.tga.gov.au/colloidal-silver-related-products>

concentration d'argent, la forme de l'argent présente (AgNP et/ou Ag⁺), la taille des AgNP (si présentes) et la présence d'autres composés (Cascio et al., 2015; De Leersnyder et al., 2020; Hagendorfer et al., 2012; Radwan et al., 2019; Reed et al., 2014; Rogers et al., 2018; Rong et al., 2018).

Il ressort de l'analyse de la large gamme de produits disponibles sur le marché une grande disparité entre la concentration réelle d'argent et celle annoncée par le fournisseur. À titre d'exemple, Cascio et al. (2015) ont mesuré une concentration en argent par ICP-MS de $2,19 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ dans un produit commercial d'argent colloïdal annonçant une concentration en argent de $20 \mu\text{g/mL}$ (Figure 16, Produit D). Inversement, ces mêmes auteurs ont mesuré une concentration en argent de $29,30 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ dans un produit également annoncé à $20 \mu\text{g/mL}$ (Figure 16, Produit C). L'étude ultérieure de Rogers et al. (2018) a fait le même constat d'un écart important entre les concentrations réelles et celles annoncées sur une sélection de 22 produits d'argent colloïdal disponibles sous forme de sprays. De plus, ces deux études mettent en évidence que la part que représentent les AgNP dans ces produits est très variable et leur présence n'est pas systématique, certains produits n'étant composés que d'Ag⁺ (Figure 16, Produits A et D). Lorsque des AgNP sont présentes dans les produits, leur taille (déterminée par MET) varie entre quelques nanomètres (2-5 nm) à plusieurs dizaines voire une centaine de nanomètres, mais ne dépassant généralement pas les 200 nm (Rogers et al., 2018). Ces nanoparticules forment généralement des agglomérats de plus grande taille pouvant atteindre 500 nm (mesurée par DLS) pour certains produits.

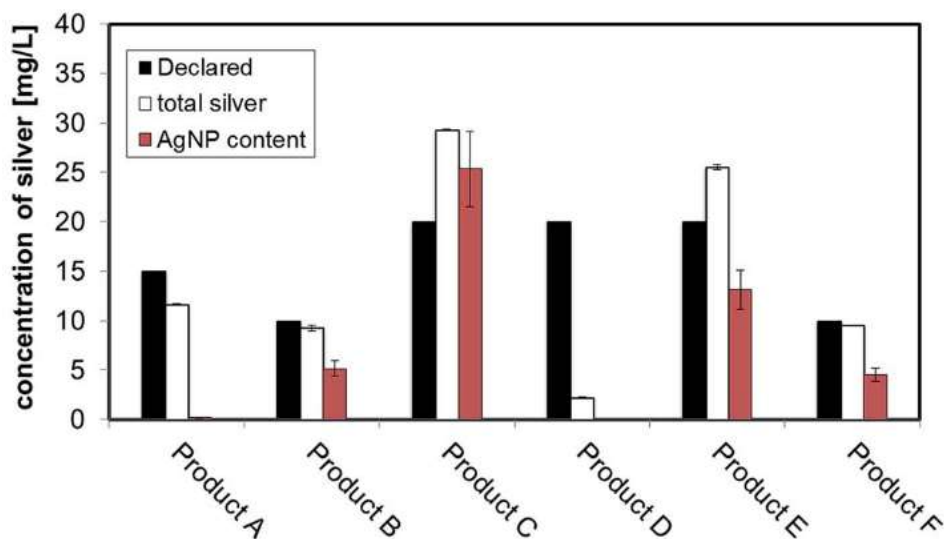


Figure 16 : composition en argent de divers produits d'argent colloïdal commercialisés. (Cascio et al., 2015)

Une caractérisation plus fine de ces produits montre par ailleurs l'existence de fortes variations de concentration totale en argent et de proportions en AgNP/Ag⁺ entre différents lots de certains produits d'argent colloïdal disponibles sur le marché (De Leersnyder et al., 2020). De plus, l'argent colloïdal peut également subir un processus de vieillissement au contact de l'air. Un processus d'oxydation des AgNP en Ag⁺, induit par l'acidification du milieu par le CO₂ ambiant et l'action oxydante de l'oxygène, peut être observé (Fujiwara et al., 2015). Ce processus modifie la taille des AgNP et le rapport AgNP/Ag⁺ au cours du temps (Izak-Nau et al., 2015; Kittler et al., 2010; Rong et al., 2018). Cette oxydation peut être également accélérée dans un milieu liquide riche en ions chlorure favorisant la formation d'AgCl (Rong et al., 2018).

A ce jour, l'argent colloïdal commercialisé le mieux caractérisé est le MesosilverTM, produit par Purest Colloids (États-Unis) (Farmen et al., 2012; Reed et al., 2014; Rong et al., 2018). L'ensemble des informations disponibles sur ce produit est résumé dans le Tableau 2. D'une concentration mesurée proche de celle annoncée par le fournisseur (20 µg/mL), le MesosilverTM est en grande partie composé d'AgNP de diamètre moyen compris entre 10 et 25 nm, la part d'argent ionique ne représentant qu'entre 10 et 20 % de la composition totale en argent, ces variations pouvant s'expliquer notamment par les différences dans les techniques de mesure utilisées (Tableau 2). La présence de carbone dans ce produit met en évidence l'existence probable d'un revêtement organique formé au cours de la synthèse, celui-ci n'ayant pas été identifié (Reed et al., 2014; Rong et al., 2018). De plus, d'autres éléments peuvent être retrouvés en faible quantité, tels que du cuivre, du calcium ou du tungstène, en fonction de l'étude considérée.

Tableau 2 : caractéristiques physico-chimiques du MesosilverTM (concentration annoncée de 20 µg/mL)

Concentration mesurée (µg/mL) ICP-MS	Diamètre moyen en nm (minimum-maximum) MET	Diamètre hydrodynamique moyen en nm DLS	Forme ionique (% argent total)	Potentiel zêta (mV)	Présence de composés organiques (revêtement ?)	Autres éléments	Référence
N.D	25,0 ± 0,4 (1-40 nm)	N.D	22% Mesuré avec une électrode spécifique des ions	N.D	Aucune détection de composé organique (chromatographie en phase gazeuse)	Tungstène (de l'ordre du ng/mL)	Farmen et al., 2012
21,3 ± 1,4	10,9 ± 4,5	1,46 ± 0,04	N.D	-7,93 ± 8,88 (pH 8,9)	Présence de carbone (3,1 µg/mL) Analyseur de carbone organique total Revêtement non défini	Aucune autre trace	Reed et al., 2014
21,7 ± 0,4	9,5 ± 5,0 (5-30 nm)	33,7 ± 4,1	10,6 % Mesuré par ICP-MS après filtration centrifuge avec diamètre de pore de 1-2 nm	-32 ± 2 (pH 6,8)	Présence de carbone (0,3 µg/mL) Analyseur de carbone organique total Revêtement non défini	Cuivre (20 ng/mL) Calcium (9,6 ng/mL)	Rong et al., 2018

N.D : Non Déterminé

2.4. Estimation de l'exposition humaine à l'argent : focus sur les nanoparticules d'argent

De par sa présence dans de nombreux produits manufacturés du quotidien, notamment l'argent colloïdal comme présenté précédemment, l'exposition à l'argent, et plus particulièrement sous sa forme nanoparticulaire (AgNP), peut s'effectuer selon trois voies majeures : l'inhalation, l'ingestion ou la voie cutanée (De Matteis, 2017; Ferdous and Nemmar, 2020).

2.4.1. Exposition cutanée

L'usage actuel de l'argent colloïdal par voie externe (secteur cosmétique, médecine naturelle) augmente les risques d'exposition cutanée aux AgNP. À lui-seul, le secteur cosmétique représenterait 20 % de l'utilisation des AgNP (Piccinno et al., 2012). De plus, le développement de textiles contenant des fibres d'argent augmente également ce risque. Certaines études ont montré que les AgNP peuvent pénétrer la barrière cutanée (Larese Filon et al., 2015). *In vitro*, Bianco et al. (2015) ont montré que des textiles composés d'argent pouvaient libérer des AgNP retrouvées par la suite dans l'épiderme et le derme. *In vivo*, l'étude de Samberg et al. (2010) a montré chez le porc que les AgNP (20-80 nm) pénètrent la couche cornée de la peau après 14 jours d'exposition par voie cutanée.

2.4.2. Exposition par inhalation

L'exposition aux AgNP par les voies respiratoires concerne principalement l'environnement industriel de production, l'argent sous forme nanoparticulaire pouvant être libéré au cours du processus de fabrication. Dans une usine de production d'AgNP, Park et al. (2009) ont montré qu'une partie des nanoparticules produites pouvaient être libérées dans l'atmosphère au cours des différentes étapes de production. Une étude similaire a dressé le même constat, avec une concentration atmosphérique pouvant atteindre $1,35 \mu\text{g d'AgNP/m}^3$. Chez des ouvriers ayant travaillé dans cet environnement pendant plusieurs années, l'argent a pu être détecté dans le sang à des concentrations variant de 0,014 à 0,034 $\mu\text{g/dL}$ (Lee et al., 2012). L'argent colloïdal, sous forme de spray désinfectant, peut être également source d'exposition par inhalation, avec des conséquences au niveau des poumons mais également sur la sphère intestinale (Rogers et al., 2020, 2018).

2.4.3. Exposition orale

De manière générale, peu d'informations sont disponibles sur les niveaux d'exposition par voie orale dans la population générale. En Italie, une exposition inférieure à 0,4 µg par jour (Clemente et al., 1977) avait été estimée tandis qu'une exposition de 7 µg et 27 µg par jour était rapportée au Canada et au Royaume-Uni, respectivement (Gibson and Scythes, 1984; Hamilton and Minski, 1973). Sur la base de ces études pionnières, cela correspondrait à une exposition de 0,1 à 0,39 µg/kg poids corporel (p.c.) par jour chez un individu de 70 kg, soit une exposition 10 fois inférieure à la dose orale de référence de 5 µg/kg p.c./jour qu'a fixée en 1991 l'agence de protection de l'environnement américaine (EPA, abréviation de l'anglais "*Environmental Protection Agency*") (EPA, 1991). Plus récemment en 2018, l'exposition à l'argent par voie alimentaire a été estimée au niveau français chez l'enfant de moins de 3 ans (Sirot et al., 2018), mais en l'absence de valeurs toxicologiques de référence robustes, les auteurs ont conclu à la difficulté de tirer des conclusions définitives quant aux risques associés. En 2016, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, abréviation de l'anglais "*European Food Safety Authority*") a évalué, à l'échelle européenne, les risques que pourrait représenter la consommation d'argent pour la population générale en réévaluant l'additif alimentaire E174 (EFSA, 2016). Il a été estimé que l'exposition à l'argent pourrait varier entre 1,6 et 3,5 µg/kg p.c./jour chez les enfants et entre 1,3 et 2,7 µg/kg p.c./jour chez les adultes. L'additif E174 représenterait à lui seul environ 30 % de toutes les sources possibles d'exposition orale à l'argent. Les autres sources, ne considérant pas l'argent colloïdal du fait de la réglementation européenne sur son interdiction en usage oral, sont liées à des expositions dites secondaires, en raison notamment de l'ingestion d'eau et de lait chez les enfants et de crustacés chez les adultes.

Comme évoqué précédemment, les AgNP sont également utilisées dans l'industrie agro-alimentaire dans certains emballages au contact des aliments afin de favoriser leur conservation. Différentes études ont rapporté un transfert de très faibles quantités d'argent nanoparticulaire et ionique aux aliments au cours de la vie du produit (Addo Ntim et al., 2019; Artiaga et al., 2015; Echegoyen and Nerín, 2013). Ainsi, en se basant sur une approche expérimentale par abrasion, mimant l'usure quotidienne (coupure, rayure, nettoyage), Addo Ntim et al. (2019) ont montré une libération d'argent du contenant vers le contenu, dont une partie sous forme de nanoparticules (<10 ng/dm²). La libération de faibles quantités d'argent nanoparticulaire ou ionique des produits de la vie courante concerne non seulement les contenants alimentaires, mais également les cosmétiques comme le dentifrice (Benn et al., 2010) et les jouets pour bébé (Ding et al., 2018).

Comme souligné par Van den Brule et al. (2016) et Chen et al. (2017), les estimations actuelles d'exposition orale de l'argent sont probablement sous-estimées, en particulier chez les individus consommant de l'argent colloïdal de façon régulière. Face à cette consommation, malgré les interdictions imposées par l'Union Européenne sur l'argent colloïdal en tant que complément alimentaire, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a rappelé en 2015 que l'argent ne devrait pas être utilisé pour la fabrication de compléments alimentaires et a recommandé de renforcer le contrôle de la distribution de ces produits et l'information aux consommateurs sur les risques associés (ANSES, Saisine n° 2011-SA -0224). Il est donc indispensable d'évaluer les effets d'une exposition orale chronique à ces produits d'argent colloïdal sur la santé humaine, en particulier sur la barrière digestive, première barrière physiologique rencontrée après leur ingestion.

Partie 2 - Fonction digestive et barrière intestinale

Principale surface d'échange avec l'environnement extérieur, le tractus digestif a pour principale fonction l'absorption des nutriments provenant de l'alimentation par le processus de digestion. D'une longueur estimée entre 5 à 9 mètres chez l'Homme adulte (Bloch, 1904), cette variabilité dépendant en grande partie des techniques de mesure employées (DeSesso and Jacobson, 2001), le tractus digestif est composé de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, du cæcum, du côlon et du rectum. L'intestin grêle se décompose en 3 segments qui, en partant de l'estomac, sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le côlon est également constitué de plusieurs compartiments : côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde. Directement exposée à l'environnement extérieur, la fonction barrière de l'intestin, permet de protéger l'organisme. Nous verrons dans le paragraphe 2 que cette fonction barrière de l'intestin implique différents acteurs étroitement connectés et que sa fragilisation, par le stress notamment, augmente le risque d'exposition à une variété de facteurs environnementaux (contaminants alimentaires, bactéries pathogènes, allergènes) et peut conduire au développement de pathologies.

1. Le processus de digestion

La digestion est un processus biologique complexe qui débute dès l'entrée du bol alimentaire dans la bouche. Les aliments sont exposés à des actions mécaniques, chimiques et enzymatiques au cours de leur transit dans le tube digestif (Figure 17). Dans la bouche, les aliments vont être broyés par mastication et une digestion enzymatique débute, notamment par la présence de l' α -amylase salivaire, dégradant l'amidon en mono- ou di-saccharides. Après déglutition, le bol alimentaire est transporté via l'œsophage jusqu'à l'estomac par péristaltisme.

Dans l'estomac, le pH varie fortement, étant proche de 1-3 à jeun et augmentant à 5-6 en présence du bol alimentaire (DeSesso and Jacobson, 2001; Ong et al., 1978). Ce pH acide est dû à la libération de Cl^- et de H^+ par les cellules pariétales, ce qui forme de l'acide chlorhydrique, celui-ci participant à la dénaturation des protéines ingérées. De plus, il assure l'activation du pepsinogène en pepsine, principale enzyme digestive gastrique. Une forte action mécanique s'opère également dans l'estomac, assurant une dégradation du bol alimentaire, qui est défini à ce stade par le terme de « chyme ». La vidange gastrique libère ainsi dans le duodénum des particules ne dépassant généralement pas une taille de 2 mm (Kong and Singh, 2008).

La phase intestinale de la digestion, débutant dans le duodénum, correspond à la phase principale d'absorption des nutriments formés au cours de la digestion. Les actions enzymatiques et mécaniques ayant eu lieu en amont, mais également au cours du transit dans l'intestin grêle, permettent la digestion du chyme en peptides, lipides et hydrates de carbone qui sont absorbés au niveau de l'épithélium intestinal. Les spécifications liées à l'épithélium intestinal sont détaillées dans la section 2.1 (p49). En aval de l'intestin grêle, le côlon assure principalement la réabsorption de l'eau avant défécation. La présence d'un réservoir important de micro-organismes commensaux participe à la métabolisation de composés non digestibles par l'hôte (voir section 2.2 p57).

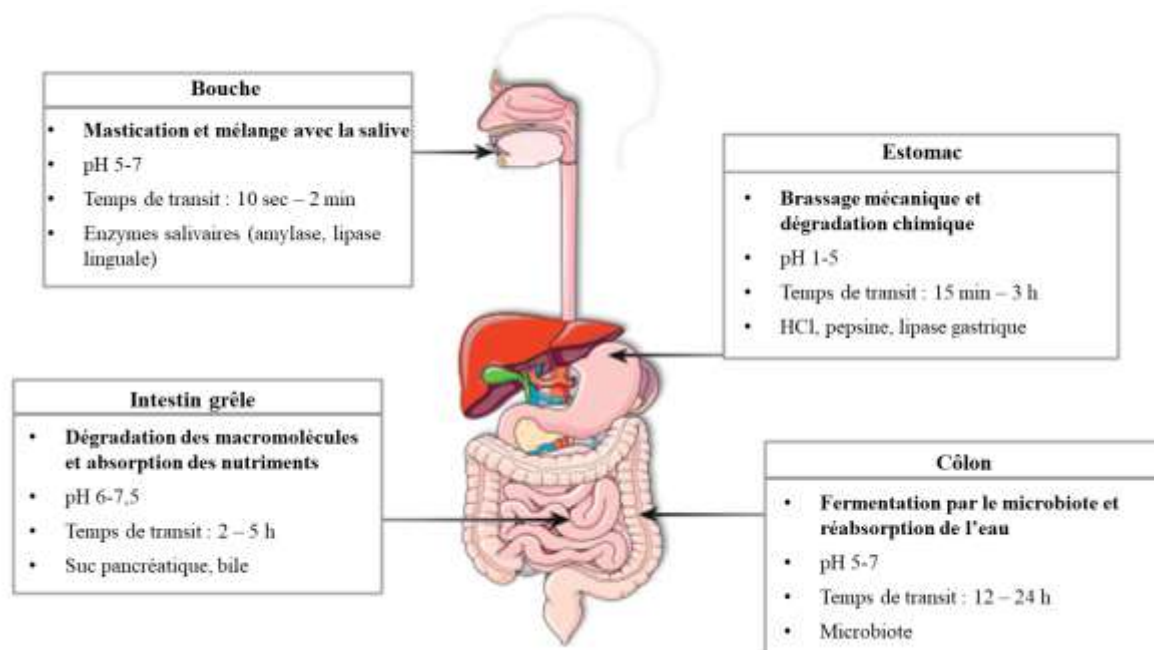


Figure 17: paramètres généraux des différentes phases digestives.
(D'après Guerra et al., 2012)

2. Les acteurs de la fonction barrière intestinale

La fonction barrière de l'intestin, assurant le rôle de protection de l'organisme face à l'environnement extérieur mais également de filtre sélectif, est assurée par le maintien d'un équilibre, sur son versant luminal (en ce sens la barrière immunitaire ne sera pas détaillée dans le présent mémoire), entre plusieurs acteurs interconnectés : l'épithélium intestinal, le

microbiote intestinal et le mucus qui les sépare. Ce dernier joue un rôle à la fois de protection de l'épithélium mais également de niche écologique pour le microbiote intestinal.

2.1. L'épithélium intestinal

La paroi intestinale est composée de la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. Du côté luminal de la muqueuse est présente la première barrière cellulaire de l'hôte, l'épithélium, formant une ligne de défense, mais aussi d'échange avec la lumière intestinale ; des différences structurelles et fonctionnelles distinguent l'intestin grêle et le côlon.

2.1.1. *Epithélium de l'intestin grêle et du côlon*

L'intestin grêle a pour fonction principale l'absorption des nutriments et présente de ce fait une large surface d'échange. Chez l'Homme, la muqueuse forme des replis augmentant sa surface d'échange avec la lumière intestinale (Figure 18 A). De plus, l'épithélium intestinal est structuré en longues villosités (Figure 18 B) ; les cellules le composant présentent elles-mêmes des microvillosités (Figure 18 C), observables notamment par microscopie électronique. Chez la souris, modèle utilisé dans notre étude, les plis de la muqueuse ne sont pas présents et les villosités sont d'une longueur plus importante que celle retrouvée chez l'Homme (Nguyen et al., 2015). Longtemps estimée autour de 300 m² (Niess et Reinecker, 2006), la surface d'échange totale de l'intestin avec la lumière intestinale chez l'Homme serait en réalité plus proche de 30 m² (Helander et Fändriks, 2014). En comparaison avec l'intestin grêle, le côlon présente une surface d'échange plus faible, ne présentant pas de longues villosités, mais un diamètre luminal plus élevé. Cette morphologie favorise la fermentation du chyme par le microbiote intestinal, ainsi que la réabsorption de l'eau et des produits issus du métabolisme du microbiote.

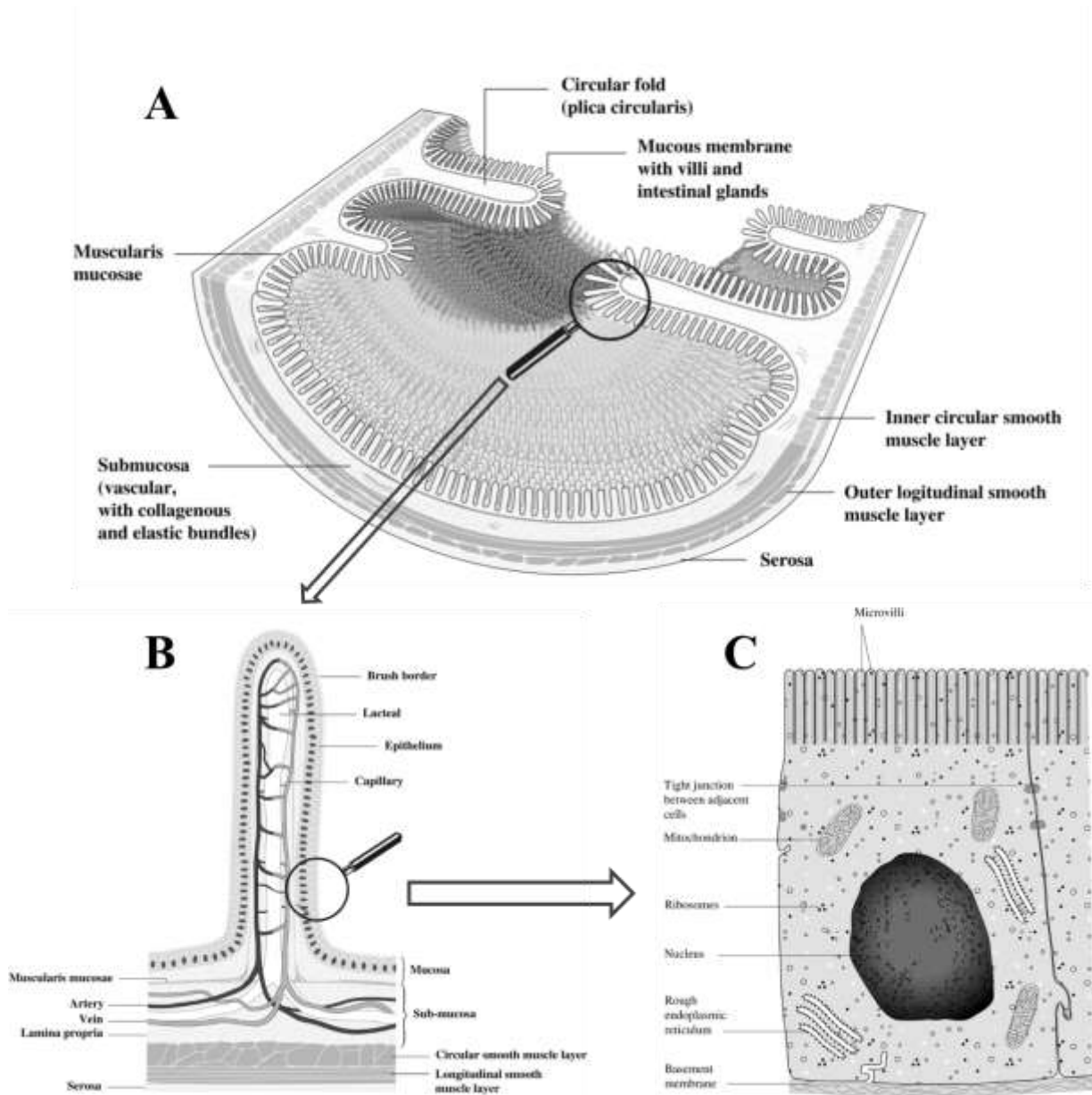


Figure 18: structure de l'épithélium intestinal humain. (A) L'intestin est structuré en différentes tuniques comprenant la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse. La formation de repliements augmente la surface d'échange. (B) Au niveau de la muqueuse, les projections (villosités) sont composées en grande partie de cellules absorbantes (C), dont la surface apicale présente de nombreuses projections microscopiques (microvillosités) qui donnent l'apparence d'une « bordure en brosse » augmentant considérablement la surface absorbante.

(Adapté de DeSesso and Jacobson, (2001))

Différents types cellulaires principaux, détaillés ci-dessous et dont la répartition et les fonctions varient en fonction de leur localisation au niveau de l'intestin grêle et du côlon, composent l'épithélium intestinal. D'autres sous-populations en très faibles proportions existent, l'ensemble des cellules spécialisées de cet épithélium intestinal étant renouvelées tous les 3 à 5 jours. Les cellules souches multipotentes, localisées dans le fond des cryptes à la base

des villosités, assurent ce renouvellement. Il est également important de rappeler l'existence du système immunitaire entérique, présent dans la *lamina propria* et qui contribue au maintien de l'homéostasie intestinale en assurant une défense active contre les pathogènes, ceci n'étant pas abordé plus en détail dans le présent manuscrit.

Les cellules absorbantes

Appelées entérocytes dans l'intestin grêle et colonocytes dans le côlon, elles constituent les cellules les plus abondantes de l'épithélium intestinal ($\approx 80\%$). Elles assurent les propriétés de barrière physique de l'épithélium ainsi que les propriétés absorptives de celui-ci. Ces cellules sont polarisées et présentent du côté luminal (apical) des prolongements membranaires, les microvillosités, qui forment la « bordure en brosse » (Figure 18C). Les microvillosités sont recouvertes de glycoprotéines constituant le glycocalyx. De nombreuses enzymes (lactases, sucrases, peptidases, lipases, phosphatases alcalines, etc.) sont présentes au niveau des microvillosités, plus particulièrement pour les entérocytes, participant au processus de digestion. Des transporteurs transmembranaires permettent le passage sélectif des nutriments qui rejoindront la circulation sanguine.

Les colonocytes présentent des différences métaboliques avec les entérocytes (Devriese et al., 2017; Engle et al., 1998). Ils possèdent moins d'enzymes digestives au niveau de leur surface, mais en contrepartie une plus grande capacité de réabsorption de l'eau. De plus, il existe des différences au niveau des transporteurs. À titre d'illustration, les colonocytes expriment plus le transporteur de monocarboxylate (MCT1) (Gill et al., 2005), impliqué notamment dans l'absorption des acides gras à chaîne courte qui représentent une importante source d'énergie pour la cellule (Scheppach, 1994).

Les cellules caliciformes

Également appelées cellules à mucus ou à gobelet, les cellules caliciformes assurent la production du mucus (voir section 2.3, p61). Leur proportion varie le long du tractus digestif, représentant environ 4, 6, 12 et 16 % des cellules épithéliales dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon distal, respectivement (Robert et al., 2017). Ces cellules, plus abondantes dans la partie supérieure des cryptes, sont caractérisées par la présence de granules de mucines, situés sous la membrane apicale et qui sont déchargés par exocytose au niveau de la surface épithéliale.

Les cellules de Paneth

Uniquement présentes dans l'intestin grêle, au fond des cryptes, elles assurent la production de peptides antimicrobiens tels que les α -défensines et le lysozyme (Dupont et al., 2015). Ces peptides sécrétés dans la lumière participent au maintien de l'homéostasie intestinale en régulant la population bactérienne à proximité directe de l'épithélium.

Les cellules M

Les cellules M (*Microfold cells*) jouent un rôle important dans l'homéostasie de la sphère digestive. Principalement retrouvées dans les plaques de Peyer dans l'intestin grêle et dans une moindre mesure dispersées le long de l'épithélium intestinal, elles assurent la capture des antigènes luminaux pour présentation au système immunitaire entérique afin de maintenir une « immuno-surveillance » (Mabbott et al., 2013).

Les cellules entéro-endocrines

Les cellules entéro-endocrines représentent environ 1 % des cellules de l'épithélium intestinal et elles sont plus présentes dans l'intestin grêle comparativement au côlon. Elles produisent des hormones (entérogucagon, somatostatine, substance P, sérotonine et polypeptide intestinal vasoactif) qui interviennent par voies endocrine, paracrine et autocrine dans la régulation de la motricité et des sécrétions digestives (Gribble and Reimann, 2019).

Les cellules Tuft

Les cellules Tuft sont présentes en très faible proportion (0,4 %) et assurent la production d'opioïdes impliqués dans la modulation de l'immunité et de la sensibilité viscérale (Gerbe et al., 2012).

2.1.2. Les modèles cellulaires épithéliaux

Afin d'étudier les propriétés de barrière mais également d'absorption des cellules épithéliales intestinales lorsqu'elles sont exposées à divers composés (pharmacologiques, contaminants, allergènes, etc.), différents modèles cellulaires ont été développés *in vitro*, le plus largement utilisé étant la lignée cellulaire épithéliale humaine Caco-2.

Isolées à partir d'un adénocarcinome colorectal humain, les cellules Caco-2 représentent un modèle d'entérocytes par leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles exprimées

après différenciation. Après avoir atteint la confluence, ces cellules se différencient spontanément sur une période comprise entre 14 et 21 jours (Hidalgo et al., 1989). Une fois différenciées, les cellules Caco-2 forment une monocouche de cellules polarisées avec un pôle basolatéral et un pôle apical, ce dernier présentant une bordure en brosse avec des microvillosités caractéristiques des entérocytes humains (De Lourdes Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989). Également isolées d'un adénocarcinome colorectal humain, les cellules HT29 sont couramment utilisées et plus particulièrement le clone HT29-MTX pour sa faculté à produire du mucus. Initialement isolées par leur capacité de résistance à l'anticancéreux méthotrexate (MTX) (Lesuffleur et al., 1990), les cellules HT29-MTX se différencient spontanément en cellules caliciformes productrices de mucus (Lesuffleur et al., 1993; Leteurtre et al., 2004).

La combinaison des lignées cellulaires Caco-2 et HT29-MTX, en coculture jusqu'à complète différenciation, permet d'obtenir un système composé de cellules épithéliales absorbatives et de cellules caliciformes. Différents ratios d'ensemencement entre les cellules Caco-2 et HT29-MTX ont été proposés dans la littérature ; celui de 90 % de cellules Caco-2 et 10 % de cellules HT29-MTX s'est révélé le plus proche des conditions physiologiques, tant au niveau de la répartition cellulaire que des paramètres de perméabilité épithéliale (Chen et al., 2010; Pan et al., 2015).

D'autres modèles *in vitro*, parfois plus complexes, existent également. Il peut être cité le modèle associant des cellules Caco-2, HT29-MTX et Raji-B, ces dernières présentant les caractéristiques des cellules M (Lozoya-Agullo et al., 2017). Il peut également être cité des modèles de culture 3D tels que les organoïdes (Augustyniak et al., 2019) ou d'autres modèles disponibles commercialement en conditions statiques (EpiOral, EpiGingival, etc. ; Pind'áková et al., 2017) ou microfluidiques (Intestine-Chip ; Grassart et al., 2019) ayant pour objectif de s'approcher au mieux des conditions physiologiques humaines.

2.1.3. *Perméabilité de l'épithélium intestinal*

Par sa fonction de barrière permissive à l'eau, électrolytes et nutriments, mais non permissive aux agents exogènes potentiellement dangereux pour l'hôte (bactéries, allergènes, contaminants alimentaires, nanoparticules...), l'épithélium intestinal doit maintenir une intégrité physique finement régulée par différents mécanismes complémentaires : diffusion

passive entre les cellules (perméabilité para-cellulaire) et transport actif ou passif à travers les cellules (perméabilité trans-cellulaire).

a) Perméabilité para-cellulaire

Les cellules intestinales sont polarisées avec un pôle apical du côté luminal et un pôle basolatéral du côté muqueux. Cette polarité est assurée par un réseau complexe de jonctions cellulaires, composées des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes (Laukoetter et al., 2006; Suzuki, 2013) (Figure 19). Les jonctions adhérentes et les desmosomes assurent la cohésion intercellulaire et la résistance mécanique de l'épithélium (Baum and Georgiou, 2011). Les jonctions serrées sont, quant à elles, des complexes protéiques assurant l'ouverture de l'espace intercellulaire et jouent un rôle direct dans la régulation de la perméabilité para-cellulaire. Différentes protéines transmembranaires, les claudines, l'occludine et les JAM (abréviation de l'anglais "*Junctional Adhesion Molecule*") sont impliquées dans la formation des jonctions serrées. Leurs domaines extracellulaires interagissent avec ceux exprimés par la cellule voisine, permettant la formation d'une liaison intercellulaire. Leurs domaines intracellulaires interagissent avec des protéines cytosoliques, telles que les zonula occludens (ZO), qui sont également reliées à l'anneau périjonctionnel d'actino-myosine. Ces interconnexions entre protéines des jonctions serrées et cytosquelette d'actino-myosine permettent la régulation de l'ouverture des jonctions serrées, notamment sous contrôle de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (ou MLC, abréviation de l'anglais "*Myosin Light-Chain*") par la kinase MLCK (Bueno, 2010).

La perméabilité para-cellulaire n'est pas équivalente le long du tractus digestif, étant plus faible dans le côlon que dans l'intestin grêle (Markov et al., 2010). En condition physiologique, l'espacement pour le passage para-cellulaire dans l'intestin grêle a été estimé entre 0,3 et 0,6 nm au sommet des villosités, de 1 à 1,5 nm à leur base et entre 5 et 6 nm dans le fond des cryptes (Arrieta et al., 2006; Fihn et al., 2000). Cette voie para-cellulaire permet alors le passage de l'eau, des ions et des petites molécules (<600 Da) par diffusion passive (Ménard et al., 2010). Ce seuil de 600 Da est cependant régulièrement discuté, une étude au laboratoire ayant notamment montré que la translocation de nanoparticules de TiO₂, d'une taille minimale de 20 nm, s'effectue en grande partie par la voie para-cellulaire, sans qu'aucune altération de l'épithélium ou de la perméabilité n'ait été observée (Coméra et al., 2020).

De façon générale, en condition physiopathologique, due à l'induction d'une inflammation ou d'un stress, les jonctions cellulaires peuvent être altérées et permettre un passage accru et non spécifique de composés de grande taille (voir section 3, p68).

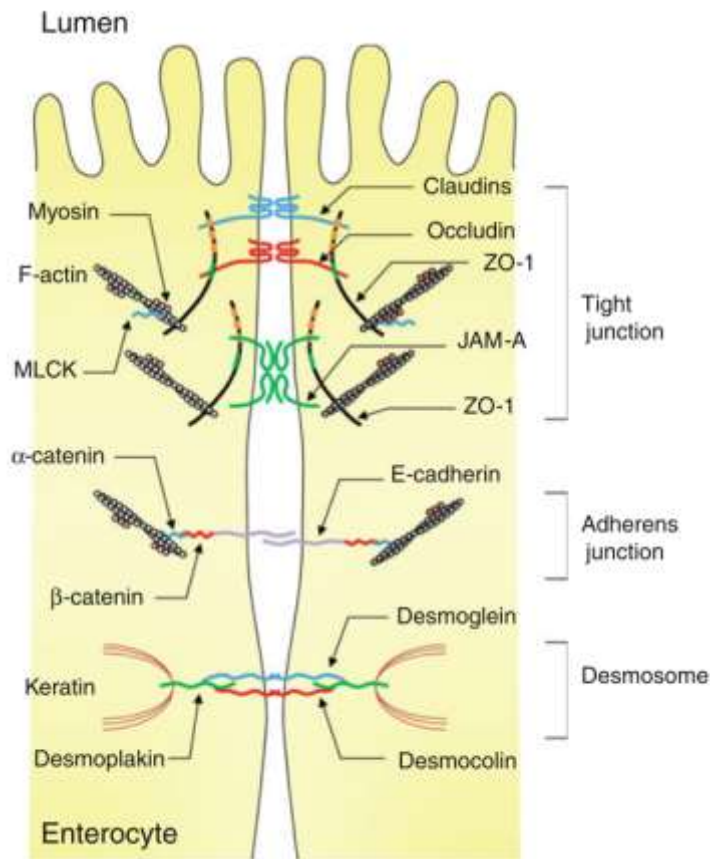


Figure 19 : structure des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales intestinales (Suzuki, 2013)

b) Perméabilité trans-cellulaire

La perméabilité trans-cellulaire permet le passage de composés de grande taille au travers de la cellule épithéliale intestinale. Leur entrée peut s'effectuer au niveau apical des cellules par endocytose avant d'être transportés par transcytose à travers la cellule jusqu'au compartiment basolatéral (Ménard et al., 2010). Initialement mis en évidence chez le rat (Warshaw et al., 1971), ce mécanisme a été également décrit chez l'Homme (Heyman et al., 1988). Dans l'intestin, le passage trans-cellulaire est un mécanisme principalement présent dans les cellules M, mais les entérocytes sont également capables d'effectuer ce transport. Pour la grande majorité des molécules, celles-ci sont partiellement ou totalement dégradées dans les lysosomes et seulement une partie (<10 %) est retrouvée intacte dans le compartiment basolatéral (Hershberg and Mayer, 2000).

c) Mesure de la perméabilité intestinale

La mesure de la perméabilité intestinale est essentielle, notamment pour mettre en évidence une fragilisation de la barrière, généralement considérée comme un facteur important dans le développement de pathologies digestives telles que le syndrome de l'intestin irritable (SII; Camilleri and Gorman, 2007), les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Michielan and D'Inca, 2015) ou encore les allergies alimentaires (Samadi et al., 2018). Différentes approches permettent de mesurer la perméabilité intestinale en distinguant les voies para- et trans-cellulaires (Galipeau and Verdu, 2016).

La mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (ou TEER, abréviation de l'anglais "*Trans-Epithelial Electrical Resistance*") évalue le flux ionique à travers l'épithélium par mesure de la différence de potentiel entre le pôle apical et le pôle basolatéral. Donnant une indication sur la perméabilité para-cellulaire, elle peut être facilement mise en place *in vitro* en culture sur insert, mais également *ex vivo* en chambre de Ussing.

In vitro et *ex vivo*, différentes molécules peuvent être également ajoutées dans le compartiment apical, leur passage dans le compartiment basolatéral étant évalué sur un temps défini. Il peut être ainsi déterminé une perméabilité apparente, correspondant à la quantité d'une molécule cible ayant traversé une surface épithéliale donnée et dans un temps déterminé, qui est dépendante de la concentration initialement injectée. La taille et les propriétés de la molécule utilisée déterminent la voie de passage étudiée. Ainsi, le ^{51}Cr -EDTA (339 Da), le mannitol (182 Da), l'isothiocyanate de fluorescéine (ou FITC, abréviation de l'anglais "*Fluorescein IsoThioCyanate*"; 389 Da) et la fluorescéine (ou FSS, abréviation de l'anglais "*Fluorescein Sodium Salt*"; 332 Da) sont des molécules couramment utilisées pour évaluer la perméabilité para-cellulaire. La HRP (*HorseRadish Peroxidase*, 44 kDa) et le FITC-dextran (70 kDa) peuvent être utilisés pour mesurer la perméabilité trans-cellulaire. Il est à noter que, pour l'évaluation de la perméabilité *in vivo*, le FITC-dextran 4 kDa (ou FD4) est la molécule la plus courante, donnant une information sur la perméabilité intestinale globale. Le principe repose sur l'administration par gavage du marqueur fluorescent FD4 (ou radiomarqué du type ^{51}Cr -EDTA) puis la mesure de sa concentration plasmatique après un temps déterminé, variable en fonction du composé et de l'espèce animale considérés.

2.2. Le microbiote intestinal

Dès la naissance, le tractus digestif est colonisé par de nombreux micro-organismes, définis sous le terme générique de microbiote. Ce dernier est représenté non seulement par les bactéries, mais également par les champignons, les virus, les archées et les protozoaires. Lors des phases de primo-colonisation, la composition du microbiote peut varier en fonction d'une naissance par voie basse ou par césarienne, pouvant avoir des conséquences sur la composition de celui-ci à l'âge adulte (Adlerberth and Wold, 2009; Jakobsson et al., 2014). Les premières années de l'enfance, estimées au 3 premières années ou plus récemment aux 12 premières années de la vie, sont déterminantes dans la mise en place du microbiote qui sera présent tout au long de la vie de l'individu (Derrien et al., 2019; Robertson et al., 2019). Bien que la présence d'un microbiote intestinal ne soit pas strictement indispensable à la survie de l'individu, des animaux axéniques pouvant être élevés en laboratoire, celui-ci assure de nombreuses fonctions physiologiques bénéfiques que nous allons détailler pour le microbiote bactérien, mais également pour le microbiote fongique, qui a également été une cible d'intérêt pour mon travail de thèse du fait de l'effet antimicrobien large spectre de l'argent.

2.2.1. Le microbiote bactérien

La population bactérienne du microbiote intestinal a été estimée entre 10^{13} et 10^{14} (représentant 90 % du microbiote) chez l'Homme, soit un ratio de 10:1 par rapport au nombre de cellules humaines (Berg, 1996; Bianconi et al., 2013), même si un réajustement à un ratio de 1:1 a été plus récemment proposé (Sender et al., 2016). La très grande diversité du microbiote bactérien humain est illustrée par la présence de plus de 1000 espèces (dans les selles de 124 individus), représentant entre 3 et 9 millions de gènes (Qin et al., 2010; Yang et al., 2009) et assurant un apport de fonctions importantes pour la santé de l'individu. Le microbiote bactérien est composé de 6 phyla dont les plus représentés sont les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* (90 % du microbiote bactérien) ainsi que les *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* et *Verrucomicrobia* (Eckburg et al., 2005; Qin et al., 2010). Le microbiote bactérien n'est pas homogène le long du tractus digestif (Figure 20) (Donaldson et al., 2015). Le nombre de bactéries est en effet croissant des parties proximales vers celles plus distales, passant de 10^1 bactéries par gramme dans l'œsophage à 10^{11} bactéries/gramme dans le côlon distal (Donaldson et al., 2015). Ces variations, en nombre mais également en composition, sont dépendantes des conditions environnementales, telles que l'oxygénation, le pH ou encore la présence de peptides antimicrobiens sécrétés par l'hôte. À titre d'exemple, l'intestin grêle présente un taux d'oxygène

plus élevé que le côlon, favorisant ainsi des espèces anaérobies facultatives tolérant également les acides biliaires et la forte production de peptides antimicrobiens (Figure 20A). De plus, pour une région du tractus donnée, la composition diffère entre la lumière intestinale et la muqueuse (Figure 20B). Tandis que les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium* et *Lactobacillus* sont prédominants dans la lumière intestinale, les familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* sont principalement retrouvées au niveau de la muqueuse (Donaldson et al., 2015; Swidsinski et al., 2005).

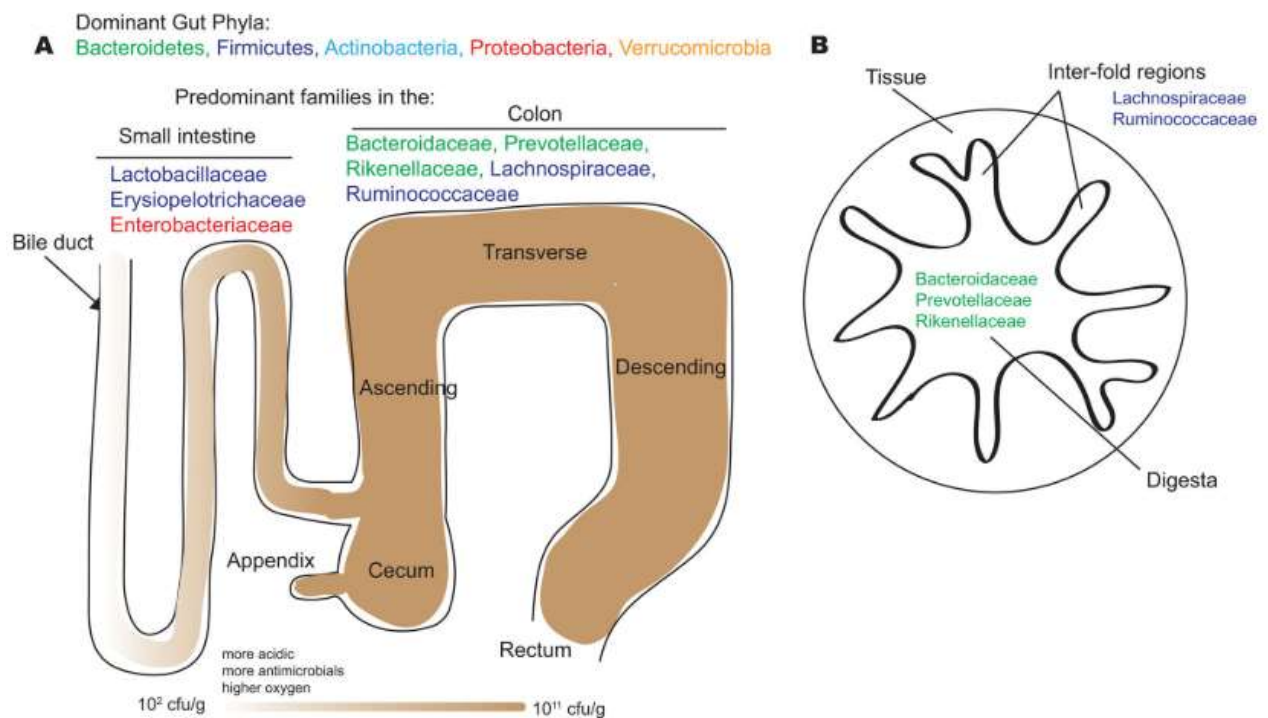


Figure 20 : répartition du microbiote bactérien le long du tractus digestif (A) et de la lumière à la muqueuse intestinale (B) chez l'Homme. (Donaldson et al., 2015)

Chez l'Homme, d'importantes variations inter-individuelles existent dans la composition du microbiote bactérien commensal et s'expliquent par de nombreux facteurs tels que le régime alimentaire, la zone géographique ou encore l'âge de l'individu (Eckburg et al., 2005; Yatsunencko et al., 2012). À titre d'illustration, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* et *Bacteroides uniformis* ont été identifiées comme des espèces fortement représentées chez certains individus alors qu'elles représentent moins de 0,5 % du microbiote bactérien pour d'autres (Lozupone et al., 2012). Bien que la composition du microbiote soit spécifique de chaque individu, la redondance des fonctions apportées par les différentes espèces

bactériennes en présence mène à des profils physiologiques similaires (Turnbaugh et al., 2009). En outre, d'importantes variations inter-espèces existent dans la composition du microbiote bactérien et il a été notamment montré que 85% des genres bactériens présents chez la souris ne sont pas partagés par l'Homme, bien qu'au niveau des phyla, les *Firmicutes* et *Bacteroidetes* soient les plus représentés pour les deux espèces (Ley et al., 2005; Nguyen et al., 2015).

Le microbiote bactérien commensal assure de nombreuses fonctions physiologiques bénéfiques pour l'hôte. Tout d'abord, il assure la maturation et le renforcement du système immunitaire entérique (Rooks and Garrett, 2016). De plus, il assure un rôle essentiel dans le processus de digestion : il apporte une contribution importante au métabolisme de l'hôte en apportant des enzymes qui ne sont pas codées par le génome humain, comme par exemple celles qui permettent la dégradation des polysaccharides et des polyphénols, ou encore la synthèse de certaines vitamines (Rowland et al., 2018). Les produits du métabolisme bactérien tels que les acides gras à chaîne courte (butyrate, propionate, acétate) jouent également un rôle important pour le maintien de l'homéostasie intestinale et le métabolisme de l'hôte (Den Besten et al., 2013). La présence du microbiote permet également de protéger l'hôte contre les bactéries pathogènes et les xénobiotiques, en assurant notamment des fonctions de détoxification (Koppel et al., 2017). L'interaction bactéries-xénobiotiques est aujourd'hui de plus en plus reconnue comme un acteur clé de la santé digestive. Le microbiote intestinal a en effet la capacité de métaboliser différents xénobiotiques présents dans l'alimentation et de moduler leur toxicité pour l'hôte (Lu et al., 2015). Réciproquement, ces composés peuvent modifier la composition et/ou les fonctions métaboliques du microbiote intestinal, comme rapporté pour diverses familles de polluants comprenant les métaux lourds, les pesticides (comme le chlorpyrifos ; Joly et al., 2013) ou encore les polluants organiques persistants, et les additifs alimentaires nano-dimensionnés (Claus et al., 2016; Jin et al., 2017; Rosenfeld, 2017).

Ainsi, le microbiote bactérien est sensible à l'environnement et un déséquilibre important, appelé dysbiose, peut survenir. Cette dysbiose est caractérisée par une modification de la quantité totale de bactéries (généralement une diminution) ainsi que de la diversité des espèces présentes (Manichanh et al., 2006; Ott et al., 2004). Une modification du rapport entre *Firmicutes* et *Bacteroidetes* est également un élément clé de la dysbiose intestinale, qui peut représenter un facteur de risque important dans le développement de nombreuses maladies. Une modification du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* a ainsi été mise en évidence chez les personnes souffrant d'obésité (Castaner et al., 2018) ou encore de MICI (Kabeerdoss et al.,

2015). Ces modifications sont généralement associées à une diminution de l'abondance de bactéries bénéfiques pour l'individu, telles que *Akkermansia muciniphila* (Earley et al., 2019; Lopez-Siles et al., 2018) ou *F. prausnitzii* (Lopez-Siles et al., 2018). De plus, une augmentation des *Proteobacteria* a été décrite et associée à des maladies inflammatoires chroniques, telles que les maladies métaboliques ou les MICI. Il a ainsi été montré que des bactéries de la famille *Desulfovibrionaceae* peuvent favoriser une inflammation intestinale chez l'Homme (Shin et al., 2015).

2.2.2. Le microbiote fongique

Le microbiote fongique, également appelé « mycobiome », ne représente qu'environ 0,1 % de la population totale de micro-organismes du microbiote intestinal d'un individu (Botterel et al., 2015). Pendant longtemps, il est resté peu étudié comparativement au microbiote bactérien, en partie dû aux limites techniques d'identification. Aucun consensus n'existe à l'heure actuelle sur la définition d'un mycobiome intestinal sain, en raison de la faible abondance et de la faible diversité des champignons présents dans l'intestin ainsi que de l'importante variabilité inter-individuelle, mais également au cours du temps chez un même individu (Hallen-Adams and Suhr, 2017). Cependant, le principal phylum est celui des *Ascomycota*, suivi des *Zygomycota* et *Basidiomycota* (Chin et al., 2020). Une étude de séquençage de l'ARNr 18S dans les selles de 317 individus a mis en évidence que les genres *Malassezia*, *Candida* et *Saccharomyces* sont les plus représentés avec les espèces *S. cerevisiae*, *M. restricta*, et *C. albicans* identifiées dans 96,8 %, 88,3 % et 80,8 % des échantillons, respectivement (Nash et al., 2017).

Bien que la population fongique du microbiote intestinal soit peu nombreuse et peu diversifiée, différentes études ont mis en évidence le rôle important des espèces fongiques dans le maintien de l'homéostasie intestinale, mais également leur implication dans le développement de maladies intestinales et métaboliques (Huseyin et al., 2017; Underhill and Iliev, 2014). Chez des patients atteints de MICI, une importante modification du microbiote fongique a été observée, caractérisée par une augmentation du rapport *Basidiomycota/Ascomycota*, une proportion réduite de *S. cerevisiae* et une proportion accrue de *C. albicans* (Sokol et al., 2017). Il a été montré que les niveaux d'inflammation dans ces pathologies peuvent être atténués par *S. cerevisiae* (Sivignon et al., 2015) ou au contraire accentués par *C. albicans* (Jawhara et al., 2008; Sovran et al., 2018). Une relation étroite existe entre populations bactérienne et fongique et il a été rapporté, par exemple, que *S. boulardii*, une

espèce probiotique proche de *S. cerevisiae*, est capable de sécréter des phosphatases et des protéases, capables de désactiver les toxines produites par *Clostridium difficile* ou *Escherichia coli* (Buts et al., 2006; Castagliuolo et al., 1999). Certaines espèces fongiques peuvent également avoir un impact direct sur l'intégrité de l'épithélium intestinal. À titre d'exemple, *S. boulardii* est capable de produire des médiateurs anti-inflammatoires favorisant le maintien de l'intégrité des jonctions cellulaires entre les entérocytes lors d'une infection à *E. coli in vitro* (Czerucka et al., 2000).

À ce jour, et à notre connaissance, seule une étude récente a déterminé l'impact d'un contaminant alimentaire sur le microbiote fongique. Wang et al. (2020) ont observé qu'une exposition orale à l'arsenic à une dose de 30 mg/kg p.c. chez la souris C57BL/6 sur 30 et 60 jours a un moindre impact sur les populations fongiques que bactériennes. Selon les auteurs, ces différences sont notamment dues à une plus grande capacité de résistance et de métabolisation de l'arsenic des espèces fongiques.

2.3. Le mucus intestinal

L'importance que joue le mucus dans la fonction barrière intestinale, en particulier face aux additifs et contaminants alimentaires, a été abordée dans une revue écrite dans le cadre de mon travail de thèse et publiée dans *Microorganisms* : “*Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives*” (Gillois et al., 2018). J'ai choisi de reprendre ici quelques éléments clés sur la structure et la fonctionnalité du mucus, en les faisant apparaître entre crochets. L'ensemble de la revue figure en Annexe.

[Le mucus est un gel viscoélastique qui recouvre et protège l'épithélium intestinal, le séparant du contenu luminal. Il fonctionne comme une barrière dynamique perméable aux gaz, à l'eau et aux nutriments, mais imperméable à la plupart des micro-organismes. Les principaux constituants du mucus sont les mucines, qui sont produites, stockées et libérées par les cellules caliciformes.]

Longtemps considéré comme une « simple » barrière physique, le mucus exerce pourtant de nombreuses fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie intestinale, telles que la lubrification de l'épithélium (facilitant la progression du contenu digestif), sa protection par la présence de molécules antibactériennes, ou encore le rôle de niche écologique pour une partie des bactéries du microbiote intestinal (voir section 2.3.3, p66) (Mercier-Bonin et al.,

2018, 2016). En ce qui concerne son rôle en (nano) toxicologie alimentaire (Gillois et al., 2018), [nous avons illustré l'existence de relations bidirectionnelles entre le mucus et différentes familles d'additifs et de contaminants chimiques présents dans l'alimentation, comme les émulsifiants, les nanomatériaux, les métaux lourds, les pesticides ou encore les polluants organiques persistants. En raison de ses propriétés de barrière par la taille et la charge, le mucus peut piéger les xénobiotiques, diminuant ainsi leur toxicité pour l'hôte. À l'inverse, ces mêmes substances peuvent affecter les caractéristiques du mucus (nombre de cellules caliciformes, épaisseur et pénétrabilité, expression et composition des mucines) tout au long du tractus digestif, avec des effets potentiellement délétères sur la santé de l'hôte.]. Les interactions entre le mucus et les AgNP seront présentées dans la partie 3, sections 2.2.1 (p84) et 2.3.3 (p91).

2.3.1. Organisation structurelle du mucus

La structure du mucus varie le long du tractus digestif et notamment entre l'intestin grêle et le côlon (Figure 21).

Dans l'intestin grêle, le mucus remplit l'espace entre les villosités et il est relativement perméable aux micro-organismes (Atuma et al., 2001). La population microbienne est régulée par une forte production de peptides antimicrobiens (Dupont et al., 2015) et d'immunoglobulines A (sIgA) et G (sIgG) (Strugnell and Wijburg, 2010) qui sont piégés dans le mucus et permettent de limiter le contact des bactéries avec l'épithélium (Meyer-Hoffert et al., 2008).

Dans le côlon distal, une structure du mucus en bi-couche est généralement décrite : une couche interne fine ($> 200 \mu\text{m}$ chez l'Homme ; $50 \mu\text{m}$ chez la souris) et stérile, assurant le maintien d'une barrière entre le microbiote et les cellules épithéliales intestinales (Johansson et al., 2013, 2008) ; une couche externe, de structure plus lâche (jusqu'à $800 \mu\text{m}$ d'épaisseur chez l'Homme ; $100 \mu\text{m}$ chez la souris), servant d'habitat pour certaines espèces du microbiote (voir section 2.3.3, p66). Jusqu'à récemment, il était communément admis que la couche interne est fermement attachée à l'épithélium. Une étude de notre équipe a toutefois établi que, chez le rongeur (souris et rat) et dans le côlon distal, la couche de mucus interne, requalifiée de couche de mucus « fécale », recouvre plutôt le contenu colique, permettant le « confinement » du microbiote, et n'est donc pas adhérente à la surface épithéliale (Kamphuis et al., 2017).

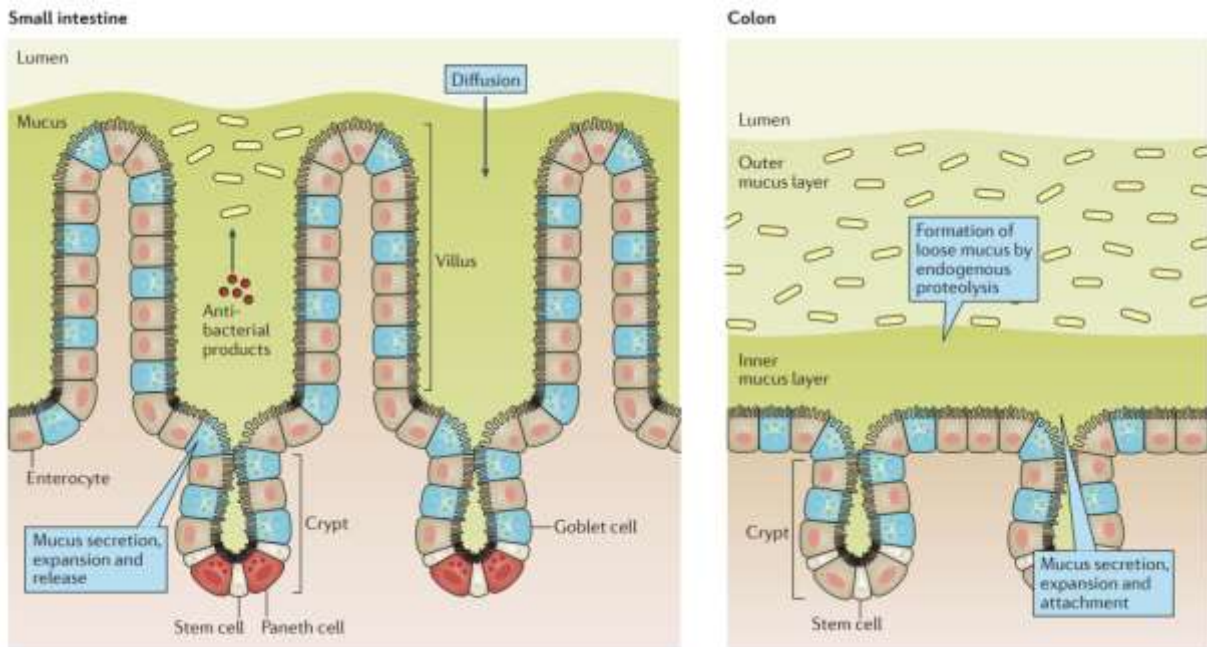


Figure 21: organisation structurelle du mucus dans l'intestin grêle et le côlon (Johansson et Hansson, 2016)

2.3.2. Mucus et mucines

Le mucus est composé en grande partie de mucines sécrétées, en opposition aux mucines membranaires, qui sont des protéines fortement glycosylées et majoritairement responsables des propriétés viscoélastiques du mucus (McGuckin et al., 2011). Le mucus contient également des électrolytes, des lipides, de l'ADN et diverses protéines telles que les *Trefoil Factor Family* (TFF), l'ensemble jouant également un rôle dans ses propriétés rhéologiques (Bansil et Turner, 2018). À titre d'illustration, une absence de lipides dans le mucus conduit à une très forte diminution de la viscoélasticité du mucus (Murty et al., 1984) et augmente considérablement sa perméabilité aux xénobiotiques (Larhed et al., 1998).

Différentes mucines ont été répertoriées chez l'Homme et leur répartition dans le tractus digestif diffère selon la région considérée (Tableau 3).

Tableau 3 : composition des mucines gélifiantes et membranaires du tractus digestif

(D'après McGuckin et al. (2011))

Tissu	Mucines sécrétées	Mucines membranaires		
Bouche	MUC5B	MUC1		
	MUC7	MUC4		
	MUC19	MUC16		
Estomac	MUC5AC	MUC1		
	MUC6	MUC16		
Intestin grêle	MUC2	MUC1	MUC4	MUC15
		MUC3A	MUC12	MUC16
		MUC3B	MUC13	MUC17
Côlon	MUC2	MUC1	MUC4	MUC15
	MUC5AC	MUC3A	MUC12	MUC16
	MUC6	MUC3B	MUC13	MUC17

Dans l'intestin grêle et le côlon, la mucine majoritaire est MUC2. Comme l'ensemble des mucines, MUC2 est une O-glycoprotéine dont la structure protéique centrale, aussi appelée domaine PTS, est riche en acides aminés proline, thréonine et sérine. La synthèse est initiée dans le réticulum endoplasmique, où une N-glycosylation lie une N-acétylgalactosamine (GalNAc) aux groupements hydroxyles des acides aminés thréonine et sérine. Les mucines s'assemblent alors en dimères par leur région C-terminale (Asker et al., 1998) puis elles sont adressées dans l'appareil de Golgi (Figure 22A). Au cours de leur transport dans l'appareil de Golgi, des réactions de O-glycosylations s'opèrent, en partant de la GalNAc, générant des O-glycanes. Cette série de O-glycosylations est sous contrôle d'une large famille d'enzymes, les glycosyltransférases (Bennett et al., 2012). Ces dernières ajoutent successivement des monosaccharides, tels que le galactose, le fucose, la N-acétylglucosamine (GlcNAc) ou la GalNAc, la composition de la chaîne formée étant déterminée par le type de glycosyltransférase intervenant dans la réaction. Ces longues chaînes de O-glycanes sont généralement terminées par un groupement d'acide sialique, de fucose ou des résidus sulfatés. La nature de ces groupements terminaux est déterminante dans les interactions avec l'environnement et en particulier le microbiote (Juge, 2012). Les O-glycanes représentent la plus grande part de la masse molaire de la glycoprotéine, qui peut atteindre 2,7 MDa (Axelsson et al., 1998) et sont fortement hydrophiles, conférant au mucus une hydratation importante. Les mucines s'oligomérisent par leur région N-terminale puis sont stockées dans des vésicules avant sécrétion (McGuckin et al., 2011). La sécrétion du mucus est sous contrôle de voies calcium-dépendantes, une exocytose pouvant être modulée par de nombreux facteurs tels que des

hormones, des cytokines ou encore des composants bactériens luminaux (McGuckin et al., 2011). À titre d'exemple, les lipopolysaccharides (LPS) produits par *E. coli* stimulent la production de mucus sur un modèle *in vitro* de cellules caliciformes HT29-MTX, associée à une induction de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 en réponse à cette mise en contact (Smirnova et al., 2003).

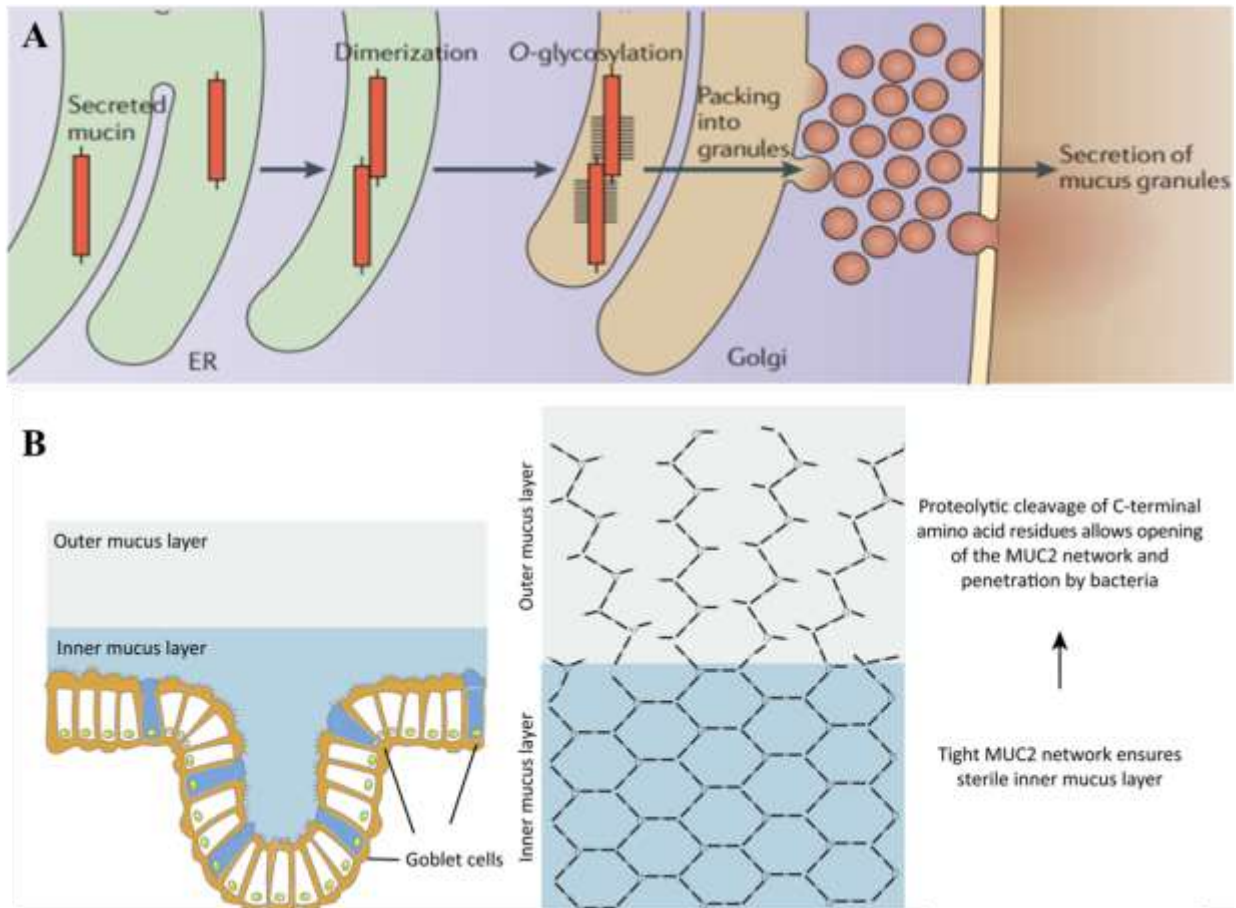


Figure 22 : les différentes étapes post-transcriptionnelles avant sécrétion du mucus (A) et structuration du réseau de MUC2 formant les deux couches distinctes du mucus dans le côlon (B).
(Adapté de Ijssennagger et al. (2016) et McGuckin et al. (2011))

Une fois sécrétées, les mucines confèrent une structure en « maille » au mucus (Figure 22B). Les clivages protéolytiques de MUC2 catalysés par les enzymes bactériennes au niveau du côlon favorisent la transition d'un réseau de mucines dense à un réseau plus lâche, permettant dès lors aux bactéries l'accès à une niche écologique riche en substrat pour leur survie (Ijssennagger et al., 2016; Johansson et al., 2008).

2.3.3. Interactions microbiote intestinal/mucus

L'analyse des interactions croisées entre le microbiote intestinal et le mucus fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études de la littérature (Corfield, 2018; Jakobsson et al., 2015; Schroeder, 2019).

La production, le renouvellement et les propriétés du mucus intestinal sont dépendants, du moins en partie, de la présence et de la composition du microbiote. En effet, il a été montré chez le rat axénique que l'absence de microbiote conduit à une production de mucus moindre dans le côlon, une épaisseur plus faible et une structure plus lâche. Il a pu également être observé localement une absence de mucus (Szentkúti et al., 1990). Cependant, la colonisation de souris axéniques par le microbiote de souris conventionnelles permet de rétablir les propriétés du mucus dans le côlon (i.e., couche interne imperméable aux bactéries) six semaines après inoculation (Johansson et al., 2015). De manière intéressante, des niveaux élevés du genre *Desulfovibrio*, appartenant aux bactéries sulfato-réductrices (ou SRB, abréviation de l'anglais "Sulfate-Reducing Bacteria"), ont été associés à un phénotype particulier du mucus avec une plus forte pénétrabilité aux bactéries et à des billes de l'ordre du micron (Jakobsson et al., 2015). La production de sulfure d'hydrogène par les SRB induirait la réduction des ponts disulfures entre les mucines, favorisant une forme plus lâche du mucus et plus permissive aux bactéries (Ijssennagger et al., 2016).

La composition du mucus, plus particulièrement au niveau des O-glycanes, est également modulée par certaines espèces bactériennes du microbiote intestinal. *Bacteroides thetaiotaomicron*, une espèce commune aux microbiotes humain et murin, est ainsi capable d'induire une fucosylation des mucines dans l'iléon de souris (Bry et al., 1996). Cette induction de la fucosylation est dépendante de la capacité de métabolisation du fucose par la bactérie, lui assurant l'apport d'une source nutritionnelle préférentielle. Cette bactérie n'est pas la seule à utiliser les glycanes des mucines comme substrats. En effet, notre revue aborde ce point plus en détail (Gillois et al., 2018) :

[Le mucus fournit un habitat pour le microbiote intestinal, la grande diversité des glucides liés aux mucines pouvant être utilisée par les bactéries « mucophiles » comme source d'énergie (Bäckhed et al., 2005; Kaoutari et al., 2013; Sonnenburg et al., 2005) ou comme sites de liaisons préférentielles via les adhésines bactériennes (Juge, 2012). Les bactéries dégradant le mucus possèdent une grande variété d'enzymes (glycosidases, sulfatases, sialidases, etc.) pour l'hydrolyse des glycanes du mucus afin d'obtenir des oligosaccharides pour leur propre

métabolisme, présentant donc un avantage compétitif pour la colonisation de la muqueuse. De nombreuses bactéries mucolytiques ont été décrites à ce jour (Tailford et al., 2015), dont *A. muciniphila* (Derrien et al., 2004), *B. thetaiotaomicron* (Bry et al., 1996), *Bacteroides fragilis* (Huang et al., 2011), *Ruminococcus gnavus* et *Ruminococcus torques* (Crost et al., 2013; Png et al., 2010)].

L'ensemble de ces bactéries ne possèdent pas les mêmes capacités enzymatiques, ainsi une coopération métabolique entre bactéries mucolytiques est nécessaire pour une dégradation poussée des mucines (Derrien et al., 2010). La dégradation des mucines par ces espèces favorise leur croissance, mais également celle d'autres bactéries n'ayant pas ces mêmes capacités. C'est par exemple le cas pour certaines souches *E. coli* commensales (Chang et al., 2004) ou encore le genre *Enterococcus* (Pultz et al., 2006) qui utilisent comme source de carbone les produits de dégradation du mucus.

Comme le précise notre revue, [une autre caractéristique importante pour l'adaptation des bactéries intestinales à l'environnement muqueux est leur capacité de liaison au mucus comme, par exemple, dans le cas des bactéries lactiques. Les déterminants spécifiques favorisant l'adhésion aux mucines comprennent les pili, tels que ceux produits par *Lactobacillus rhamnosus* GG (Von Ossowski et al., 2010) et les protéines de liaison au mucus (MUB pour *mucus-binding*), comme chez *Lactobacillus reuteri* (MacKenzie et al., 2010).]

Au-delà de la composante bactérienne du microbiote et de son interaction étroite avec le mucus, très peu d'informations sont disponibles sur les composantes fongique et virale. Leur implication pourrait pourtant avoir un fort impact au niveau de cette niche écologique à forte compétition nutritionnelle pour le substrat que représente le mucus au travers des mucines. À titre d'exemple, l'étude de Barr et al. (2013) a montré que des bactériophages adhérant au mucus réduisaient localement la colonisation bactérienne.

3. Fragilisation de la barrière intestinale induite par le stress psychologique

Comme introduit précédemment, la fragilisation de la barrière intestinale est généralement considérée comme un facteur important dans de nombreuses pathologies digestives. Dans ce cadre, les travaux menés au laboratoire portent sur le stress psychologique et son rôle dans cette fragilisation de la fonction barrière de l'intestin (Ilchmann-Diounou et Menard, 2020), se traduisant par une altération de la perméabilité intestinale mais également des propriétés du mucus et de la composition du microbiote intestinal, éléments que nous allons aborder ci-après.

3.1. Généralités sur le stress

En 1915, Cannon décrit pour la première fois la notion de « combat- fuite » en réponse à une menace extérieure (Cannon, 1915). Cette réponse, caractérisée par une forte activation du système nerveux sympathique, a été plus tard décrite comme la première phase de réponse au stress aigu. C'est en 1936 que Selye décrit, pour la première fois, la notion de stress comme une adaptation générale de l'organisme à tout stimulus nocif, mettant en avant l'implication de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (ou HPA, abréviation de l'anglais "*Hypothalamic–Pituitary–Adrenal*") dans l'induction des effets biologiques en réponse à celui-ci (Selye, 1936).

Tandis que l'activation de l'axe sympathique entre en jeu dans la première phase de réponse à un stress aigu, l'axe HPA est impliqué dans la réponse adaptative à un stress chronique. Au-delà de la notion de stimulus nocif, le stress peut avoir différentes sources : il est communément associé à un état psychologique (anxiété) mais il peut être également environnemental (température), biologique (infection) ou encore chimique (xénobiotiques) (Fink, 2010).

L'axe HPA implique le système nerveux central (SNC) via l'hypothalamus et l'hypophyse (ou glande pituitaire) et son action sur l'organisme est assurée en périphérie par les glandes surrénales (Figure 23). En réponse à un stress, le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus libère de la corticolibérine (CRH, *Corticotropin Releasing Hormone*) dans la circulation portale hypophysaire, qui est transportée vers l'hypophyse antérieure, où elle se lie à son récepteur respectif (CRH1). En réponse à ce stimulus, une production de l'hormone corticotrope (ACTH, *Adreno CorticoTropic Hormone*) est assurée par l'hypophyse, cette hormone étant libérée dans la circulation sanguine. Au niveau des glandes surrénales, l'ACTH

stimule la production et la sécrétion de glucocorticoïdes comme le cortisol (Homme) ou la corticostérone (rat et souris) (Smith and Vale, 2006). Les glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme ; corticostérone chez le rongeur) sont les principales hormones effectrices de l'axe HPA et, via leur liaison à leurs récepteurs intracellulaires, ont pour fonction de réguler les adaptations physiologiques au stress (Munckt et al., 1984). Ils agissent notamment sur les différents acteurs de la fonction barrière intestinale (Ilchmann-Diounou and Menard, 2020), et le maintien d'un stress chronique peut être impliqué dans le développement de nombreuses pathologies digestives.

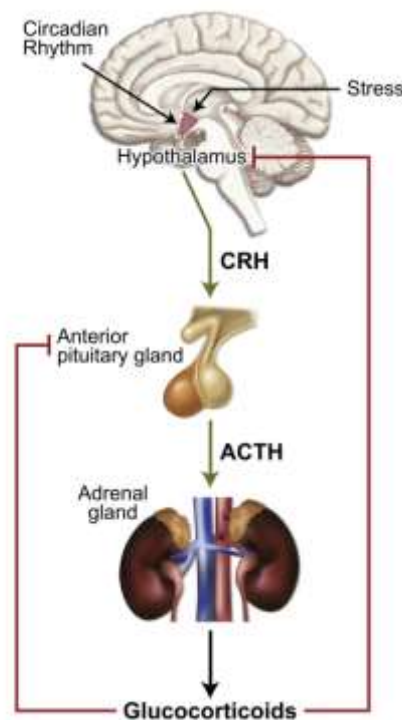


Figure 23 : régulation de la réponse au stress par l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien. (Oakley and Cidlowski, 2013).

3.2. Effet du stress sur la fonction barrière intestinale chez l'Homme

Il a été montré lors d'un stress psychologique aigu, consistant à demander à des étudiants d'effectuer une présentation orale, que l'augmentation du taux d'anxiété et des taux de cortisol dans la salive était associée à une augmentation de la perméabilité intestinale (Vanuytsel et al., 2014). D'autre part, la composition du microbiote peut être affectée chez des individus sujets à un syndrome de stress post-traumatique (SSPT). En effet, l'étude de Hemmings et al. (2017) a mis en évidence une diminution des phyla *Actinobacteria*, *Lentisphaerae* et *Verrucomicrobia* chez des individus soumis au SSPT.

Une altération du microbiote bactérien (Chong et al., 2019; Collins, 2014) ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale (Camilleri et al., 2012) ont également été mises en évidence chez des patients atteints du SII, l'augmentation de la perméabilité intestinale étant corrélée à une augmentation de la sensibilité viscérale (Zhou et al., 2009). Le SII est un trouble fonctionnel intestinal avec une prévalence mondiale moyenne évaluée à 11,2 % (Lovell and Ford, 2012) et un taux d'incidence (apparition de nouveaux cas) estimé entre 1,35 % et 1,5 % par an (Ford et al., 2008; Halder et al., 2007). Bien que l'étiologie du SII soit multifactorielle, il a été montré que les facteurs de stress psychologique, pouvant aller de l'anxiété à la détresse psychologique, sont susceptibles de déclencher et d'entretenir des phases de douleurs intestinales, caractéristiques de ce trouble (Bennett et al., 1998; Lackner et al., 2010), pouvant entretenir à leur tour des états d'anxiété et de dépression (Janssens et al., 2015).

Face à la complexité des études chez l'Homme sur l'impact du stress psychologique sur la mise en place et l'entretien des altérations de la fonction barrière intestinale et des troubles associés, des modèles animaux ont été développés au sein de la communauté scientifique pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués.

3.3. Les modèles animaux de stress psychologique et leurs effets sur la fonction barrière intestinale

Deux grandes catégories de modèles de stress existent chez le rongeur : les stress aigus, s'approchant d'un état de traumatisme, et les stress chroniques, plus proches d'un état d'anxiété durable dans le temps. Dans ce paragraphe, nous allons nous focaliser sur les deux principaux modèles de stress psychologique aigu et chronique chez l'adulte, pratiqués au laboratoire : le stress de contrainte et le stress d'évitement passif de l'eau (WAS, *Water Avoidance Stress*). Nous présenterons également leurs conséquences sur la fonction barrière intestinale.

3.3.1. *Le stress de contrainte*

Le stress de contrainte est le modèle le plus largement utilisé dans l'induction d'un stress psychologique aigu chez le rongeur. Ce modèle consiste généralement à placer l'animal dans un tube ventilé, dont les dimensions ne permettent pas à l'animal de se mouvoir, sur une durée comprise entre 1 h et 4 h. Une autre approche peut être également l'immobilisation de l'animal dans un harnais conçu à cet effet (Farre et al., 2007). Par ailleurs, le stress de contrainte peut être combiné avec une source de stress physique tel qu'un stress auditif (Demaude et al., 2006) ou un stress thermique avec une température proche de 4°C (Ataka et al., 2003; Saunders et al.,

2002). Ces modèles induisent un état d'anxiété et de dépression transitoire chez le rat et la souris (Fekri et al., 2020) ainsi qu'une altération de la fonction barrière intestinale.

En effet, il a été montré que le stress de contrainte induit une augmentation de la perméabilité intestinale. Dans une première étude de Saunders et al. (1994), les auteurs ont montré qu'un stress de contrainte d'une durée de 4 h se traduit par une perméabilité intestinale du jéjunum plus forte en chambre de Ussing, caractérisée par une augmentation du passage du ⁵¹Cr-EDTA ainsi qu'une diminution de la TEER. Meddings et Swain (2000) ont établi que l'axe HPA et plus particulièrement les glucocorticoïdes sont importants dans l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le stress de contrainte, les altérations ayant été corrigées par une surrénalectomie ou un traitement avec des antagonistes des récepteurs aux glucocorticoïdes. De plus, il a été montré dans l'équipe que l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le stress de contrainte est dépendante de l'ouverture des jonctions serrées, un traitement avec un inhibiteur de la MLCK permettant de rétablir la perméabilité intestinale à un niveau physiologique basal (Ait-Belgnaoui et al., 2005). Le microbiote intestinal joue également un rôle important dans la réponse de l'organisme au stress aigu. Les animaux axéniques présentent, en effet, une réponse de l'axe HPA plus marquée que les animaux conventionnels en réponse au stress de contrainte. Par ailleurs, il a été montré que les effets délétères du stress aigu sur la perméabilité intestinale peuvent être modulés par un traitement avec la souche probiotique *Lactobacillus farciminis*, diminuant l'activation de l'axe HPA (Ait-Belgnaoui et al., 2012).

3.3.2. *Le stress d'évitement passif de l'eau*

Le WAS est un stress psychologique chronique qui consiste à placer l'animal sur une plateforme transparente de petite taille, elle-même placée dans une bassine remplie d'eau à 1 cm au-dessus du niveau d'eau. La profondeur d'eau dans la bassine ne permet pas à l'animal de toucher le fond, la plateforme étant donc la seule zone où il puisse se tenir. L'animal y est placé 1 h/jour, le test pouvant être renouvelé de 7 à 10 jours (Bonaz and Taché, 1994; Da Silva et al., 2014). Initialement développé chez le rat (Enck et al., 1989), ce modèle peut également être appliqué à la souris (Gui et al., 2004; Yvon et al., 2019).

Le WAS induit un état d'anxiété chronique conduisant à une augmentation de la perméabilité intestinale, une dysbiose du microbiote intestinal, ainsi qu'une altération des propriétés du mucus et favorise également le développement d'une inflammation intestinale de bas-grade (Figure 24), reproduisant la physiopathologie du SII chez l'Homme (Ait-Belgnaoui

et al., 2014; Bradesi et al., 2005; Sun et al., 2013; Yvon et al., 2019; Zareie et al., 2006). Dans ce modèle, la corticostéronémie est augmentée (Söderholm et al., 2002), les effets observés étant comparables à une administration chronique de corticostérone pendant 10 jours chez le rat (Hong et al., 2011). L'augmentation de la perméabilité intestinale est retrouvée chez le rat et la souris (Takashima et al., 2020; Yvon et al., 2019) et une diminution du nombre de cellules caliciformes productrices de mucus a été observée chez le rat (Söderholm et al., 2002). Il a été montré dans l'équipe que le WAS induit chez le rat une altération des propriétés cohésives du mucus via la modification de la longueur des chaînes de O-glycanes des mucines (Da Silva et al., 2014). L'étude de Söderholm et al. (2002) a révélé que cette altération de la fonction barrière de l'intestin favorise l'adhérence bactérienne à l'épithélium, induisant une réponse inflammatoire chez le rat. Cette inflammation intestinale a récemment été confirmée dans l'équipe chez la souris, en mettant en évidence une augmentation de la lipocaline-2 dans les fèces (Yvon et al., 2019). Il a également été montré chez la souris que le stress WAS induit une dysbiose du microbiote bactérien fécal après 10 jours de stress (Sun et al., 2013). Une forte augmentation du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* ainsi que des *γ-Proteobacteria* a ainsi été décrite. Les auteurs ont également souligné dans cette étude que les effets délétères du WAS (augmentation de la perméabilité, inflammation intestinale) peuvent être transmis, par coprophagie, aux animaux partageant la même cage mais n'ayant pas été soumis eux-mêmes au stress.

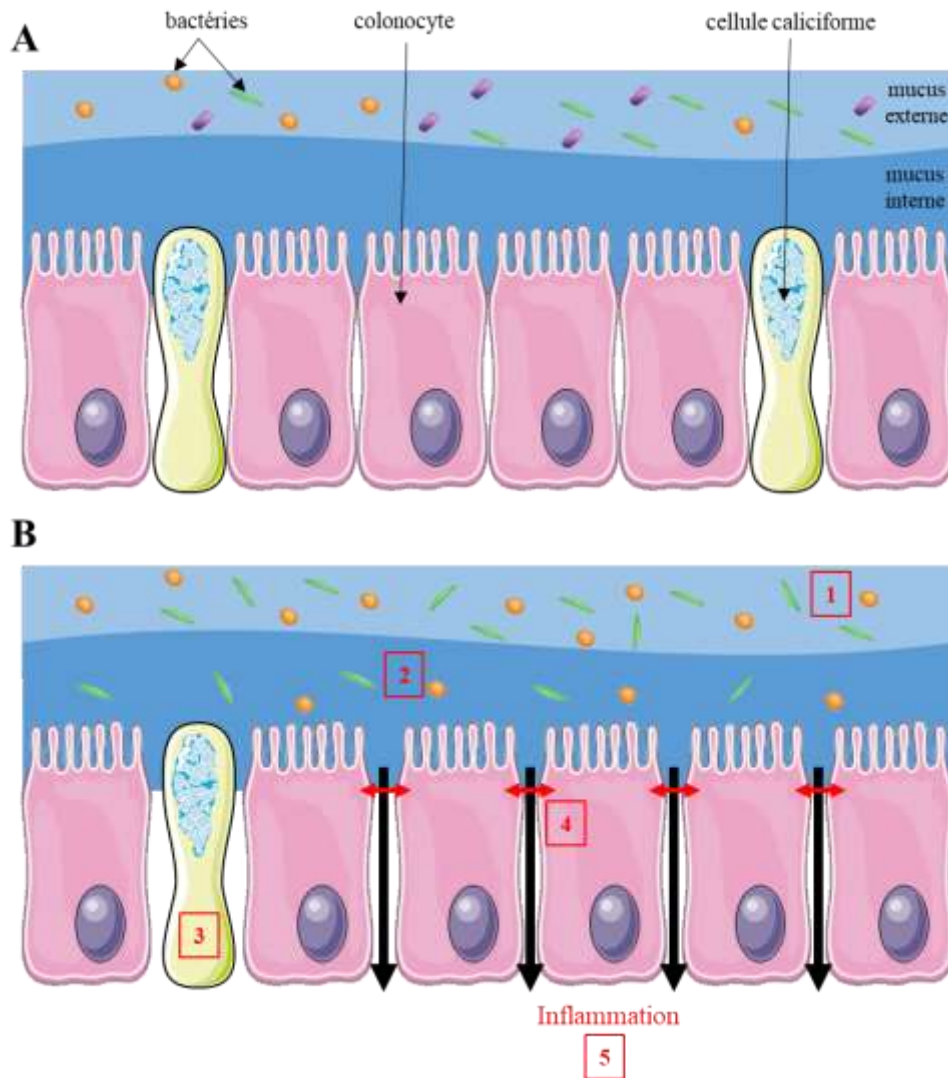


Figure 24 : fonction barrière intestinale intègre (A) et fragilisée par un stress psychologique chronique (B). Le stress induit une dysbiose intestinale (1), une altération des propriétés du mucus avec une plus forte pénétrabilité aux bactéries (2). Au niveau de l'épithélium, le nombre de cellules caliciformes diminue (3) et la perméabilité est augmentée (4) favorisant l'induction d'une réponse inflammatoire (5).

Partie 3 - Devenir et toxicité de l'argent nanoparticulaire et/ou ionique au cours d'une exposition orale

Dans le présent chapitre, nous aborderons les connaissances actuelles sur les transformations physico-chimiques de l'argent nanoparticulaire et/ou ionique au cours de la digestion, ainsi que leur impact sur la fonction barrière intestinale et, à plus grande échelle, sur l'organisme, en nous focalisant sur les mammifères.

1. Le devenir de l'argent au cours d'une exposition orale

1.1. Conséquences de la digestion sur les propriétés de l'argent

Différentes approches permettent d'étudier l'évolution des propriétés physico-chimiques d'un composé au cours de la digestion dans les parties hautes du tractus gastro-intestinal, même s'il faut garder à l'esprit que les observations effectuées peuvent être partiellement représentatives de la réalité physiologique, en raison des limites des systèmes utilisés (Ménard et Dupont, 2014). Les modèles les plus courants sont *in vitro* et en conditions statiques, reposant sur une série de réactions mimant les différentes phases digestives (Figure 25). Ces modèles prennent généralement en considération les variations de pH, le temps de transit, ainsi que l'activité des enzymes caractéristiques de ces différentes phases (Figure 25 et Tableau 4). Une digestion en conditions « nourries » (i.e., avec ajout d'une matrice alimentaire) peut être également considérée. Ces modèles ont été notamment utilisés pour évaluer l'impact de la digestion sur des AgNP modèles (Abdelkhalik et al., 2020; Böhmert et al., 2014; Laloux et al., 2020; Lichtenstein et al., 2015), mais également plus récemment sur des produits d'argent colloïdal commercialisés (Rogers et al., 2020; Wu et al., 2018). Les transformations physico-chimiques des AgNP au cours de la digestion ont été abordées dans la revue de Bi et al. (2020) co-écrite par l'équipe ; dans ce cadre, nous allons détailler ci-dessous l'impact des différentes phases digestives.

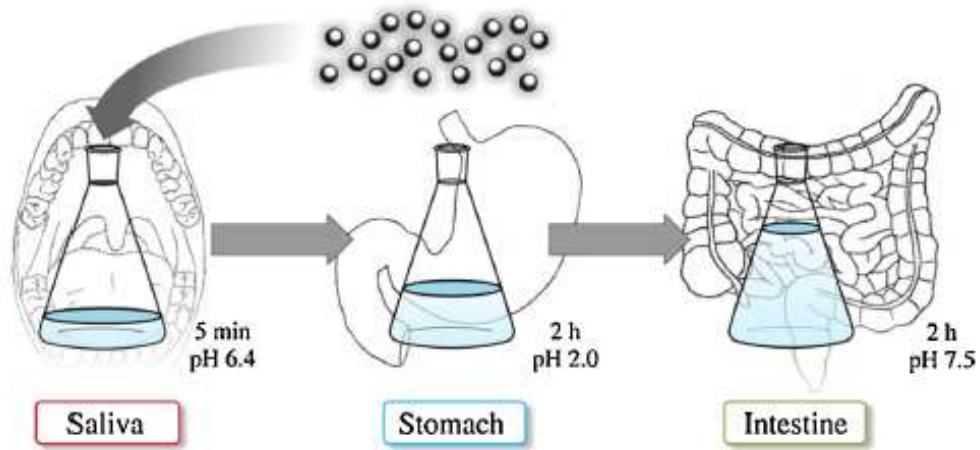


Figure 25 : exemple d'une digestion artificielle de nanoparticules d'argent incluant les phases salivaire, gastrique et intestinale. Le temps de transit et le pH pour chaque phase peuvent varier en fonction des études. (Kästner et al., 2017)

Tableau 4 : exemple de la composition des différents fluides digestifs pouvant être utilisés lors d'une digestion in vitro (D'après Kästner et al., 2017; Lichtenstein et al., 2015)

Phase	Salivaire	Gastrique	Intestinale
Composants	NaCl	NaCl	NaCl
	NaSCN	KCl	CaCl ₂
	Na ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	MgCl ₂
	NaHCO ₃		NaHCO ₃
	KCl	Mucine	
	KH ₂ PO ₄	Pepsine	Bile
	CaCl ₂		Pancréatine
			Trypsine
		Acide urique	Urée
		Urée	
	Mucine		
	α-amylase		

1.1.1. Phase salivaire

La phase salivaire est caractérisée par une solution à pH proche de la neutralité contenant généralement de l' α -amylase et des mucines salivaires (Abdelkhalik et al., 2020; Kästner et al., 2017; Laloux et al., 2020; Walczak et al., 2012) (Tableau 4), et dont la mise en contact avec les AgNP est effectuée sous agitation pendant quelques minutes (2 à 5 min). Dans ces conditions, les protéines présentes en solution, notamment les mucines (Wu et al., 2018), s'adsorbent à la surface des AgNP et forment une couronne protéique, appelée également « corona ». Ce « corona » favorise alors leur stabilité dans le milieu. La présence d'une matrice alimentaire, pouvant être composée d'un mélange d'amidon, d'huile et de protéines (lait ou albumine), favorise également la formation d'un « corona » stabilisateur (Kästner et al., 2017; Laloux et al., 2020; Lichtenstein et al., 2015). En absence de ces protéines, une agglomération partielle, caractérisée par la formation d'amas de nanoparticules, est observée (Pind'áková et al., 2017; Walczak et al., 2012).

1.1.2. Phase gastrique

La phase gastrique, caractérisée par la présence de pepsine (Tableau 4) et par un pH acide dont la valeur varie grandement (entre 1 et 6, en fonction de l'absence ou la présence du bol alimentaire, respectivement (Mudie et al., 2010)), conduit à une forte agglomération des AgNP, dépendante de leur taille, du type de revêtement et du pH. Ainsi, l'étude de Axson et al. (2015) a évalué l'évolution du diamètre hydrodynamique (par DLS) des AgNP de taille 20 nm ou 110 nm avec un revêtement PVP ou citrate dans une solution gastrique, sans enzymes et de pH variant de 2 à 5. Les résultats de cette étude montrent que l'agglomération des AgNP est plus importante lorsque le pH est plus acide. De plus, les AgNP avec un revêtement PVP sont plus stables que celles recouvertes de citrate. Enfin, l'agglomération est plus marquée pour les nanoparticules de taille 20 nm comparativement à celles de 110 nm.

Outre le phénomène d'agglomération, une oxydation/dissolution des nanoparticules en ions Ag^+ a pu être mise en évidence dans différentes études (Abdelkhalik et al., 2020; Liu et al., 2012; Wu et al., 2018). Liu et al. (2012) ont démontré que l'oxydation est dépendante de la taille des nanoparticules et du pH. Plus la taille est petite et le pH faible, plus celle-ci est importante. L'ion Ag^+ ainsi formé interagit avec le milieu environnant et plus particulièrement avec les ions chlorure Cl^- pour former des complexes AgCl (Rogers et al., 2012). La présence de ces complexes AgCl , formés en solution ou à la périphérie des AgNP, expliquerait le

phénomène d'agglomération observé dans la phase gastrique, qui serait dû à la perte de l'électronégativité de surface des nanoparticules et à la diminution résultante des répulsions électrostatiques entre elles (Axson et al., 2015).

Comme dans la phase salivaire, la présence d'une matrice alimentaire limite la formation d'agglomérats d'AgNP dans la phase gastrique, en raison d'une part de l'augmentation du pH gastrique et d'autre part de la présence d'un « corona » favorisant la stabilisation des AgNP (Kästner et al., 2017; Laloux et al., 2020; Lichtenstein et al., 2015; Walczak et al., 2012).

1.1.3. Phase intestinale

La phase intestinale est caractérisée par un retour à un pH proche de la neutralité et à la présence de sels biliaires (Tableau 4). Au cours de cette phase, une désagglomération partielle est généralement observée (Kästner et al., 2017; Laloux et al., 2020; Lichtenstein et al., 2015), et peut être totale en présence d'une matrice alimentaire (Walczak et al., 2012). Pendant cette phase, l'argent, initialement sous forme de complexes AgCl, se retrouve préférentiellement lié aux biomolécules du milieu environnant, et plus particulièrement les protéines (Wu et al., 2018), probablement du fait de la forte affinité de l'ion Ag⁺ pour les groupements thiols de ces dernières (Liu et al., 2012).

En conclusion, au cours de la digestion, les AgNP subissent d'importantes modifications qui sont dépendantes de leurs propriétés intrinsèques (taille, charge de surface, revêtement), mais également des conditions physico-chimiques spécifiques des différents compartiments du tractus digestif. L'ensemble de ces paramètres vont contribuer à la distribution de l'argent dans les tissus après une exposition orale.

1.2. Biodistribution de l'argent dans les tissus

1.2.1. Chez l'Homme

Peu d'informations sont disponibles chez l'Homme sur le devenir de l'argent lors d'une exposition orale. L'affection la plus connue, quoique rare, est l'argyrisme. Elle est caractérisée par une décoloration de la peau lui donnant une couleur gris-bleu, due à l'accumulation d'argent au niveau du derme et de l'épiderme. Ce phénomène est d'autant plus important que la peau est exposée au soleil (Simon and Buchanan, 2020; White et al., 2003). Cette affection peut se

développer après plusieurs années d'ingestion quotidienne d'argent colloïdal (sous forme nanoparticulaire et/ou ionique), souvent produit artisanalement, à des concentrations de l'ordre de 10 µg/mL (Chung et al., 2010) et à des volumes consommés pouvant aller d'une dizaine de mL (Gulbranson et al., 2000) à un litre (Jung et al., 2017) par jour. Bien que l'argyrisme ne soit généralement pas associé à d'autres pathologies (Gulbranson et al., 2000; White et al., 2003), deux études de cas ont rapporté le développement d'un adénocarcinome gastrique (Chung et al., 2010) et d'une myopathie (Jung et al., 2017) en lien avec la consommation d'argent colloïdal. L'implication de l'argent dans ces pathologies n'a pas pu être clairement établie, des dépôts d'argent ayant cependant été détectés dans la muqueuse gastrique du sujet présentant l'adénocarcinome gastrique (Chung et al., 2010).

Munger et al. (2014) ont mesuré une concentration sanguine de $1,6 \pm 0,4$ µg/L et $6,8 \pm 4,5$ µg/L d'argent chez une vingtaine de patients exposés par voie orale pendant 14 jours à 10 µg/mL et 32 µg/mL respectivement, d'argent colloïdal composé de nanoparticules de 60 nm. Ceci correspondrait à une dose de 1,4 et 6,9 µg/kg p.c./jour pour un individu de 70 kg, sachant que la consommation journalière est de 10 mL et 15 mL, respectivement. Chez l'ensemble des individus, l'argent n'a pas été détecté dans les urines et les paramètres sanguins et métaboliques étudiés n'ont pas été perturbés, indiquant l'absence d'effet délétère de ce produit dans le contexte de l'étude.

1.2.2. Chez l'animal

Les études de biodistribution de l'argent, sous sa forme nanoparticulaire et/ou ionique, ont généralement été menées chez le rat en exposition aiguë (< 96 h), sub-chronique ou chronique (de 2 à 13 semaines), quelques études existant également chez la souris (Bergin et al., 2016; Gan et al., 2020; Park et al., 2010; Shahare et al., 2013). L'ensemble de ces études convergent vers une excrétion réalisée principalement par voie fécale. Ainsi, Bergin et al. (2016) ont rapporté une excrétion de 70,5 % des AgNP-PVP (110 nm) et 98 % des AgNP-citrate (20 nm) 48 h après une administration unique par gavage de 10 mg d'AgNP/kg p.c. chez la souris, soulignant l'importance que peut représenter la taille et/ou le type de revêtement dans l'élimination des AgNP par l'organisme. Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat avec une estimation de l'excrétion de l'argent par voie fécale comprise entre 60 et 80 % 24 h après administration (Loeschner et al., 2011; Tiwari et al., 2017). L'excrétion par voie urinaire est très faible, avec une proportion de la dose administrée estimée à moins de 0,5 % (Bergin et al., 2016; Loeschner et al., 2011; Yun et al., 2015).

Bien que faible comparativement aux doses administrées, la bioaccumulation de l'argent est également conditionnée par la chronicité d'exposition et s'effectue dans différents organes, en fonction également de la concentration et de la forme d'argent ingéré. Les AgNP de petite taille (22 nm) se retrouvent dans la majorité des organes (foie, rate, rein, cerveau, testicules ; Park et al., 2010). Il est à noter également que l'argent ionique (nitrate ou acétate d'argent), inclus parfois dans la stratégie expérimentale comme contrôle, se distribue dans les tissus plus facilement que les AgNP (Loeschner et al., 2011; Qin et al., 2017), celui-ci pouvant par la suite former *de novo* des AgNP (Juling et al., 2016).

Le type d'organe présentant une bioaccumulation significative de l'argent varie fortement en fonction des études et des conditions expérimentales testées. Le foie (Gan et al., 2020; Qin et al., 2017), les reins et la rate (Hendrickson et al., 2016) sont des organes d'accumulation privilégiée. À titre d'exemple, il a été retrouvé chez le rat, exposé oralement pendant 28 jours à 1 mg/kg p.c./jour d'AgNP vs AgNO₃, la présence d'argent principalement dans le foie (d'environ 150 et 350 ng/g tissu sec pour AgNP et AgNO₃, respectivement), mais également en moindre quantité dans les reins, la rate et les testicules (entre 50 et 100 ng/g tissu) (Qin et al., 2017). L'argent, parfois sous sa forme nanoparticulaire, a également été détecté dans le cerveau (Da browska-Bouta et al., 2016; Park et al., 2010; Skalska et al., 2020) et les poumons (Hong et al., 2014; Park et al., 2010).

De par leur proximité immédiate avec la lumière intestinale, les tissus du tractus digestif, en particulier l'iléon et le duodénum, présentent une accumulation relativement importante d'argent, pouvant varier entre une dizaine de ng et une dizaine de µg/g de tissu sec, en fonction des conditions expérimentales (Bergin et al., 2016; Chen et al., 2017; Garcia et al., 2016; Juling et al., 2016; Loeschner et al., 2011). Des AgNP ont également pu être mises en évidence par MET-EDX dans la *lamina propria* de l'iléon (Jeong et al., 2010; Loeschner et al., 2011).

La présence d'argent sous forme nanoparticulaire et/ou ionique dans les différents organes, mais également durant le transit intestinal, peut induire une toxicité vis-à-vis des cellules à la fois eucaryotes et procaryotes, et dont les mécanismes sont abordés plus en détail dans la section suivante.

2. Toxicité de l'argent sous sa forme nanoparticulaire et/ou ionique

2.1. Mécanismes de toxicité cellulaire

Différents mécanismes sont impliqués dans la toxicité induite par l'argent dans les cellules, qu'elles soient eucaryotes ou procaryotes. Ces mécanismes, pour lesquels la part due à la forme AgNP *per se* ou à l'argent ionique n'est pas encore clairement définie, sont 1) l'interaction avec les parois et les membranes, leur déstabilisation puis l'entrée de l'argent, 2) l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS, abréviation de l'anglais "Reactive Oxygen Species") et 3) l'interaction avec différentes biomolécules à l'intérieur de la cellule, pouvant induire des effets génotoxiques ainsi qu'une inhibition de la signalisation et la respiration cellulaire (Figure 26). Nous allons nous pencher plus spécifiquement sur la comparaison des mécanismes impliqués entre les cellules bactériennes et les cellules de mammifères.

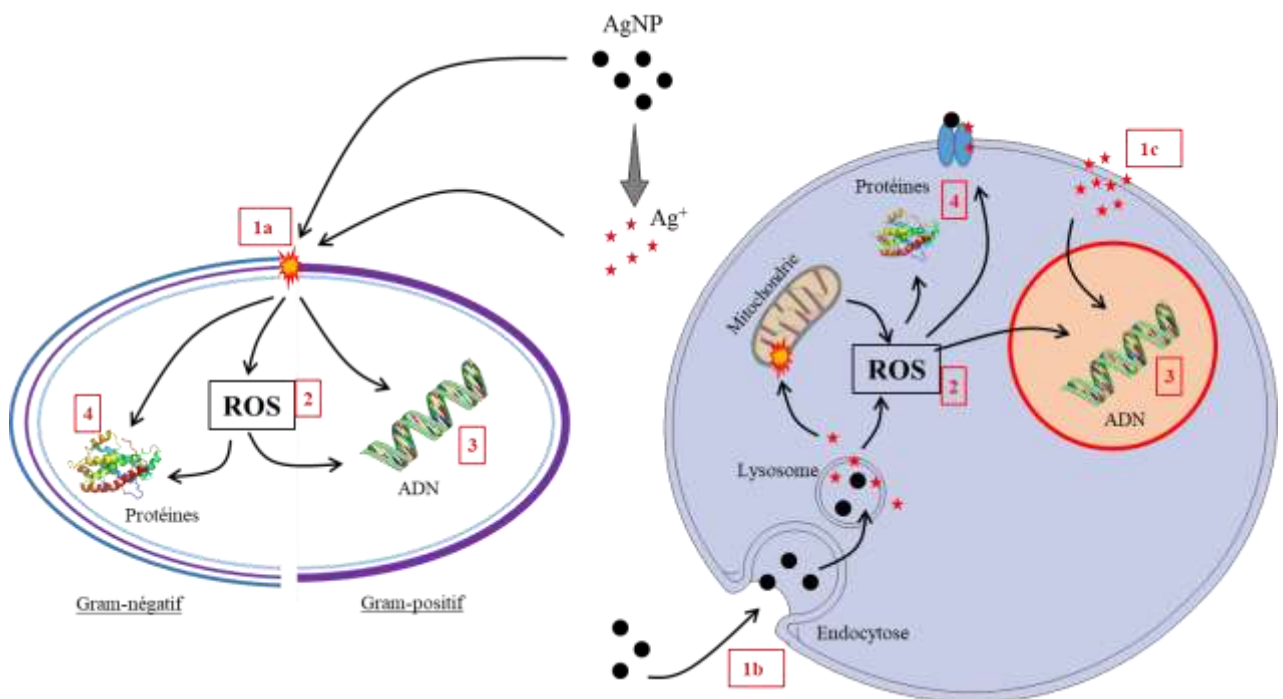


Figure 26 : représentation schématique des mécanismes de toxicité induits par l'argent nanoparticulaire (AgNP) et/ou ionique (Ag⁺) sur la cellule bactérienne (à gauche) et la cellule de mammifère (à droite).

Les AgNP et l'Ag⁺ peuvent induire des altérations directes de la membrane (1a), entrer dans la cellule par endocytose (1b) ou par diffusion (1c). L'entrée d'argent dans la cellule peut conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (2) directement ou indirectement et entraîner un stress cellulaire. Des mécanismes de génotoxicité peuvent être induits directement par l'argent ou par les ROS (3). De plus, la réactivité de l'argent et des ROS vis-à-vis des protéines provoque des altérations protéiques et des dysfonctionnements dans la signalisation et la respiration cellulaire (4).

2.1.1. Interaction et entrée de l'argent dans les cellules

Le premier élément à considérer dans l'induction de la toxicité de l'argent, sous sa forme nanoparticulaire et/ou ionique, est son interaction avec la membrane/paroi des cellules, notamment décrite chez les bactéries en tant qu'étape initiale de fragilisation voire de destruction de l'enveloppe externe (Anuj et al., 2019; Bondarenko et al., 2013; El Badawy et al., 2011; Wigginton et al., 2010). Cette interaction est fortement dépendante du potentiel zêta des nanoparticules, les AgNP-citrate (-40 mV) ayant démontré une activité antibactérienne plus faible que les AgNP-PVP (-10 mV), due à une répulsion électrostatique plus forte avec la paroi de bactéries à Gram positif *Bacillus* (El Badawy et al., 2011). Cette interaction est également assurée par l'interaction des AgNP avec les groupements thiols des protéines présentes à la surface bactérienne (Lok et al., 2006), pouvant mener à une inhibition des enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire (Wigginton et al., 2010). De plus, l'altération de la paroi cellulaire est fortement dépendante de la libération d'Ag⁺, étant favorisée dans un environnement qui contient de l'oxygène et rendant, de ce fait, les bactéries aérobies plus sensibles que les bactéries anaérobies (Lu et al., 2013).

De manière générale, la composition de la paroi diffère entre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif possèdent, en effet, une épaisse couche de peptidoglycane (30-100 nm) et une membrane cytoplasmique, tandis que la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif se compose de deux membranes cellulaires, séparées par une fine couche de peptidoglycane de quelques nanomètres d'épaisseur (Silhavy et al., 2010). Il a été montré dans certaines études une sensibilité accrue des bactéries à Gram négatif comparativement à leurs homologues à Gram positif, estimant que l'épaisseur de la couche de peptidoglycane de ces dernières pourrait favoriser leur résistance à l'argent (Jung et al., 2008; Sütterlin et al., 2012). À titre d'exemple, l'étude de Sütterlin et al. (2012) rapporte une concentration minimale bactéricide (i.e., réduction de 99,99 % de la population bactérienne) des ions Ag⁺ 32 fois plus faible pour les bactéries à Gram négatif comparativement à d'autres bactéries à Gram positif (telles que *Staphylococcus aureus*). De plus, il existe une variabilité de réponse à l'argent (AgNP et/ou Ag⁺) au sein des bactéries d'une même « famille » vis-à-vis de la coloration de Gram. Ainsi, il a été montré une résistance plus importante de *S. aureus* comparativement à d'autres bactéries à Gram positif (Bondarenko et al., 2013). Concernant les espèces fongiques, différentes études ont mis en évidence leur interaction avec des AgNP, conduisant à l'internalisation des AgNP (Lee et al., 2018) et/ou à une altération de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique (Chwalibog et al., 2010). L'étude de Chwalibog et

al. (2010) a ainsi mis en évidence par MET la libération de contenu, probablement cytoplasmique, chez *C. albicans* après une exposition à des AgNP de taille comprise entre 2 et 35 nm. Les mécanismes impliqués sont cependant encore méconnus et la revue récente de Jesmin and Chanda (2020) a suggéré que l'interaction des AgNP avec la paroi cellulaire des espèces fongiques pourrait s'effectuer via des liaisons hydrogènes, électrostatiques ou encore de van der Waals.

Dans le cas des cellules de mammifères, l'entrée de l'argent s'effectue au travers de la membrane plasmique, une bicouche lipidique d'une épaisseur de 7 à 8 nm (Casares et al., 2019). L'entrée des AgNP dans la cellule est principalement médiée par endocytose (Greulich et al., 2011; Wu et al., 2019). Les endosomes contenant les AgNP vont alors se transformer en lysosomes dont l'environnement acide va favoriser la libération d'Ag⁺ délétère pour la cellule (Mao et al., 2016). Des mécanismes de diffusion passive des AgNP et Ag⁺ à travers la membrane cytoplasmique pourraient également intervenir (AshaRani et al., 2009; Trbojevich et al., 2016).

2.1.2. *Stress oxydant*

Le stress oxydant est un déséquilibre entre la production de ROS et les capacités antioxydantes de la cellule. Les ROS sont des espèces chimiques présentant un électron libre sur la couche périphérique de l'atome d'oxygène qui les compose. L'anion superoxyde (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou encore le radical hydroxyle (OH[•]) en sont des exemples clés (Lushchak, 2014). Les ROS sont principalement produits dans les mitochondries des cellules au cours de la respiration cellulaire. Au cours de la réduction de l'oxygène, une partie de celui-ci est converti en O₂^{•-} extrêmement réactif. Ces radicaux vont être pris en charge par les superoxydes dismutases (SOD) pour former de l'H₂O₂, celui-ci va à son tour être pris en charge par la catalase (CAT) pour former de l'H₂O et O₂ ou par la glutathion peroxydase (GPx) qui catalyse sa réduction par le glutathion (GSH), une molécule au fort pouvoir réducteur (Gaucher et al., 2018; Lushchak, 2014). En condition physiologique, les ROS jouent un rôle de signalisation important et leur production est finement régulée par les capacités antioxydantes de la cellule (Valko et al., 2007). Cependant, lorsque la quantité de ROS devient trop importante, les mécanismes antioxydants mis en jeu par la cellule ne sont plus suffisants. Dès lors, les ROS réagissent avec leur environnement causant des dommages cellulaires tels que l'oxydation des protéines et de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire si la réponse cellulaire au stress est insuffisante (Carrière et al., 2006).

Le stress oxydant est régulièrement avancé comme mécanisme majeur dans l'effet cytotoxique des AgNP (Böhmer et al., 2012; Chen et al., 2016; Kruszewski et al., 2013), notamment par l'activation de la voie NRF2/HO-1 (*Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2/Heme Oxygenase-1*), impliquée dans la régulation de l'expression des gènes codant pour des fonctions antioxydantes (Aueviriyavit et al., 2014; Polet et al., 2020). Polet et al. (2020) ont mis en évidence qu'un inhibiteur de HO-1 (ML-385) bloque l'induction de la cytotoxicité induite par les AgNP sur des cellules Caco-2 différenciées. Cependant, d'autres études ne relèvent qu'une faible activation de la réponse au stress oxydant causé par les AgNP (Song et al., 2014), voire aucune (Abbott Chalew and Schwab, 2013; Georgantzopoulou et al., 2016).

L'induction du stress oxydant est également un mécanisme majeur dans l'activité antibactérienne des AgNP et de l'Ag⁺. En interagissant avec les groupements thiols des protéines, ces derniers perturbent la chaîne respiratoire et induisent une augmentation de la concentration de ROS menant à de nombreux dommages et finalement à la mort de la cellule bactérienne (Li et al., 2016; Liao et al., 2017). Ce mécanisme n'est observé que pour les bactéries qui possèdent un métabolisme aérobie, l'ajout d'antioxydants dans le milieu de culture prévenant ces effets (Xu et al., 2012).

2.1.3. Génotoxicité

Le terme générique de génotoxicité fait référence aux dommages causés à l'ADN. Ces dommages à l'ADN peuvent correspondre à des mutations, à la formation d'adduits à l'ADN, à l'oxydation des bases d'ADN, à des cassures simples ou doubles brins, ainsi qu'à des modifications structurelles de l'ADN (Magdolenova et al., 2014).

Différentes approches peuvent être utilisées pour déterminer la génotoxicité d'un composé *in vitro* (Corvi and Madia, 2017). Le test de Ames permet de mettre en évidence des mutations ponctuelles en utilisant différentes souches bactériennes (*Salmonella typhimurium*, *E. coli*). Le test de comète, technique d'électrophorèse sur gel d'agarose, est le plus largement utilisé pour évaluer les cassures simples et doubles brins de l'ADN. L'identification de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ H2AX) est également une approche couramment admise pour l'identification des cassures doubles brins (Bonner et al., 2008; Rogakou et al., 2000). Enfin, l'identification des micronoyaux formés lors de l'anaphase de la division cellulaire permet, quant à elle, d'identifier les anomalies chromosomiques.

Les capacités génotoxiques des nanoparticules, dont les AgNP, et les mécanismes associés ne sont à ce jour que partiellement identifiés. Il est toutefois admis que l'induction de génotoxicité par les nanoparticules peut être directe par interaction avec l'ADN ou indirecte par l'induction de dommages à l'ADN via la production de ROS (Kruszewski et al., 2013; Tossa et al., 2014; Vila et al., 2018). Elle semble également être dépendante des propriétés physico-chimiques des AgNP (taille, revêtement) avec une contribution partielle de la forme ionique Ag⁺ (Sahu et al., 2016).

Dans le cas d'une exposition des cellules intestinales aux AgNP, peu d'informations sont à l'heure actuelle disponibles dans la littérature. La majorité des études recensées semblent indiquer une action génotoxique des AgNP (Garuglieri et al., 2018; Kruszewski et al., 2013; Sahu et al., 2014; Vila et al., 2018), même si parfois elle n'est pas retrouvée (Böhmert et al., 2012), le test utilisé pouvant, du moins en partie, expliquer les différences constatées.

L'induction de génotoxicité a également été mise en évidence chez les bactéries exposées aux AgNP et/ou Ag⁺. En combinant de l'imagerie hyperspectrale (détection des AgNP dans la bactérie) avec de la spectroscopie Raman (liaison des AgNP avec les bases adénines, guanines et cytosines), l'étude de Vishnupriya et al. (2013) a mis en évidence chez *E. coli* que des AgNP-citrate interagissaient avec l'ADN et induisaient sa dégradation rapide. Dans cette même étude, la comparaison des effets obtenus avec les AgNP vs Ag⁺ a montré que cette interaction avec l'ADN bactérien était spécifique de la forme nanoparticulaire.

2.2. Toxicité *in vitro* de l'argent sur la fonction barrière intestinale

Aucune étude à ce jour n'a caractérisé finement l'impact de produits réels d'argent colloïdal sur la fonction barrière intestinale sur des modèles *in vitro*. Cependant, de nombreux travaux ont été menés sur des AgNP modèles, commerciales ou synthétisées en conditions de laboratoire, leurs conclusions étant fortement dépendantes des conditions expérimentales testées, mais également des propriétés intrinsèques des nanoparticules.

2.2.1. Les paramètres impliqués dans les tests de toxicité sur les cellules épithéliales

Au regard de la littérature existante sur l'effet des AgNP sur les cellules intestinales *in vitro*, une forte variabilité existe sur les concentrations pour lesquelles les premiers effets cytotoxiques sont observés. En effet, la cytotoxicité induite par les AgNP a été décrite pour des concentrations de moins de 1 µg/mL (Chen et al., 2016) ou au-delà de 100 µg/mL (Abbott

Chalew and Schwab, 2013; Lichtenstein et al., 2015; Saez-Tenorio et al., 2019) et ce, en fonction du modèle cellulaire et des conditions opératoires. De nombreux paramètres influent donc sur l'activité cytotoxique de l'argent et sont à prendre en considération afin de mieux comprendre ces effets délétères.

a) Le stade de différenciation cellulaire

Les différences importantes des cellules Caco-2 entre les états indifférencié et différencié, tant au niveau de la morphologie que de l'activité métabolique, sont des facteurs majeurs qui modulent l'activité cytotoxique des AgNP. Dans l'étude de Böhmert et al. (2012), les auteurs ont comparé la cytotoxicité induite par des AgNP de taille 20 nm sur des cellules Caco-2 indifférenciées (24 h de culture) ou différenciées (21 jours de culture) sur une durée d'exposition de 48 h. Les concentrations où les premiers effets cytotoxiques ont été observés sur les cellules différenciées étaient plus élevées (25 µg/mL) que celles mesurées pour les cellules indifférenciées (5 µg/mL). Ces différences d'effet des AgNP en fonction du stade de différenciation cellulaire, pour des conditions expérimentales identiques, ont également été retrouvées dans l'étude ultérieure de Böhmert et al. (2014).

b) La complexité du modèle cellulaire

Le modèle de coculture entre entérocytes/colonocytes et cellules caliciformes (ex. Caco-2/HT29-MTX) permet de mimer des conditions plus physiologiques, incluant la présence de mucus, comparativement à celles de cellules cultivées en monoculture (ex. Caco-2). La complexification du modèle cellulaire peut influencer l'impact cytotoxique des AgNP. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur la sensibilité des modèles de coculture aux AgNP. L'étude de Georgantzopoulou et al. (2016) ne rapporte aucun effet cytotoxique induit par des AgNP (200 nm) à une concentration de 100 µg/mL sur une coculture de cellules Caco-2/TC7 et HT29-MTX (90:10) après 24 h d'exposition, concentration pourtant démontrée comme cytotoxique dans l'ensemble des études menée sur des cellules Caco-2 dans des conditions d'exposition similaires (Juling et al., 2017; Lichtenstein et al., 2015). Comme mentionné dans notre revue (Gillois et al., 2018), [la couche de mucus est capable de piéger les AgNP de 200 nm, réduisant ainsi leur interaction avec la membrane cellulaire et entraînant des niveaux inférieurs de toxicité, de stress oxydatif, de libération d'IL-8 et d'altérations au niveau protéomique, comparativement aux AgNP de 20 nm et au nitrate d'argent (Georgantzopoulou et al., 2016)].

À notre connaissance, hormis celle de Georgantzopoulou et al. (2016), aucune autre étude n'a comparé directement les effets des AgNP sur un modèle de monoculture et un modèle de coculture avec sécrétion de mucus, dans les mêmes conditions d'exposition. En considérant l'effet d'autres nanoparticules présentes dans l'alimentation (TiO₂, SiO₂, ZnO et Fe₂O₃), l'étude de Sohal et al. (2020) a mis en évidence une sensibilité généralement accrue d'une coculture de cellules C2BBE1 (clone Caco-2) et HT29-MTX comparativement à une monoculture C2BBE1 aux nanoparticules de TiO₂ et de SiO₂, même si dans cette étude, aucune caractérisation du mucus formé dans les conditions expérimentales testées n'a été effectuée.

Ainsi l'ensemble de ces données soulignent l'importance que peut avoir le choix du modèle cellulaire ainsi que la nécessité d'une meilleure prise en considération du rôle du mucus dans l'étude des conséquences d'une exposition aux AgNP sur l'épithélium intestinal.

c) La durée d'exposition

Que ce soit sur des cellules indifférenciées ou différenciées, la très grande majorité des études ont évalué les effets d'une exposition aiguë aux AgNP, sur une durée variable de 4 h à 48 h. Seulement quelques études se sont intéressées aux effets des AgNP au cours d'une exposition, unique ou répétée, de quelques jours (Garuglieri et al., 2018; Saez-Tenorio et al., 2019) voire de plusieurs semaines (Chen et al., 2016; Vila et al., 2017). Ce scénario d'exposition, encore peu étudié, peut jouer pourtant un rôle important. À titre d'exemple, l'étude de Saez-Tenorio et al. (2019) a démontré, sur une coculture de cellules Caco-2/HT29 différenciées, un effet cytotoxique des AgNP à une concentration de 100 µg/mL, uniquement observable pour un temps d'exposition maximal de 96 h. Dans une autre étude (Chen et al., 2016), l'exposition de cellules Caco-2 indifférenciées aux AgNP au cours de 4 cycles de 5 jours (20 jours au total, avec passage des cellules entre chaque cycle) a révélé un effet cytotoxique à une plus faible concentration (0,4 µg/mL) que celle associée à une exposition aiguë de 48 h (0,7 µg/mL).

d) Les caractéristiques des AgNP

Tout d'abord, un effet dépendant de la taille des nanoparticules est décrit dans de nombreuses études (Böhmert et al., 2012; Nguyen et al., 2013; Williams et al., 2016). Dans l'étude de Böhmert et al. (2012), après 48 h d'exposition sur des cellules Caco-2 indifférenciées, un effet cytotoxique a été mesuré dès 5 µg/mL contre 50 µg/mL pour des AgNP d'une taille de 20 nm et 40 nm, respectivement. Williams et al. (2016) ont comparé la cytotoxicité induite sur des cellules HT29 après une exposition de 48 h aux AgNP de taille 10, 20, 75 ou 110 nm, et à

une même concentration de 100 µg/mL. Les auteurs ont ainsi mis en évidence une cytotoxicité inversement proportionnelle à la taille des nanoparticules, probablement en lien avec la libération taille-dépendante d'ions Ag⁺ (Bouwmeester et al., 2011).

Le revêtement des AgNP influe également sur leur cytotoxicité, les informations de la littérature ne permettant cependant pas de dégager un consensus à ce stade. En effet, Nguyen et al. (2013) ont montré un effet cytotoxique plus important des AgNP sans revêtement (concentration cytotoxique de 1 µg/mL) que pour celles recouvertes de citrate ou de PVP (concentration cytotoxique de 25 µg/mL et de 50 µg/mL, respectivement). Au contraire, Chen et al. (2016) ont décrit un effet plus marqué pour des AgNP revêtues de citrate comparativement aux AgNP sans ou avec revêtement PVP. Ces résultats ne semblent pas liés à un effet cytotoxique des composés du revêtement eux-mêmes, mais plutôt aux différences de stabilité des AgNP dans leur environnement.

En effet, la stabilité des AgNP dans le milieu cellulaire avec une oxydation potentielle en ions Ag⁺ semble jouer un rôle prépondérant dans les phénomènes observés. De nombreuses études mettent en évidence un effet cytotoxique plus important de la forme ionique de l'argent comparativement à sa forme nanoparticulaire (Abdelkhalik et al., 2020; Böhmert et al., 2012; Bouwmeester et al., 2011; Chen et al., 2016; Martirosyan et al., 2014; Nguyen et al., 2016; Van der Zande et al., 2016).

e) Le test de cytotoxicité

Les tests utilisés peuvent différer d'une étude à l'autre et avoir un impact majeur sur la détermination des concentrations cytotoxiques. Les tests les plus courants sont basés sur des mesures de l'activité métabolique cellulaire par réduction de composés, tels que le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) ou la résazurine (Cell-Titer Blue, Alamar Blue), réduits respectivement en composé coloré, le formazan ou en composé fluorescent, la résorufine. La mesure de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture, indicatrice des lésions de la membrane plasmique des cellules, est également fréquemment utilisée. D'autres techniques existent également (WST - *Water Soluble Tetrazolium*, Hoechst, rouge neutre, etc. ; Jeanmonod et al., 2018) ; certaines peuvent toutefois induire un biais dans la mesure des concentrations cytotoxiques. Dans une étude récente, Mello et al. (2020) ont, en effet, mis en évidence que les AgNP et l'Ag⁺ pouvaient avoir des interactions directes avec des réactifs tels que le MTT, en mettant en jeu des réactions d'oxydo-réduction et ainsi conduire à une surestimation ou sous-estimation des effets cytotoxiques réels.

Dans cette étude, seuls les tests Cell-Titer Blue et Alamar Blue n'ont pas montré d'interférences avec l'argent nanoparticulaire ou ionique.

2.2.2. Effets sur l'intégrité de l'épithélium intestinal

Le maintien de l'intégrité de l'épithélium est un élément clé dans l'homéostasie intestinale. Il a été montré *in vitro* que l'exposition à l'argent sous forme nanoparticulaire ou ionique peut induire une augmentation de la perméabilité épithéliale pour des concentrations cytotoxiques (Martirosyan et al., 2014; Saez-Tenorio et al., 2019), mais également non cytotoxiques (Imai et al., 2017; Williams et al., 2016). Ainsi, Williams et al. (2016) ont mis en évidence qu'une exposition de cellules T84 pendant 48 h aux AgNP, à une concentration de 20 µg/mL, induisait une diminution de la TEER, et donc une augmentation de la perméabilité para-cellulaire, pour une taille d'AgNP de 10 nm (mais pas pour une taille supérieure de 20, 75 ou 110 nm). Ces effets délétères sur la perméabilité épithéliale sans induction de cytotoxicité ont également été montrés par Imai et al. (2017) sur des cellules Caco-2. Les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la perméabilité para-cellulaire (mesurée à l'aide du marqueur fluorescent FD4 et par suivi de la TEER) inversement proportionnelle à la taille des AgNP. Cette augmentation de la perméabilité a été associée à une accumulation intracellulaire d'argent et à un passage de celui-ci à travers l'épithélium vers le compartiment basolatéral.

D'autres études n'ont pas mis en évidence de modifications de la perméabilité épithéliale intestinale, que ce soit en condition cytotoxique (Lichtenstein et al., 2015) ou en l'absence de cytotoxicité (Bouwmeester et al., 2011; Vila et al., 2018). À titre d'illustration, bien qu'une cytotoxicité induite par des AgNP (≈ 7 nm) à une concentration de 100 µg/mL ait été mesurée après 24 h d'exposition sur des cellules Caco-2 différenciées, aucune modification de la TEER n'a été retrouvée (Lichtenstein et al., 2015). Ces observations contrastées entre les différentes études s'expliquent par l'ensemble des paramètres vus précédemment (taille des AgNP, stade de différenciation cellulaire, durée d'exposition etc.) et soulignent la difficulté de généraliser les effets des AgNP, sans standardiser les conditions d'exposition et d'analyse.

2.2.3. Effets sur la composition et l'activité du microbiote intestinal

Comme évoqué dans la partie 3, section 2.1 (p80), l'activité biocide de l'argent est efficace tant au niveau des bactéries à Gram positif que de celles à Gram négatif, mais également contre les levures, les champignons et les virus (Durán et al., 2016; Kędziora et al., 2018). Peu d'informations sont disponibles sur l'impact des AgNP sur le microbiote intestinal *in vitro*, et plus particulièrement chez l'Homme (Cattò et al., 2019; Das et al., 2014; Vamanu et al., 2018). Das et al. (2014) ont mis en évidence, à partir de selles de donneurs sains, des altérations quantitatives et qualitatives du microbiote bactérien fécal humain. Après 48 h d'exposition *in vitro* à des AgNP-PVP de 10 nm, une diminution de la population bactérienne totale ainsi qu'une modification de la composition du microbiote fécal, caractérisée notamment par une augmentation de l'abondance relative de *Raoultella sp.* et d'*E. coli*, ont été observées à partir d'une concentration de 25 µg/mL et jusqu'à 200 µg/mL, concentration maximale testée. Cette dysbiose s'est accompagnée de changements dans l'activité métabolique du microbiote, caractérisés par une diminution de la production de gaz et une modification du profil lipidique (lipides des membranes bactériennes). Dans cette étude, les auteurs ont attribué les effets observés à la forme nanoparticulaire de l'argent et non à sa forme ionique. En effet, les effets de l'Ag⁺, testé en parallèle sous forme AgCl, étaient distincts de ceux obtenus avec les AgNP.

L'étude de Cattò et al. (2019) a, quant à elle, évalué les effets des AgNP-citrate de 14 nm toujours sur des selles de donneurs sains, mais à une concentration plus faible (1 µg/mL) et sur une durée d'exposition de 24 h. Une variation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* a été mise en évidence, avec une augmentation des *Firmicutes* ainsi qu'une diminution de *Clostridium coccoïdes*, *Eubacterium rectale* et *F. prausnitzii*, cette dernière étant considérée comme bénéfique (Lopez-Siles et al., 2018).

2.3. Toxicité *in vivo* de l'argent : impact sur la fonction barrière intestinale

Comme pour les approches *in vitro*, aucune étude à ce jour n'a évalué l'impact de produits commerciaux d'argent colloïdal sur la fonction barrière intestinale *in vivo*. L'ensemble des études existantes, détaillées ci-après, ont utilisé des AgNP modèles ou un apport d'ions Ag⁺ (sous forme AgNO₃ principalement).

2.3.1. Effets systémiques

Pour rappel, l'EFSA a estimé l'exposition à l'argent chez l'Homme adulte à des niveaux compris entre 1,3 et 2,7 µg/kg p.c./jour (EFSA, 2016). À ce jour, aucune étude *in vivo* n'a montré chez le rongeur adulte une mortalité induite par une exposition aux AgNP, que ce soit en exposition aiguë (24-48 h) ou en exposition chronique (80-90 jours), même à très fortes doses, pouvant aller jusqu'à 5000 mg/kg p.c./jour (Maneewattanapinyo et al., 2011) et 500 mg/kg p.c./jour (Ebabe Elle et al., 2013; Kim et al., 2010), respectivement.

Cependant, certaines études rapportent une atteinte des organes (poids, altérations tissulaires) (Hendrickson et al., 2016; Hong et al., 2014; Qin et al., 2017). Ainsi, des atteintes rénales (infiltration cellulaire, altération des glomérules) ont été mises en évidence au cours d'une exposition aux AgNP à une dose de 50 mg/kg p.c./jour chez la souris sur une durée de 28 jours (Gan et al., 2020) ou encore chez le rat pendant 60 jours, avec une concentration en AgNP de 50 µg/L (Tiwari et al., 2017). Dans cette dernière étude, les altérations rénales ont été associées à une augmentation du stress oxydatif se traduisant par un effet génotoxique, ainsi qu'à l'induction d'une inflammation (Tiwari et al. 2017). En plus de l'induction d'un stress oxydant au niveau rénal, Gan et al. (2020) ont décelé ce même phénomène dans le foie, avec l'apparition d'une stéatose hépatique transitoire et d'une diminution de la concentration des transaminases sanguines.

Bien que la majorité des études ne rapportent aucune modification de la prise de poids induite par une exposition aux AgNP, certaines montrent une diminution du poids et/ou de la prise alimentaire chez les animaux traités (Ebabe Elle et al., 2013; Elsharkawy et al., 2019; Gan et al., 2020; Garcia et al., 2016). A l'inverse, seule l'étude de Dąbrowska-Bouta et al. (2016) révèle une augmentation du poids des rats après 14 jours d'exposition orale à des AgNP-citrate de 10 nm.

2.3.2. Effets sur le microbiote intestinal

Les effets des AgNP sur le microbiote intestinal ont été décrits dans la revue de Bi et al. (2020) co-écrite par l'équipe. Ainsi, une partie des études *in vivo* chez le rongeur rapportent des altérations du microbiote intestinal induites par les AgNP (Chen et al., 2017; Javurek et al., 2017; Van den Brule et al., 2016; Williams et al., 2015), alors que d'autres n'en détectent aucune (Hadrup et al., 2012; Wilding et al., 2016). Ces résultats contradictoires peuvent provenir des différences de modèle animal, de durée d'exposition, de doses administrées, de

caractéristiques physico-chimiques des AgNP, ainsi que des régions du tractus digestif analysées. Les études de Hadrup et al. (2012) et de Wilding et al. (2016), menées chez le rat et la souris, respectivement, n'ont pas mis en évidence de modifications du microbiote cœcal après 28 jours d'exposition orale à des AgNP à une dose de 9 et 10 mg/kg p.c./jour, respectivement. En revanche, chez des rats exposés pendant 13 semaines aux AgNP à une dose de 9 mg/kg p.c./jour, une altération du microbiote bactérien a été démontrée dans l'iléon, avec une modification du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* au profit des *Bacteroidetes* (Williams et al., 2015). Également dans l'iléon, une diminution des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, contenant de nombreuses espèces bénéfiques pour l'Homme (Servin, 2004), a été observée (Williams et al., 2015). La taille des AgNP joue également un rôle important, les effets délétères étant plus importants pour les AgNP d'une taille de 10 nm ou de 75 nm comparativement à celles de 110 nm (Williams et al., 2015). Une modification du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* au profit des *Bacteroidetes*, avec une diminution des lactobacilles, a également été mise en évidence dans le microbiote fécal de souris exposées oralement à des AgNP de 12 nm à une dose de 2,5 mg/kg p.c./jour pendant 7 jours (Chen et al., 2017). À l'inverse, Van den Brule et al. (2016) rapportent une augmentation du phylum des *Firmicutes* comparativement à celui des *Bacteroidetes* lors d'une exposition pendant 28 jours aux AgNP incorporées dans l'aliment, pour une dose estimée de 0,01 mg/kg p.c./jour et ce, jusqu'à 1,1 mg/kg p.c./jour. La forme des AgNP joue également un rôle important dans la dysbiose intestinale, les modifications de la composition du microbiote fécal de rat, étant différentes, au niveau de l'espèce bactérienne, en fonction de la forme cubique ou sphérique des AgNP (Javurek et al., 2017).

L'ensemble de ces données obtenues chez l'animal suggèrent que l'ingestion d'AgNP peut avoir un impact, ou non, sur la composition du microbiote intestinal en fonction des conditions expérimentales. Nous pouvons noter que, dans la majorité des cas, les doses administrées sont largement supérieures à celles associées à l'exposition humaine et que seule la composante bactérienne du microbiote intestinal est analysée et ce, malgré l'effet antimicrobien large spectre de l'argent qu'il soit nanoparticulaire ou ionique.

2.3.3. Effets sur l'épithélium et le mucus intestinal

Peu d'informations sont disponibles à ce jour sur l'effet des AgNP et/ou de l'Ag⁺ sur l'intégrité de la barrière intestinale *in vivo*. Dans l'étude de Chen et al. (2017), une exposition orale aux AgNP (12 nm) à une dose de 2,5 mg/kg p.c./jour pendant 7 jours a induit chez la souris des lésions intestinales sévères, accompagnées de diarrhées avec saignement. Chez ces

souris, la longueur de l'intestin était diminuée et la perméabilité intestinale, mesurée par FITC-dextran 10 kDa augmentée ; une infiltration lymphocytaire, avec une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α , a été démontrée. Après une exposition orale aux AgNP (3-20 nm) à des doses allant de 5 à 20 mg/kg p.c./jour sur une durée de 21 jours, l'étude de Shahare et al. (2013) a révélé sur des coupes histologiques une altération de la morphologie des microvillosités des entérocytes ainsi qu'une infiltration des cellules immunitaires dans la *lamina propria* de la muqueuse de l'intestin grêle. Cependant, d'autres études n'ont détecté aucune altération intestinale (Wilding et al., 2016), même lorsque la présence d'argent a été mise en évidence dans les tissus (Boudreau et al., 2016; Garcia et al., 2016; Hendrickson et al., 2016).

L'exposition orale aux AgNP peut également avoir un impact sur la production et les propriétés du mucus, ce point étant discuté dans notre revue (Gillois et al., 2018). [La seule étude *in vivo* évaluant l'impact sur le mucus a été réalisée chez des rats mâles et femelles exposés par voie orale à des AgNP modèles (60 nm) à une dose de 30, 300 ou 1 000 mg/kg p.c./jour pendant 28 jours (Jeong et al., 2010). Dans l'iléon, et également dans le rectum, un plus grand nombre de cellules caliciformes ont libéré leur contenu en mucus, comme le révèle la coloration AB-PAS (*Alcian Blue- Periodic Acid Schiff*), entraînant ainsi une augmentation de la quantité de mucus dans la lumière intestinale par rapport aux animaux non traités. En revanche, aucun changement significatif n'a été observé pour les cellules caliciformes du côlon proximal. En outre, les résultats par histochimie ont montré des changements dans la composition des mucines, avec une diminution des mucines neutres et acides dans les cellules caliciformes de l'iléon, du côlon et du rectum des rats exposés aux AgNP. Parmi la fraction des mucines acides, la proportion des mucines sulfatées a diminué, tandis que celle des mucines sialylées a augmenté]. Compte-tenu du dialogue entre les acteurs de la fonction barrière de l'intestin (voir Partie 2 - section 2, p48), ces modifications de la production et de la qualité du mucus pourraient avoir un impact sur la composition du microbiote et sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale. Cependant, cette dernière étude n'a pas exploré plus en détail ces différents facteurs.

Objectifs de la thèse

La consommation d'argent colloïdal, notamment en tant que complément alimentaire, représente une source d'exposition orale chronique à l'argent, sous sa forme nanoparticulaire et/ou ionique, étant donné la diversité de composition des produits disponibles dans le commerce. Sur la base des données scientifiques existantes à la fois *in vitro* et *in vivo* sur la toxicité induite par l'argent, l'ingestion de ces produits pourrait être délétère pour l'organisme et plus spécifiquement au niveau de la sphère intestinale. L'ampleur de ces effets délétères et les mécanismes associés sont étroitement liés aux propriétés complexes et évolutives des produits d'intérêt ; or les études menées jusqu'alors en nanotoxicologie ont été basées sur des nanoparticules d'argent modèles, qui sont peu représentatives des formes ingérées par le consommateur. De plus, les scénarios d'exposition à la fois *in vitro* et *in vivo* reposent généralement sur l'administration de doses élevées, elles-mêmes peu réalistes vis-à-vis de l'exposition humaine. Le choix de formes d'argent colloïdal réellement consommées ainsi que la mise en place de modèles *in vitro* et *in vivo* appropriés pour évaluer leur toxicité intestinale sont ainsi nécessaires.

Au-delà de l'impact de ces produits sur la sphère digestive en condition physiologique, à notre connaissance, aucune étude n'a exploré quelles peuvent être les conséquences d'une exposition sur une barrière intestinale, vue ici sous le triptyque épithélium/mucus/microbiote, fragilisée. Or, une telle condition physiopathologique, pouvant être notamment provoquée par un stress psychologique chronique, est observée chez une partie de la population générale, qui peut être d'autant plus sensible à une meilleure connaissance des effets de l'argent colloïdal en santé digestive.

Face à ce constat, les objectifs de mon travail de thèse ont été d'évaluer les conséquences d'une exposition orale à deux produits d'argent colloïdal disponibles dans le commerce sur l'interrelation entre l'épithélium, le mucus et le microbiote intestinal en condition de fonction barrière digestive intègre ou fragilisée par l'application d'un stress psychologique. En collaboration avec l'Unité « Biopolymères Interactions Assemblages » (BIA), de l'INRAE de Nantes, nous avons sélectionné les deux produits suivants : la suspension Mesosilver™, vendue par Purest Colloids (Etats-Unis) et précédemment décrite dans la littérature en termes de composition notamment sur sa fraction nanoparticulaire, et la suspension « AgC »

commercialisée par le laboratoire Bio Colloïdal (France) et à ce jour jamais étudiée. Le projet de thèse a été scindé en deux volets complémentaires.

Le premier volet (Partie 1), récemment valorisé sous forme d'un article scientifique dans *Science of the Total Environment*, a été basé sur l'exploration *in vitro*, sur deux modèles cellulaires intestinaux, des effets toxicologiques des produits Mesosilver™ et AgC après une caractérisation physico-chimique complète des formes natives et après contact avec le milieu de culture cellulaire. Un scénario d'exposition répétée de plusieurs jours (tous les deux jours pendant 18 jours), à de faibles concentrations, a été mis au point puis testé sur des cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 en monoculture ou en coculture avec des cellules HT29-MTX productrices de mucus. L'effet des deux produits sur la viabilité cellulaire, la perméabilité de l'épithélium intestinal ainsi que la production de mucus a été déterminé sur des cellules en cours de différenciation, grâce à l'utilisation de différents systèmes de culture (plaques, inserts de type Transwell). La génotoxicité a, quant à elle, été évaluée sur des cellules en prolifération lors d'une exposition aiguë. L'absorption, la localisation intracellulaire et la translocation de l'argent sur certains de ces modèles ont été caractérisées par des techniques d'imagerie à haute résolution (CytoViva™, HIM-SIMS ; collaboration avec le *Luxembourg Institute of Science and Technology – LIST*) et de quantification de l'argent à haute sensibilité (ICP-MS, collaboration entre l'Unité Biopolymères Interactions Assemblages, l'Institut des Matériaux Jean Rouxel de et le Laboratoire de Planétologie et Géodynamique, UMR 6112).

Le second volet *in vivo* (Partie 2) a été mené chez la souris mâle adulte C57BL/6N. Deux scénarios d'exposition sub-chronique de 28 jours ont été testés pour 1) déterminer la biodistribution de l'argent, provenant des deux produits Mesosilver™ et AgC, en condition physiologique dans différents organes, tissus et contenus intestinaux par une exposition maximisée d'environ 3 mg/kg p.c./jour via la boisson ; et 2) évaluer la toxicité de ces mêmes produits en condition représentative de l'exposition humaine, par bolus (gavage) d'une dose de 0,15 mg/kg p.c./jour sur une fonction barrière intestinale intègre (condition physiologique), mais également fragilisée par l'application du stress psychologique chronique WAS. Sur les deux scénarios d'exposition, l'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge a permis d'évaluer de manière très originale les modifications organiques globales induites par les différentes conditions testées. Sur l'étude de la biodistribution, la concentration d'argent dans les différents organes, tissus et contenus a été mesurée par ICP-MS pour les deux formes administrées (Mesosilver™ et AgC) et le devenir ainsi que les propriétés physico-chimiques de l'argent après digestion ont été déterminés sur le produit Mesosilver™ par cartographie en

fluorescence X et spectroscopie d'absorption X, en collaboration avec le Synchrotron SOLEIL. Sur l'étude de la toxicité *in vivo*, les différents acteurs de la fonction barrière intestinale ont été analysés pour l'ensemble des animaux traités (stress psychologique et/ou stress chimique sous la forme d'argent colloïdal Mesosilver™ et AgC) pour dégager d'éventuels effets synergiques. Nous avons ainsi mesuré la perméabilité de l'épithélium *in vivo* (FITC-Dextran 4 kDa), les caractéristiques du mucus (épaisseur du mucus colique, profil de O-glycosylation des mucines coliques et jéjunales, en collaboration avec l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle - UGSF) ainsi que les niveaux d'inflammation intestinale via le marqueur colique lipocaline-2. L'ensemble a été complété par le profil d'expression génique par RT-qPCR dans le jéjunum et le côlon d'une large gamme de gènes impliqués dans l'intégrité de l'épithélium intestinal (*Zo1*, *Ocln*, *Cln1*, *Cln2*, *Cln5*, *JamA*), la production de peptides antimicrobiens (*Lyz*, *Camp*), l'inflammation (*Tnfa*, *Il1β*, *Il6*), ainsi que dans la voie de biosynthèse et de sécrétion du mucus (*Muc1*, *Muc2*, *Muc3*, *Muc4*, *Tff3*). Enfin, en collaboration avec l'Institut Micalis, les caractéristiques des microbiotes bactérien et fongique ont été évaluées au niveau des fèces pour l'ensemble des animaux exposés au stress chimique et/ou psychologique.

Résultats expérimentaux

Partie 1

Exposition répétée des modèles cellulaires intestinaux Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX au (nano)argent : comparaison de deux produits d'argent colloïdal disponibles dans le commerce

Kévin Gillois, Charlotte Stoffels, Mathilde Lévêque, Isabelle Fourquaux, Justine Blesson, Valérie Mils, Sébastien Cambier, Julien Vignard, Hélène Terrisse, Gladys Mirey, Jean-Nicolas Audinot, Vassilia Théodorou, Marie-Hélène Ropers, Hervé Robert, Muriel Mercier-Bonin

Publié dans Science of the Total Environment

[DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.142324](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142324)

L'argent colloïdal correspond à une large gamme de produits, vendus notamment en tant que compléments alimentaires pour leurs effets supposés sur la santé humaine. L'ingestion de ces produits augmente le risque d'exposition aux nanoparticules d'argent (AgNP) et/ou à l'argent ionique (Ag⁺). L'objectif de cette étude a été d'évaluer puis de comparer *in vitro* la toxicité de deux produits d'argent colloïdal disponibles dans le commerce (Mesosilver™ et AgC) sur deux modèles d'épithélium intestinal dans des conditions représentatives de l'exposition chez l'Homme (i.e., exposition chronique à faible concentration).

Une caractérisation physico-chimique des deux produits d'intérêt a été effectuée sous leur forme native et après dilution dans le milieu de culture cellulaire. Une exposition répétée de 18 jours a été réalisée sur des cellules Caco-2 en cours de différenciation, seules (monoculture) ou en coculture (90:10) avec des cellules HT29-MTX sécrétant du mucus, sur une large gamme de concentrations comprise entre 0 et 12 µg/mL pour déterminer les effets du Mesosilver™ et de l'AgC sur la viabilité cellulaire en conditions de culture sur plaques. Des expérimentations complémentaires ont été menées sur les deux produits à trois concentrations (0,1, 1 et 3 µg/mL) testées sur les cellules cultivées sur plaques ou inserts Transwell afin de mesurer l'impédance cellulaire, la viabilité cellulaire et la résistance électrique trans-épithéliale. L'absorption, la localisation intracellulaire et la translocation de l'argent ont été évaluées par CytoViva™, HIM-SIMS (*Helium Ion Microscope- Secondary Ion Mass Spectrometry*) et ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). De plus, l'effet génotoxique du

Mesosilver™ et de l'AgC a été déterminé par immunomarquage de γ H2AX sur les cellules Caco-2 non différenciées en exposition aiguë de 1, 6 et 24 h.

Les résultats obtenus montrent que l'AgC, composé uniquement d'Ag⁺, exerce des effets toxiques plus importants que le Mesosilver™, qui contient en majorité des AgNP. La stabilité de ces dernières dans le milieu de culture cellulaire a été établie, du fait de la probable formation d'un « corona » à la surface des particules. La toxicité plus élevée de l'AgC vs le Mesosilver™ se traduit à la fois en termes de génotoxicité sur les cellules Caco-2 non différenciées en exposition aiguë, et en termes de cytotoxicité et d'altération de la perméabilité intestinale sur les mêmes cellules en cours de différenciation lors de l'exposition répétée de 18 jours. La présence de mucus dans la coculture Caco2/HT29-MTX n'a que partiellement atténué les effets délétères induits par le Mesosilver™ et l'AgC sur la viabilité cellulaire, probablement en raison d'une répartition hétérogène à la surface des cellules. En outre, l'absorption, la localisation intracellulaire et la translocation d'argent sont similaires entre les deux types de produit et de modèle cellulaire.

En conclusion, les produits d'argent colloïdal Mesosilver™ et AgC présentent un niveau de toxicité différent sur l'épithélium intestinal, en raison d'une composition distincte en termes d'AgNP et d'Ag⁺. Cette étude met ainsi en évidence la nécessité d'une meilleure connaissance des produits d'argent colloïdal disponibles dans le commerce ainsi que d'une évaluation approfondie de leur toxicité sur la sphère intestinale et plus largement sur l'organisme.



Repeated exposure of Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX intestinal cell models to (nano)silver *in vitro*: Comparison of two commercially available colloidal silver products



Kévin Gillois^a, Charlotte Stoffels^b, Mathilde Leveque^a, Isabelle Fourquaux^c, Justine Blesson^a, Valérie Mils^a, Sébastien Cambier^b, Julien Vignard^a, Hélène Terrisse^d, Gladys Mirey^a, Jean-Nicolas Audinot^b, Vassilia Theodorou^a, Marie-Hélène Ropers^c, Hervé Robert^a, Muriel Mercier-Bonin^{a,*}

^a Toxalim, Université de Toulouse, INRAE, INP-ENVT, INP-EI-Purpan, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France

^b Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), 41, rue de Brill, Belvaux L-4422, Luxembourg

^c Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, CMEAB, 133 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

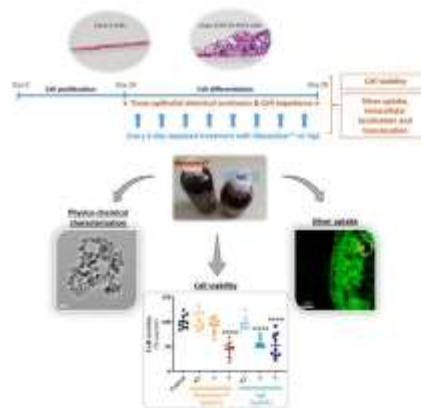
^d Université de Nantes, CNRS, Institut des Matériaux Jean Rouxel, IMN, F-44000 Nantes, France

* INRAE, UR BIA, F-44316 Nantes, France

HIGHLIGHTS

- Mesosilver™ and AgC products have different silver composition and gut toxicity.
- Repeated low-dose exposure regimen better mimics human exposure.
- Mesosilver™ and AgC are able to induce genotoxicity in Caco-2 cells.
- AgC exerts the most deleterious effects in Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells.
- CytoViva™ and HIM-SIMS imaging demonstrates silver uptake for Mesosilver™ and AgC.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2020

Received in revised form 7 September 2020

Accepted 8 September 2020

Available online 17 September 2020

Editor: Damia Barcelo

Keywords:

Colloidal silver

Silver nanoparticles

Repeated exposure *in vitro*

Gut toxicity

ABSTRACT

Colloidal silver products are sold for a wide range of disinfectant and health applications. This has increased the potential for human exposure to silver nanoparticles (AgNPs) and ions (Ag^+), for which oral ingestion is considered to be a major route of exposure. Our objective was to evaluate and compare the toxicity of two commercially available colloidal silver products on two human intestinal epithelial models under realistic exposure conditions. Mesosilver™ and AgC were characterized and a concentration range between 0.1 and 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chosen. Caco-2 cells vs. co-culture of Caco-2 and mucus-secreting HT29-MTX cells (90/10) were used. Repeated exposure was carried out to determine cell viability over 18 days of cell differentiation in 24-well plates. Selected concentrations (0.1, 1, and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were tested on cells cultured in E-plates and Transwells with the same repeated exposure regimen, to determine cell impedance, and cell viability and trans-epithelial electrical resistance (TEER), respectively. Silver uptake, intracellular localisation, and translocation were determined by CytoViva™, HIM-SIMS, and ICP-MS. Genotoxicity was determined on acutely-exposed proliferating Caco-2 cells by γH2AX immunofluorescence staining.

* Corresponding author at: Toxalim, UMR INRAE 1331, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse cedex 3, France.
E-mail address: muriel.mercier-bonin@inrae.fr (M. Mercier-Bonin).

Genotoxicity
High-resolution chemical imaging

Repeated exposure of a given concentration of AgC, which is composed solely of ionic silver, generally exerted more toxic effects on Caco-2 cells than Mesosilver™, which contains a mix of AgNPs and ionic silver. Due to its patchy structure, the presence of mucus in the Caco-2/HT29-MTX co-culture only slightly mitigated the deleterious effects on cell viability. Increased genotoxicity was observed for AgC on proliferating Caco-2 cells. Silver uptake, intracellular localisation, and translocation were similar.

In conclusion, Mesosilver™ and AgC colloidal silver products show different levels of gut toxicity due to the forms of distinct silver (AgNPs and/or Ag⁺) contained within. This study highlights the applicability of high-resolution (chemical) imaging to detect and localize silver and provides insights into its uptake mechanisms, intracellular fate and cellular effects.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) are increasingly used in a wide range of consumer products, such as cleaning products, food storage containers, personal care products, and dietary supplements (Tulve et al., 2015), as inventoried by the project on Emerging Nanotechnologies (The Woodrow Wilson International Center, 2019). The high surface area of AgNPs allows for redox-driven dissolution and the release of ionic silver (Ag⁺), which provides broad-spectrum antimicrobial properties to products (Wijnhoven et al., 2009). Among the forms consumed by humans, AgNPs may be present in colloidal silver (defined as a suspension of silver-containing particles between 1 and 1000 nm in size), commercially available as over-the-counter (OTC) drug products and proposed in the US and Europe as a dietary supplement (Reed et al., 2014; Rong et al., 2018) for the claimed benefits of supporting a healthy human immune system. Although the Food and Drug Administration (FDA) did not recognize OTC colloidal silver products as safe and effective in 1999 (FR Doc. 99–21253), the sale of colloidal silver as a dietary supplement is not prohibited, as Federal law does not require it to be proven safe or to have health benefits. In Europe, silver no longer appears on the list of vitamins and minerals authorized in food supplements (directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council in June 2002).

The intentional oral uptake of colloidal silver dietary supplements represents the most direct exposure route of silver for humans, which can result in exposure of up to 0.02 mg/kg body weight/day (Larsen et al., 2015). From a risk assessment perspective, understanding their fate, cellular uptake, and bioavailability upon ingestion is of paramount importance to assess their impact on human health. As the first line of defence, as well as the portal of entry and target for AgNPs, the gut has been extensively studied in terms of toxicological endpoints, mainly *in vitro* and under high-concentration and acute-exposure conditions. Cellular uptake, oxidative stress, cytotoxic, genotoxic, and/or inflammatory effects have been reported, despite conflicting findings, explained by different concentration ranges, *in vitro* cellular models, methods of detection, and physico-chemical characteristics of the AgNPs under study (Pietroiusti et al., 2017). However, these *in vitro* studies were mainly focused on commercially available or laboratory-synthesized nanoparticles, which are not fully representative of the ingested forms present in colloidal silver dietary supplements. Thus, it is critical to evaluate the effects of "real" ingested AgNPs, which exhibit specific physico-chemistry, behaviour, and gut toxicity, under realistic conditions that mimic human exposure (*i.e.* low dose, repeated exposure). Rogers et al. (2018) and later De Leersnyder et al. (2020) characterized large panels of commercially available silver-containing products and reported high variability in the AgNP/Ag⁺ concentration, AgNP size/shape, and AgNP/Ag⁺ ratio (De Leersnyder et al., 2020; Rogers et al., 2018), confirming previous results obtained on drinkable colloidal silver-containing products (Cascio et al., 2015). Recent studies have explored the fate of commercial colloidal silver supplements in simulated human digestive environments (Rogers et al., 2020; Rong et al., 2018; Wu et al., 2018). In particular, Mesosilver™, composed of monodisperse

spherical AgNPs (mean diameter of 9.5 ± 5.0 nm), with a 90% AgNPs/10% Ag⁺ ratio, has been shown to be much more reactive than both laboratory synthesized and commercially available AgNPs, possibly due to differences in their intrinsic physico-chemical properties (such as size and surface charge) (Rong et al., 2018). Little is known about the toxic effects of these commercially available products *in vitro*. Rogers et al. (2020) reported cytotoxicity of five commercial colloidal silver spray products, which was attributed to the particulate silver, soluble silver, and/or non-silver matrix constituents, using a rat intestinal epithelial cell (IEC-6) model. In addition, Reed et al. (2014) observed a decrease in the number of microvilli in human intestinal Caco-2 cells treated with liquid AgNP-containing dietary supplements relative to untreated cells.

Based on these data, the gut toxicity of two commercially available colloidal silver products, Mesosilver™ and AgC, was evaluated *in vitro* under realistic conditions (*i.e.* low dose and repeated exposure) to mimic human chronic exposure (Chen et al., 2016; Vila et al., 2017). Two intestinal epithelial cell models were considered and compared: (i) a Caco-2 monoculture which is a widely used model of intestinal barrier function for toxicological studies (Böhmert et al., 2015; Imai et al., 2017; Jüling et al., 2017; Lichtenstein et al., 2015; Vila et al., 2018) and (ii) a Caco-2/HT29-MTX co-culture as a more physiologically relevant intestinal model to mimic a mucus-producing epithelium (Béduneau et al., 2014; Hilgendorf et al., 2000; Lozoya-Agullo et al., 2017). Mucus is indeed the first physical and chemical barrier against toxicants (Gillois et al., 2018), particularly AgNPs (Bi et al., 2020), as illustrated in a Caco-2/HT29-MTX co-culture following 24 h of acute exposure (Abdelkhalik et al., 2020; Georgantzopoulou et al., 2016). In the present study, the following toxicological endpoints, typically used for AgNPs (Böhmert et al., 2014; Saez-Tenorio et al., 2019; Vila et al., 2018) were prioritised for the assessment of colloidal silver toxicity to Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells: cytotoxicity, genotoxicity, real-time monitoring of cell impedance, and trans-epithelial electrical resistance, as well as silver uptake, intracellular localisation, and translocation. High-resolution chemical imaging (Helium Ion Microscope coupled to a Secondary Ion Mass Spectrometer (HIM-SIMS)) was used, for the first time, in combination with CytoViva™ hyperspectral imaging, as developed to study AgNPs by Fizeşan et al. (2019).

2. Materials and methods

2.1. Colloidal silver products and chemicals

A suspension of Mesosilver™ (20 µg/mL), sold as a dietary supplement, was purchased in 2018 from Purest Colloids, Inc. (Westampton, NJ, USA). A Colloidal Silver product (15 µg/mL), sold for external use in health and disinfectant applications (hereafter referred to as AgC), was also purchased in 2018 from the Laboratoire Bio Colloidal (Saint-Fort, France). Both colloidal silver products were stored at room temperature in the dark. Phosphate buffered saline (PBS), bovine serum albumin (BSA, CAS N°9048-46-8, ≥ 98%), and Triton X-100 (CAS N°9002-93-1, ≥ 97%) were obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Dulbecco's Modified Eagle's Medium with phenol red (DMEM) 10X

(CAT#D2429) and 1X (CAT#5546), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, D-(+)-glucose (CAS N°50-99-7), sodium bicarbonate (CAS N°144-55-8, ≥ 99.7%), and folic acid (CAS N°59-30-3, ≥ 97%) were obtained from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Non-essential amino acids (NEAA), Glutamax and Tryple Express were obtained from Gibco (Illkirch, France). AlamarBlue® reagent, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG antibody, and ProLong Gold antifade reagent with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) were obtained from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Mouse anti-phospho-Histone2AX (Ser139) antibody clone JBW301 was obtained from Merck Millipore (Molsheim, France). Calicheamicin-γ1 (CAS N°108212-75-5, 98.44%) was obtained from Pfizer (Paris, France). Epon resin (Embed 812), formaldehyde solution (CAS N°50-00-0, 16%), glutaraldehyde (CAS N°111-30-8, 25%), osmium tetroxide (CAS N°20816-12-0, 4%), and Sorensen phosphate buffer were obtained from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA). HNO₃ (CAS N°7697-37-2) was obtained from ChemLab (Zedelgem, Belgique).

2.2. Physico-chemical characterization of Mesosilver™ and AgC

2.2.1. Transmission electron microscopy (TEM)

TEM was used to determine the size and shape of the AgNPs in the colloidal silver suspensions. Samples were prepared by depositing a drop of the colloidal suspension onto a carbon-coated copper grid and allowing it to air-dry at room temperature. TEM images were obtained using a Hitachi H-9000 NAR (300 kV, Scherzer resolution 0.18 nm; Tokyo, Japan) coupled to an energy dispersive X-ray spectrometer (EDX, KeveX; Valencia, CA, USA) to confirm the presence of silver. Images representative of 10 different locations and 580 particles on the grid were processed using the program Image J (National Institutes of Health) to determine the shape and size distribution of the nanoparticles.

2.2.2. Dynamic and electrophoretic light scattering

The hydrodynamic diameter and zeta potential of AgNPs in the colloidal silver products or suspended at 3 µg/mL in DMEM culture medium (with or without 2% (v/v) FBS) were determined by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS), respectively, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, Orsay, France). AgNP suspensions were kept in an incubator (37 °C, 5% CO₂/95% air) for 0 to 48 h and analysed at various timepoints. Measurements were performed in triplicate at a controlled temperature of 25 °C in a folded capillary zeta cell (Malvern) with a 633-nm laser source and a scattering angle of 173°. The intensity size distribution, diameter at the maximum peak, and polydispersity index (PDI) were determined.

2.2.3. UV-Vis spectroscopy

Modifications of the AgNP suspension (3 µg/mL) in DMEM culture medium (with or without 2% (v/v) FBS) over time were measured by UV-vis spectroscopy. The absorbance spectrum of AgNP samples from 300 to 500 nm was recorded at room temperature in UV microplates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) using a SPARK spectrophotometer (TECAN, Männedorf, Switzerland). Culture medium, with or without FBS, was used as a blank, depending on the condition to be tested. Three independent experiments were performed.

2.3. Cell lines and cell culture

The human colon adenocarcinoma Caco-2 cell line was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). The mucus-secreting colon adenocarcinoma HT29-MTX cell line was kindly provided by Dr. Thécia Lesuffeur (INSERM Lille). Cells were used at passage 49–55 and 9–15 for Caco-2 and HT29-MTX, respectively. Both cell lines were maintained in DMEM with phenol red and 4.5 g/L D-(+)-glucose, supplemented with 1% (v/v) penicillin/streptomycin, 1% (v/v) NEAA, 1% (v/v) Glutamax, and 10% (v/v) heat-inactivated FBS at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air.

The culture medium was changed every 2 to 3 days and the cells were split upon confluency using Tryple Express.

2.4. Repeated cell exposure to Mesosilver™ and AgC suspensions

A schematic representation of the experimental design is presented in Fig. S1. For all experiments with Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cultures to be performed in 24-well plates (Corning Costar, Kaiserslautern, Germany), E-plates (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France), and 6.5 mm polycarbonate membrane Transwell systems with a 0.4-µm pore size (Corning Costar), cells were seeded at 150,000 cells per cm², at a 90/10 ratio for the co-culture, and grown at 37 °C until day 10 under the culture conditions described above. At day 10, the medium was discarded and the cells washed with PBS. Then, a new culture medium was used for treatment, based on 10× DMEM and diluted to 1× with a final concentration of 4.5 g/L D-(+)-glucose, 3.7 g/L sodium bicarbonate, 0.004 g/L folic acid, 1% (v/v) penicillin/streptomycin, 1% (v/v) NEAA, 1% (v/v) Glutamax, 2% (v/v) FBS, and various concentrations of Mesosilver™ or AgC suspension (concentration range between 0.1 and 12 µg/mL; diluted with sterilized milliQ grade water). This medium was added every 2 days from day 10 for 18 days of cell differentiation. The control condition corresponded to the same treatment medium with sterilized milliQ grade water replacing the silver-containing product. At the end of the exposure period, samples were collected for further analysis.

2.4.1. Cellular viability

The AlamarBlue® assay was used to evaluate the viability of cells grown on 24-well plates or Transwells and treated with Mesosilver™ or AgC (concentrations of 0.1–12 µg/mL and 0.1, 1, and 3 µg/mL, respectively). At the end of treatment as described above, the cell culture medium was removed and the cells washed with PBS at 37 °C before adding diluted AlamarBlue® (1:10 dilution) in minimal medium (DMEM without FBS) and incubation for 3 h at 37 °C. The medium was then transferred to a microplate reader and the fluorescence immediately measured at 570 nm excitation and 610 nm emission using a SPARK spectrophotometer. Three independent experiments were performed, at least in triplicate.

2.4.2. Cell impedance

Cell impedance was monitored *in situ* and in real-time using an xCELLigence system (ACEA Biosciences, San Diego, USA). The impedance measurement is based on the effect of the cells, attached to the xCELLigence electrodes, on the local ionic environment at the electrode-solution interface. Impedance depends on the number of attached cells and their interaction with the electrodes. An increase in cell number, cell adhesion, and/or spreading results in a change in electrode impedance, which is displayed as a cell index (CI) value. Caco-2 or Caco-2/HT29-MTX cells, grown on E-plates, were repeatedly treated with the Mesosilver™ or AgC suspension (concentration of 0.1, 1, and 3 µg/mL) vs. control, as already described. Cell impedance was measured every day during the 18-day exposure period. Three independent experiments were performed in triplicate.

2.4.3. Trans-epithelial electrical resistance

The trans-epithelial electrical resistance (TEER) of Caco-2 monocultures and Caco-2/HT29-MTX co-cultures was continuously monitored using a cellZScope version 2 (nanoAnalytics, Münster, Germany). Cells were grown on Transwells in 10% (v/v) FBS medium until day 9 and transferred to the cellZScope device for a 24-h stabilization in the same medium. At day 10, basal TEER values were measured. Then, the medium was removed and cells repeatedly exposed at the apical side to the Mesosilver™ or AgC suspension (concentrations of 1 and 3 µg/mL) vs. control for 18 days, as already described. The medium from the basolateral side was replaced every 2 to 3 days with DMEM 2% (v/v) FBS at the same time as the treatment medium was refreshed.

on the apical side. TEER was monitored daily during the 18-day exposure period. Three independent experiments were performed in triplicate.

2.4.4. Silver uptake, intracellular fate and translocation from apical to basolateral compartments

2.4.4.1. Sample preparation. At the end of the exposure period (day 28) to Mesosilver™ or AgC suspension (concentration of 3 µg/mL), Transwells were fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.4) overnight at 4 °C, washed overnight in 0.2 M phosphate buffer and then post-fixed for 1 h at room temperature with 1% osmium tetroxide in 250 mM glucose and 0.05 M phosphate buffer. The samples were then dehydrated in a series of graded ethanol solutions; membranes were cut out from the wells and embedded in an Epon resin. Finally, samples were sliced into 300-nm semi-thin sections and mounted on microscope glass slides for high-resolution dark-field hyperspectral imaging (CytoViva™) and silicon wafers for high-resolution chemical imaging (Helium Ion Microscope coupled with a Secondary Ion Mass Spectrometer, HIM-SIMS).

2.4.4.2. CytoViva™. CytoViva™ analyses were carried out as previously described by Mehennaoui et al. (2018). The semi-thin layers were covered with a drop of mineral oil without the need of a cover slide, as the samples were embedded in Epon-resin, making them inert to mineral oil. The samples were visualized using a CytoViva™ dark-field hyperspectral imaging system (CytoViva Inc., Auburn, Alabama, USA) mounted on Olympus BX-43 optical microscope. Images of the samples were captured at 60-fold magnification with oil immersion using a hyperspectral camera controlled by environment for visualization ENVI software (version 4.8 from Harris Corporation, Melbourne, FL, USA and modified by CytoViva™, Inc.). Spectral libraries of exposed cells were manually generated, with approximately 200 spectra acquired per sample. Acquired libraries were filtered against non-exposed samples to filter out all spectra non-related to AgNPs or Ag colloids using a spectral angle mapper (SAM) algorithm with a 0.05-radian tolerance. Filtered libraries were mapped onto images of exposed samples using SAM with a 0.05-radian tolerance, which allows highlighting similarities between the spectra in the image and spectral library. The signature of AgNPs and/or Ag colloids was artificially red-tagged using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). One sample for each condition was used for image analysis.

2.4.4.3. Helium Ion Microscope coupled with a Secondary Ion Mass Spectrometer (HIM-SIMS). Secondary Ion Mass spectrometry (SIMS) images were acquired with a HIM-SIMS (Zeiss, Peabody, US) using Ne⁺ primary bombardment accelerated at 20 keV. The lateral resolution was in the range 20 to 30 nm, with an intensity of 1.5 pA. Both polarities, positive and negative, were used for the respective detection of ion silver (¹⁰⁷Ag⁺) and the ion cluster ¹²C¹⁴N⁻. Images were recorded as a matrix of 512 × 512 image points with a counting time of 5 ms/pixel. One sample for each condition was used for image analysis.

2.4.4.4. Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS). Silver (AgNPs and/or ionic silver) translocation from the apical to basolateral compartments was determined by measuring the silver concentration in both compartments by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS). At the end of the exposure period (day 28) to Mesosilver™ or AgC suspension (3 µg/mL), all the medium from the apical (300 µL) and basolateral (800 µL) compartments of each Transwell was collected into 1.5 mL microtubes. Samples were concentrated by evaporation with a SpeedVac concentrator (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) at 35 °C for 2 h and stored one week at -80 °C before use. Samples were then digested in 65% HNO₃ for 30 min to obtain a perfectly clear solution and then water was added to obtain a 2% HNO₃ solution for ICP-MS-Q analysis (Varian 820-MS quadrupole inductively-coupled plasma spectrometer; Melbourne, Australia). Measurements on two samples for

each condition were performed in the Laboratoire de Planétologie et Géodynamique (LPG Nantes laboratory, UMR 6112, France). The total silver concentration was determined by external calibration using certified single-element reference standard solutions (IONEX reference standard from ChemLab, Zedelgem, Belgium at 1000 µg/mL). Each standard was prepared to obtain a 2% HNO₃ solution, as for the samples. Two isotopes of silver were analysed (¹⁰⁷Ag and ¹⁰⁹Ag) and gave consistent results. ¹¹⁵In was used as an internal standard.

2.5. DNA damage analysis

DNA damage in proliferating Caco-2 cells was detected using antibodies against phosphorylated histone H2AX (γH2AX), a marker of DNA double-strand breaks (DSBs) (Bonner et al., 2008; Rogakou et al., 2000). First, 150,000 Caco-2 cells/cm² were seeded on coverslips. After 24 h to allow attachment, the cells were exposed for 1, 6, or 24 h to 0.1, 1, or 3 µg/mL Mesosilver™ or AgC suspension. Exposure to 500 f. calicheamicin was used as a positive control for inducing genotoxicity. At the end of treatment, cells were immediately fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. After PBS washing, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100, washed in PBS, and blocked in PBS with 1% BSA overnight. After blocking, cells were incubated with mouse anti-phospho-Histone2AX (Ser139) antibody clone JBW301 at a 1:1000 dilution, followed by incubation with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG antibody at a 1:100 dilution. Coverslips were mounted using ProLong Gold antifade reagent with DAPI to counterstain the nuclei. Slides were visualized under a 40× objective on a Leica TCS SP8 AOBS inverted confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). The number of γH2AX positive cells, expressed as the percentage of the total cell number, was calculated, based on the determination of a threshold of γH2AX intensity for untreated cells. The intensity of γH2AX was compared to this threshold for each treated cell, visualized with DAPI staining. A minimum of 50 cells per image and eight images for each condition were analysed in a blinded fashion.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± standard error (SD). Statistical significance was calculated using one-way or two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test using GraphPad Prism software version 8.3 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered statistically significant for a *p*-value <0.05.

3. Results

3.1. Characterization of Mesosilver™ and AgC suspensions in pure form and diluted in cell-culture medium

The physico-chemical properties of Mesosilver™ (20 µg/mL) and AgC (15 µg/mL) suspensions, in their pure form or diluted in culture medium (containing or not FBS 2% (v/v)), were monitored. Various techniques were used in parallel. TEM provided information about the core size, shape, and agglomeration state of the AgNPs. UV-vis spectroscopy made it possible to follow the surface plasmon resonance peak (SPR) of the AgNPs. In addition, the hydrodynamic diameter was established by DLS, while the zeta potential was determined by ELS.

In its pure form, the Mesosilver™ suspension had a brown colour, with a strong absorption peak at a maximum wavelength (λ_{max}) of 396 nm, as a result of plasmon resonance, characteristic of metal nanoparticles (Ashkarran et al., 2012; Gao et al., 2017) (Fig. 1C). As observed in TEM images, the AgNPs were spherical (Fig. 1A), with a diameter between 4 and 31 nm (Fig. 1B). Their mean diameter was 12.0 ± 4.1 nm, while the hydrodynamic size distribution was multimodal, with a large peak between 10 and 300 nm and a diameter at the maximum peak of 79 nm (Table S1 and Fig. 1D). The zeta potential at the intrinsic pH of the Mesosilver™ suspension (pH = 7.3) was -30.1 ± 4.8 mV. The AgC

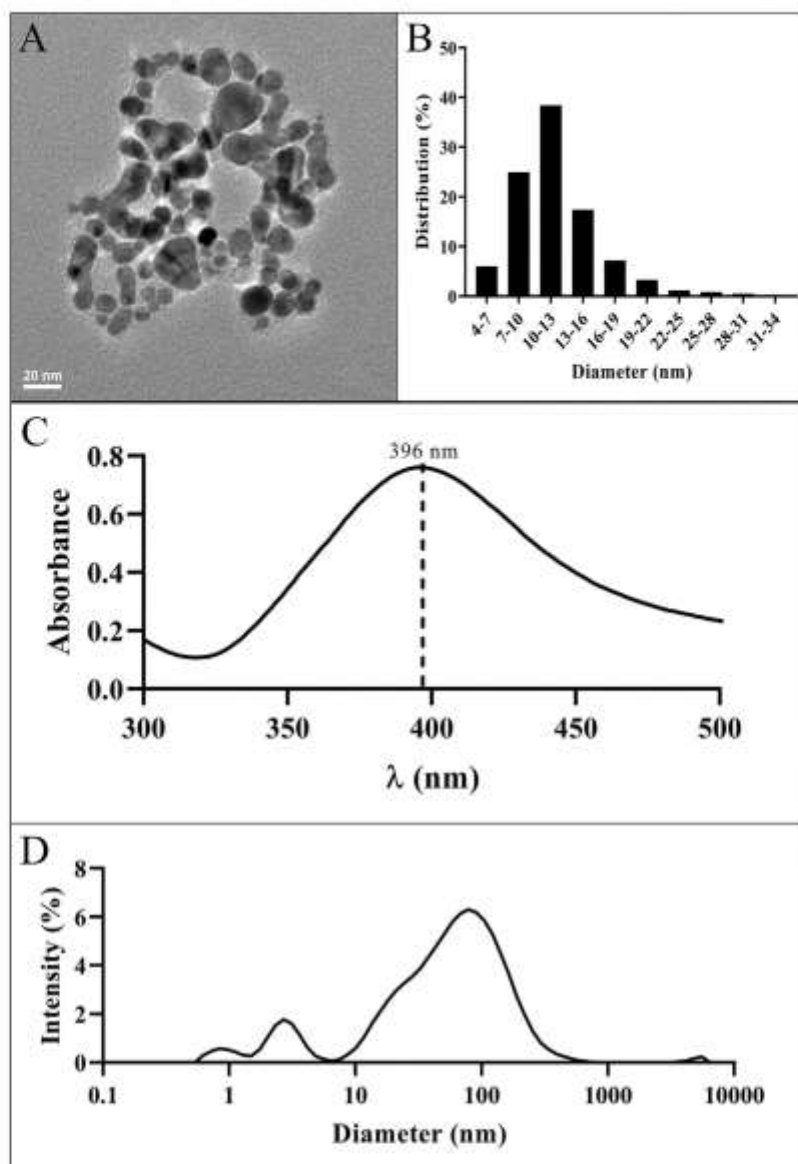


Fig. 1. Physico-chemical characterization of commercial colloidal silver Mesosilver™ in its pure form. (A) Representative TEM image of AgNPs and (B) Core size distribution of AgNPs based on diameters measured on TEM images. (C) UV-vis spectrum with the maximum absorption wavelength (λ_{max}) labelled. (D) Hydrodynamic diameter distribution of AgNPs obtained from DLS measurements.

suspension was uncoloured and exclusively composed of ionic silver with no AgNPs observed by TEM or UV-vis spectroscopy (data not shown).

The modifications that occurred to the AgNPs, present in the Mesosilver™ suspension and diluted to a concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the cell culture medium, containing or not 2% (v/v) FBS, were regularly monitored for a 48-h contact period (Fig. S2). In contact with the culture medium, the λ_{max} value at $t = 0$, initially 396 nm in pure form, increased slightly, reaching 402 and 408 nm, with or without 2% (v/v) FBS, respectively (Fig. S2B and A). The absorbance of Mesosilver™ only slightly decreased after 24 h of exposure to the culture medium with 2% (v/v) FBS, which was accompanied by a redshift of λ_{max} from 402 to 416 nm (Fig. S2B). There was little change in the hydrodynamic diameter distribution (Fig. S2D), with a slight increase in the hydrodynamic diameter at the maximum peak from 79 nm at $t = 0$ to 91 nm at $t = 48$ h (Table S1). In contrast, there was a large decrease in the intensity of the Mesosilver™ absorbance peak around 400 nm over time in the culture medium without FBS (Fig. S2A), which was associated with an increase in the hydrodynamic diameter at the maximum peak

from 164 nm at $t = 0$ to 1281 nm at $t = 48$ h (Table S1, Fig. S2C). The zeta potential changed, independently of the presence of FBS in the culture medium, becoming less negative, with values reaching -9.2 ± 0.2 mV at $t = 0$ and -13.5 ± 0.3 mV at $t = 48$ h in the absence of FBS and -9.0 ± 1.0 mV at $t = 0$ and -9.7 ± 0.4 mV at $t = 48$ h, in the presence of FBS (Table S1).

3.2. Determination of cell viability of Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cell cultures during repeated exposure to Mesosilver™ and AgC suspensions

First, the effect of Mesosilver™ and AgC suspensions on cell viability in Caco-2 monocultures and Caco-2/HT29-MTX co-cultures in 24-well plates during 18 days of repeated exposure (*i.e.* every 2 days) was evaluated for a wide range of concentrations (0–12 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Both Mesosilver™ and AgC induced a loss in cell viability, as measured using the AlamarBlue® assay, in a concentration-, time-, cell model-, and colloidal silver product-dependent manner. The AlamarBlue® assay estimates the oxidative metabolism of viable cells by converting

a redox dye (resazurin) into a fluorescent end product (resorufin). Indeed, after 2 days of exposure, cell viability gradually and significantly decreased ($P < 0.001$ or $P < 0.0001$) for both Mesosilver™ and AgC at concentrations from 6 µg/mL in both monoculture and co-culture cell models (Fig. 2). Early signs of loss of cell viability were also observed at 3 µg/mL AgC for Caco-2 cells ($P < 0.0001$, Fig. 2B). A significant loss of cell viability was obtained ($P < 0.01$ or $P < 0.0001$) after 7 days of exposure, regardless of the cell model for both Mesosilver™ and AgC from concentrations of 3 µg/mL, which was further confirmed ($P < 0.0001$) after 18 days of exposure; once again, a decrease in viability was observed for AgC only from 1 µg/mL in Caco-2 monocultures ($P < 0.01$, Fig. 2B) and Caco-2/HT29-MTX co-cultures ($P < 0.05$ or $P < 0.01$, Fig. 2D). Interestingly, a significant increase in metabolic activity occurred in the Caco-2/HT29-MTX co-culture after 7 and 18 days of exposure to a low concentration of Mesosilver™ or AgC of 0.5 µg/mL ($P < 0.01$ or $P < 0.0001$, Fig. 2C and D); this was also true for the Caco-2 monoculture treated with AgC at a concentration of 0.1 or 0.5 µg/mL ($P < 0.01$, Fig. 2B).

Based on these results, further assays were carried out using Mesosilver™ and AgC at a restricted concentration range of 0.1, 1, and 3 µg/mL. Impedance measurements were performed using the xCELLigence system for the Caco-2 monoculture and Caco-2/HT29-MTX co-culture. The xCELLigence system measures the electrical impedance of cells grown on electrodes *in situ* and in real time. The electrical impedance is displayed as the change in cell index (Fig. 3), which provides information on the cell number and inherent morphological and adhesive characteristics of the cells (Solly et al., 2004). The repeated exposure of Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells to Mesosilver™ or AgC had no visible influence on the cell index for concentrations of 0.1 and 1 µg/mL. In contrast, for the highest concentration of 3 µg/mL, the cell index gradually decreased to reach statistical significance ($P < 0.001$) after 5 days of exposure on monocultures (Fig. 3A) or co-cultures (Fig. 3B), with similar profiles for the two types of colloidal silver

products. Finally, cell viability using the AlamarBlue® assay was measured for Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells cultured on Transwells after 18 days of exposure (Fig. 4A and D). For the Caco-2 monoculture, there was a significant and marked decrease in cell viability at 3 µg/mL Mesosilver™ and from 1 µg/mL AgC ($P < 0.0001$, Fig. 4A). For the Caco-2/HT29-MTX co-culture, the loss in metabolic activity occurred from 1 µg/mL, regardless of the colloidal silver-containing product, with $P < 0.0001$ for AgC and $P < 0.01$ for Mesosilver™ (Fig. 4D).

3.3. Determination of trans-epithelial electrical resistance in Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cell cultures during repeated exposure to Mesosilver™ and AgC suspensions

The measurement of TEER is classically used to assess the intestinal barrier integrity and permeability (Brun et al., 2014; García-Rodríguez et al., 2018; Vila et al., 2018). Here, TEER was monitored *in situ* and in real time using the cellZScope system for Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells grown on Transwells and repeatedly exposed to Mesosilver™ and AgC at concentrations of 1 and 3 µg/mL for 18 days. For the Caco-2 monoculture, a significant decrease in TEER ($P < 0.05$) was observed for Mesosilver™ at 3 µg/mL and AgC from 1 µg/mL (Fig. 4B and C). In contrast, TEER was not impaired by the repeated exposure of the Caco-2/HT29-MTX co-culture to Mesosilver™ (Fig. 4E) or AgC (Fig. 4F). A slight and transient increase in TEER was only recorded between the 11th and 13th day of exposure for AgC at 3 µg/mL ($P < 0.05$, Fig. 4F).

3.4. Determination of silver uptake and translocation in Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cell cultures after repeated exposure to Mesosilver™ and AgC suspensions

Silver uptake by Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells, after 18 days of repeated exposure to Mesosilver™ or AgC at a concentration of 3 µg/mL,

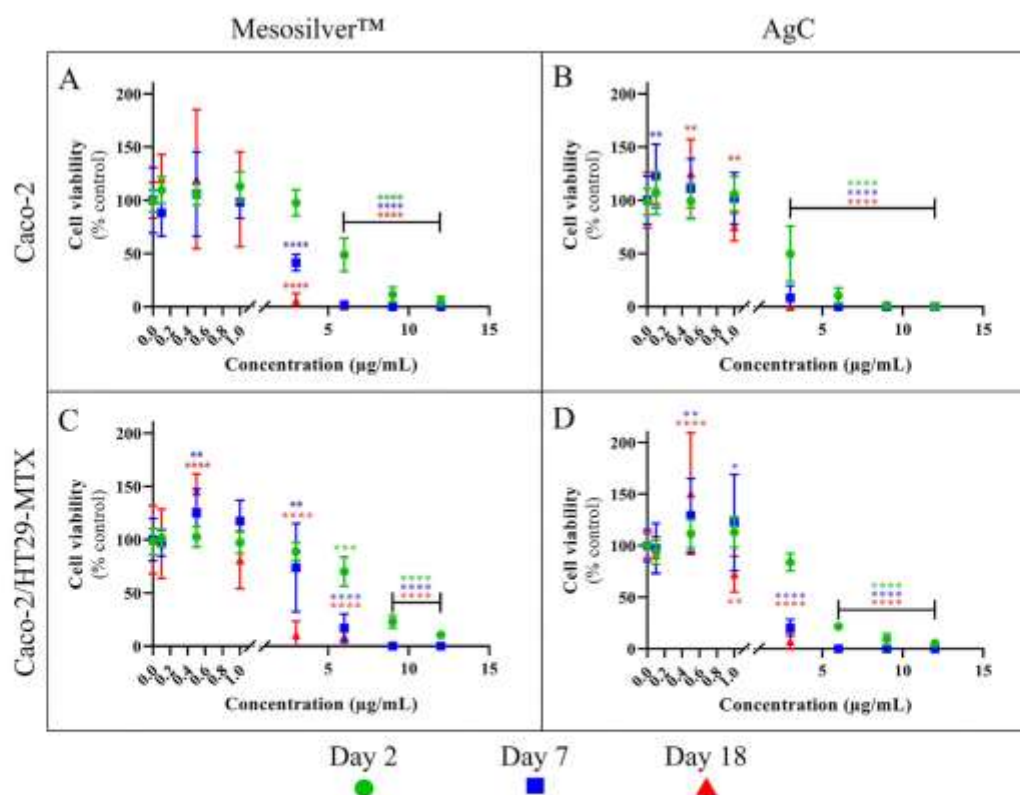


Fig. 2. Effect of colloidal silver products on cell viability for Mesosilver™ (A,C) and AgC (B,D) after 2, 7 and 18 days of repeated exposure in Caco-2 monoculture (A,B) and Caco-2/HT29-MTX co-culture (C,D) in 24-well plates. Cell viability is expressed as the percentage of that of control (untreated cells). Significant differences from untreated cells are marked with asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

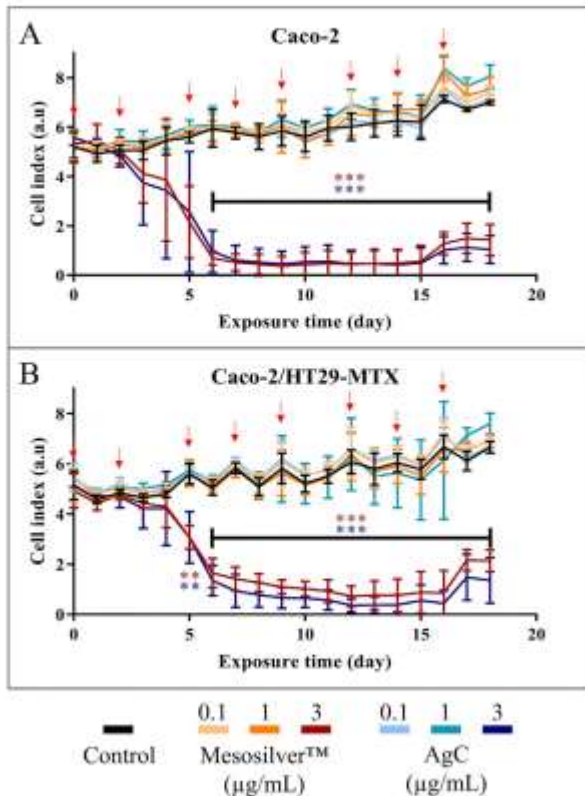


Fig. 3. Changes in the cell index measured in real-time using the xCELLigence system. Caco-2 cells (A) or Caco-2/HT29-MTX cells (B) cultured in E-plates were exposed to Mesosilver™ or AgC at each medium refreshment (red arrow) every two days for 18 days. Significant differences from untreated cells are marked with asterisks (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

was monitored by CytoViva™ hyperspectral imaging (Fig. 5). Regardless of the cell model, discrete silver spots, consisting of AgNPs and/or Ag colloids, were distributed within the cell layer, with slightly preferential accumulation at the basolateral side, in close vicinity to the Transwell surface (Fig. 5). High-resolution chemical imaging using HIM-SIMS was performed on the Caco-2 monoculture to gain further insight into the intracellular localisation of silver. The elemental distribution of $^{107}\text{Ag}^+$ and $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ in the cells is shown in Fig. 6. The distribution of the $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ cluster was chosen as a cell “fingerprint”. The intracellular presence of Ag was observed for both Mesosilver™ and AgC (Fig. 6). In addition to CytoViva™ and HIM-SIMS imaging, demonstrating silver uptake by intestinal epithelial cells, ICP-MS was carried out to evaluate silver translocation from the apical to basolateral compartments in Caco-2 monocultures and Caco-2/HT29-MTX co-cultures after the 18 days of exposure to Mesosilver™ or AgC at 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 7A and C and B and D, respectively). Silver concentrations were measured by ICP-MS in the apical (Fig. 7A and B) and basolateral (Fig. 7C and D) media. The silver concentration was close to 1000 ng/mL in the apical medium and between 1 and 2 ng/mL in the basolateral medium, regardless of the colloidal silver product and cell model (Fig. 7). Overall, these results imply that the silver present in the Mesosilver™ and AgC products was internalized and able to cross the epithelial barrier of the Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells, although it was not possible at this stage to determine in what form (i.e. AgNPs and/or ionic silver). In parallel, immunofluorescence staining of mucus in the Caco-2/HT29-MTX cells was performed using the anti-MUC5AC antibody. Mucus did not form a uniform layer over the cell surface, but rather showed a patchy structure for untreated cells (Fig. S3C), as well as cells repeatedly exposed to Mesosilver™ and AgC (Fig. S3D and E).

3.5. Evaluation of genotoxicity induced by Mesosilver™ and AgC suspensions on proliferating Caco-2 cells

The presence of DNA double-strand breaks (DSBs) was examined in proliferating Caco-2 cells acutely exposed for 1, 6, or 24 h at

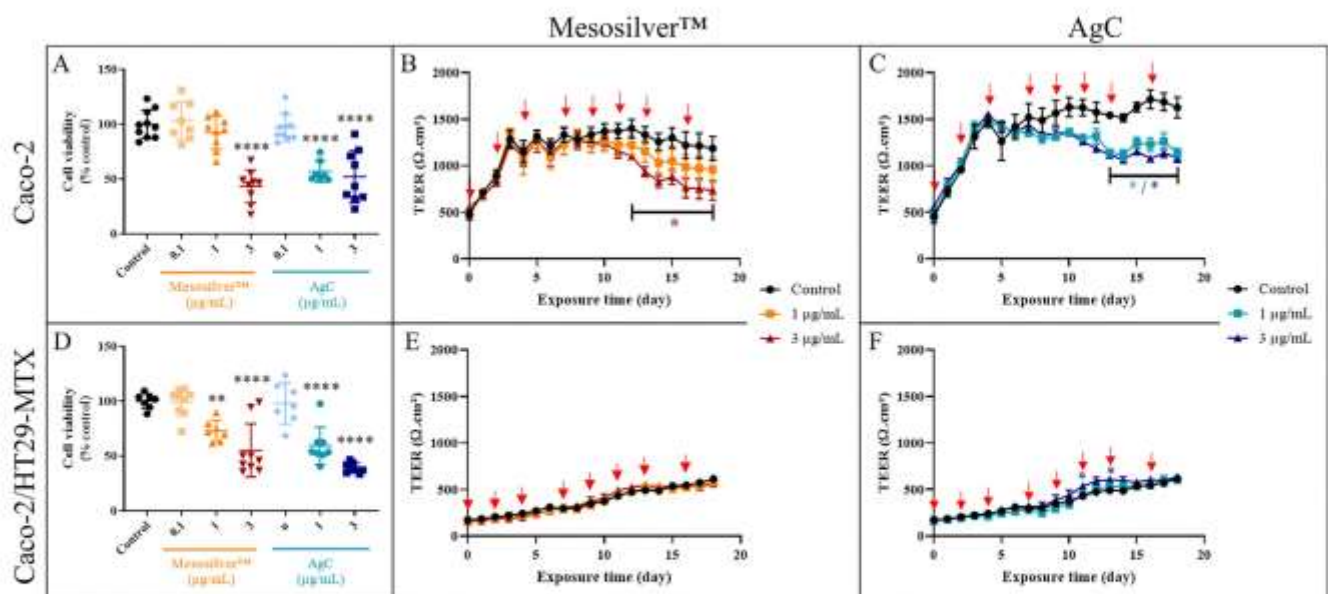


Fig. 4. Cell viability after 18 days of repeated exposure to Mesosilver™ and AgC and changes in trans-epithelial electrical resistance (TEER). Cell viability, expressed as the percentage of that of control (untreated cells), was measured on Caco-2 monoculture (A) and Caco-2/HT29-MTX co-culture (D) in Transwells, at the end of the 18-day repeated exposure to Mesosilver™ or AgC. TEER was monitored in real-time using the cellZScope system on Caco-2 cells (B,C) and Caco-2/HT29-MTX cells (E,F) exposed to Mesosilver™ or AgC. The culture medium was refreshed every two days for 18 days (red arrow). Significant differences from untreated cells are marked with asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

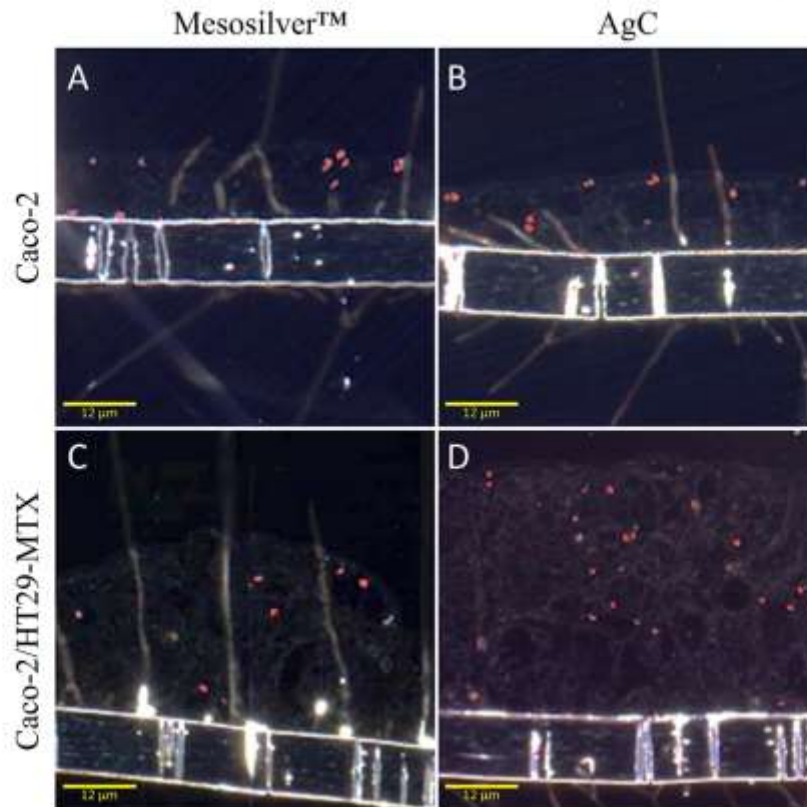


Fig. 5. High-resolution dark-field microscopy images (CytoViva™) of Caco-2 cells (A,B) and Caco-2/HT29-MTX cells (C,D) repeatedly exposed to Mesosilver™ (A,C) or AgC (B,D) at a concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for 18 days. The Caco-2 monolayer and the Caco-2/HT29-MTX multilayer, as well as the Transwell membrane, are visible; silver spots are artificially labelled in red. Scale bar corresponds to 12 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

concentrations of 0.1, 1, and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to evaluate whether Mesosilver™ and AgC products are potential genotoxic agents. The presence of phosphorylated H2AX (γH2AX), a classic marker for DNA DSBs, was therefore studied by immunofluorescence. All results are presented in Table 1 and representative images obtained after 6 h of treatment at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ are shown in Fig. S4. Cells exposed to 500 f. calicheamicin were used as a positive control.

No genotoxic effect occurred after treatment with either colloidal silver product at 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 1 h of treatment (Table 1). However, γH2AX intensity significantly increased after 6 h of exposure to Mesosilver™ ($P < 0.05$) or AgC ($P < 0.0001$) at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. S4 and Table 1). The percentage of γH2AX -positive cells was significantly higher for AgC than Mesosilver™ ($P < 0.001$), with $31.0 \pm 4.2\%$ vs. $16.0 \pm 3.1\%$, respectively (vs. $4.4 \pm 1.4\%$ for untreated cells), suggesting higher genotoxicity of the

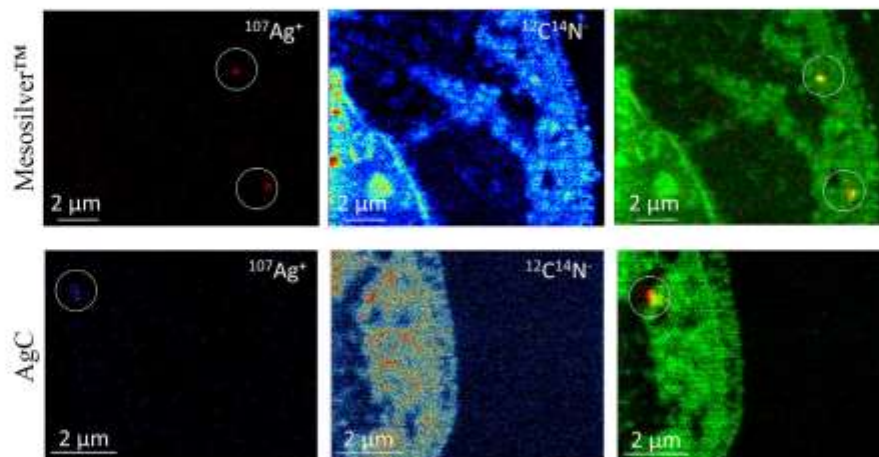


Fig. 6. Distribution maps of Ag element (first column) and CN cluster (allowing visualization of the cell morphology, second column) detected by the Helium Ion Microscopy – Secondary Ion Mass Spectrometry (HIM-SIMS) instrument on Caco-2 cells cultured on Transwells and repeatedly exposed to Mesosilver™ or AgC at a concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 18 days. The third column corresponds to image overlapping (silver in red, CN in green, overlapping of both in yellow). Silver spots are highlighted by white circles. Scale bar corresponds to 2 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

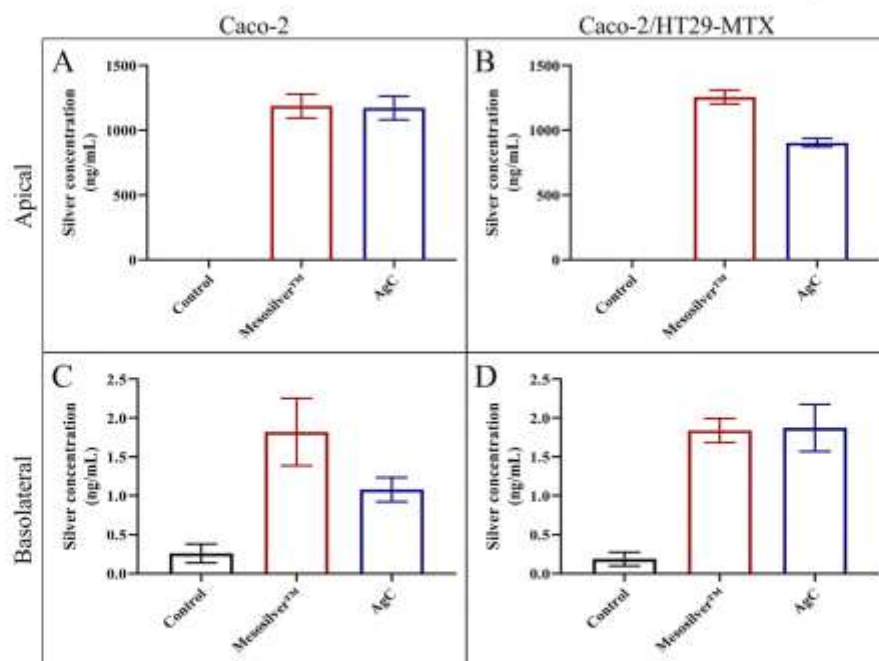


Fig. 7. Total silver concentration measured by ICP-MS in apical (A,B) and basolateral (C,D) media after 18-day repeated exposure of Caco-2 cells (A,C) and Caco-2/HT29-MTX cells (B,D), cultured in Transwells, to Mesosilver™ or AgC at a concentration of 3 µg/mL. LOD and LOQ are 0.241 ng/mL and 0.536 ng/mL, respectively.

AgC suspension. This was confirmed following 24 h of treatment at 1 µg/mL: at this timepoint, exposure to AgC induced cytotoxicity, whereas Mesosilver™ exposure induced genotoxicity ($21.1 \pm 5.1\%$ positive cells, $P < 0.0001$) (Table 1). For the highest concentration of 3 µg/mL, more deleterious effects were once again observed for AgC than Mesosilver™: after 1 h, exposure to AgC induced genotoxicity that resulted in cytotoxicity after 6 or 24 h of exposure, whereas Mesosilver™ induced genotoxicity at 6 h ($41.5 \pm 5.5\%$ positive cells, $P < 0.0001$), which was further associated with cytotoxicity after 24 h of treatment (Table 1).

4. Discussion

Given the growing interest in the antimicrobial properties of AgNPs and/or ionic silver, numerous colloidal silver products are currently being marketed for a wide range of health and disinfectant applications. In particular, dietary supplements advertised as immune boosters can easily be found in the US and Europe, even though silver no longer appears in the list of authorized vitamins and minerals in Europe. Toxicity studies have mainly focused on commercially available or laboratory-synthesized AgNPs tested at high unrealistic concentrations, up to 100 µg/mL (Georgantzopoulou et al., 2016; Saez-Tenorio et al., 2019; Williams et al., 2016), which are not representative of the ingested

forms present in such dietary supplements. Indeed, the structural and physico-chemical characteristics of “real” AgNPs, such as concentration, particle size distribution, and/or interfacial properties, may differ from those of model AgNPs. Few studies have characterized the presence of AgNPs in colloidal silver products (Cascio et al., 2015; De Leersnyder et al., 2020; Reed et al., 2014; Rogers et al., 2020; Rong et al., 2018) and, furthermore, little is known about their fate, behaviour, or toxicity in the gastro-intestinal tract (Reed et al., 2014; Rogers et al., 2020; Rong et al., 2018).

The aim of the present study was to compare the physico-chemical properties of two colloidal silver products, Mesosilver™, produced by Purest Colloid in US (Farmen et al., 2012; Reed et al., 2014; Rong et al., 2018) and AgC marketed in France, and to assess their respective effects *in vitro* using realistic scenarios that mimic human exposure (*i.e.* low dose and repeated exposure). First, the physico-chemical properties of the AgNPs present in Mesosilver™ in its pure form were assessed. The AgNPs were spherical with a core diameter deduced from TEM analysis, of approximately 12 nm, a hydrodynamic diameter, measured by DLS, of 33 nm, and a negative zeta potential of -30 mV, in accordance with published data (Rong et al., 2018). In the aforementioned study, the authors found 10.6% of silver as dissolved silver (ionic silver), whereas the rest was present as AgNPs (Rong et al., 2018). This is lower than the 22% and 46% values reported by Farmen et al. (2012) and Rogers et al.

Table 1

Proportion of γ H2AX-positive cells after exposure of proliferating Caco-2 cells to Mesosilver™ or AgC. Values correspond to the mean \pm SD of eight images for each condition. Values for the positive control with 500 f. calicheamicin and untreated cells are given.

		γ H2AX-positive cells (%)							
Time		Mesosilver™ (µg/mL)					AgC (µg/mL)		
(h)	Calicheamicin 500 fM	Untreated	0.1	1	3	0.1	1	3	
1	98.0 \pm 2.0	1.1 \pm 0.8	3.5 \pm 2.2	3.7 \pm 1.6	2.9 \pm 1.0	4.0 \pm 1.5	0.9 \pm 0.6	9.5 \pm 3.0	
6		4.4 \pm 1.4	2.3 \pm 1.2	16.0 \pm 3.2*	41.5 \pm 5.5****	6.4 \pm 1.6	31.0 \pm 4.2****,***	Cytotoxicity	
24		4.4 \pm 1.9	3.5 \pm 1.8	21.1 \pm 5.1****	Cytotoxicity	3.5 \pm 1.8	Cytotoxicity	Cytotoxicity	

* $P < 0.05$.

**** $P < 0.0001$ vs. untreated cells.

*** $P < 0.001$ vs. Mesosilver™.

(2018) respectively. These discrepancies are likely explained by differences in the measurement methods and preparation of the samples. In contrast to Mesosilver™, the AgC suspension was only composed of ionic silver (i.e. no AgNPs detected), confirming the high variability in the relative percentage of particulate vs. soluble silver, observed among drinkable commercial colloidal silver-containing products (Cascio et al., 2015) and later on a broader range of consumer products advertised to contain colloidal silver (Rogers et al., 2018).

UV-visible spectroscopy was complementarily used to identify the presence of metallic AgNPs in the Mesosilver™ suspension. An absorption peak at 396 nm (λ_{max}) was detected, corresponding to a size of the AgNPs of approximately 10 nm (Paramelle et al., 2014), in accordance with published data (Rogers et al., 2018). As interactions of AgNPs with their environment can lead to major physico-chemical modifications with subsequent modulation of their toxicity (Durán et al., 2015), the stability of AgNPs present in Mesosilver™ was evaluated in the cell culture medium used for the further assessment of their toxicological impact *in vitro*. In the presence of FBS, a relatively small redshift of λ_{max} of 20 nm was observed, suggesting the binding of biomolecules to AgNPs (Ashkarran et al., 2012; Burcza et al., 2015); such a biomolecular corona around the AgNPs may be involved in the protective role exerted by FBS.

As colloidal silver is consumed orally, the first barrier to exposure is the gastrointestinal tract. Two *in vitro* gut models, a Caco-2 monoculture and a Caco-2/HT29-MTX co-culture, were thus used to evaluate the toxicological impact of Mesosilver™ and AgC suspensions. AgNPs and/or ionic silver are known to induce interference with a large number of viability assays (Mello et al., 2020; Riaz Ahmed et al., 2017). Therefore, the resazurin-based AlamarBlue® assay, reported to be a non-interfering method (Mello et al., 2020), was chosen to evaluate the cytotoxicity of Mesosilver™ and AgC. A loss in cell viability was observed for both Mesosilver™ and AgC in Caco-2 monocultures and Caco-2/HT29-MTX co-cultures in a concentration-dependent manner; for the 24-well culture, time-dependent effects were also found with increased cytotoxicity after repeated exposure. Despite the different culture systems used, the cytotoxicity profiles in the 0.1 to 3 µg/mL range were similar. However, for the 3 µg/mL concentration, Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells cultured in Transwells and repeatedly exposed to Mesosilver™ or AgC for 18 days were less sensitive than those cultured in 24-well plates, probably due to differences in cell differentiation. For a low concentration of 0.5 µg/mL, there was an increase in metabolic activity after 7 or 18 days of treatment of Caco-2/HT29-MTX cells with Mesosilver™ or AgC (also seen for AgC in Caco-2 cells). This ability to stimulate cell growth at low (nano)silver concentrations, or "hormetic effect" (Iavicoli et al., 2018), is in accordance with published results on synthetic AgNPs in Caco-2 cells after short-term exposure (Chen et al., 2016). Comparison of the cytotoxicity induced by the colloidal silver products showed AgC to undoubtedly have more deleterious effects than Mesosilver™, as seen in the 24-well plate and Transwell culture systems. The presence of γ H2AX was thus studied as a classic marker for DNA DSBs and genotoxicity to further the analysis and explain the observed cytotoxicity. For a given concentration and exposure time, γ H2AX levels were higher for AgC than Mesosilver™-exposed Caco-2 cells. These differences undoubtedly originate from the predominance of the ionic form of silver in the AgC suspension, generally described to be the main driver for silver toxicity (De Matteis et al., 2015; van der Zande et al., 2016), although several studies have reported specific AgNP-mediated toxic effects (Arai et al., 2015; Garcia-Reyero et al., 2014). Overall, a loss of viability was observed for differentiated Caco-2 cells, raising the issue of the toxicity of chronic exposure to colloidal silver, and proliferating Caco-2 cells showed increased levels of γ H2AX, suggesting a genotoxic effect, as recently reviewed (Hadrup et al., 2020).

Real-time cellZscope measurements of Caco-2 cells repeatedly exposed to Mesosilver™ for 18 days showed a concentration- and time-dependent decrease in TEER, as an indicator of progressive intestinal barrier impairment. In contrast, the same TEER alterations were

obtained at 1 and 3 µg/mL of AgC, reinforcing the more deleterious impact of this 100% ionic-silver containing product. Interestingly, exposure of the Caco-2/HT29-MTX co-culture to Mesosilver™ or AgC did not induce any marked changes in TEER when using the 1 and 3 µg/mL concentrations, suggesting that intestinal barrier integrity remained unaffected under these conditions, even though a loss in cell viability and a decrease in the cell index were observed. A similar trend of a decrease in cell viability without TEER changes was previously described for a Caco-2/HT29 mucus-secreting cell model exposed to synthetic AgNPs (Saez-Tenorio et al., 2019). One possible explanation is that mucus compensates, at least to some extent, for intestinal barrier alterations, as it was shown to contribute to TEER in HT29-MTX cells (Pontier et al., 2001). Due to the multilayer conformation of Caco-2/HT29-MTX cells (Fig. S3B), it is also possible that cell mortality occurred without affecting intestinal barrier integrity, contrary to the Caco-2 monolayer (Fig. S3A).

Concerning the influence of the cell model and the role of mucus, no striking differences in terms of cell viability were observed between Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells, the key driver rather being the type of colloidal silver product. Due to its physical and chemical properties, mucus may trap dietary inorganic nanoparticles, such as AgNPs, thereby decreasing their toxicity to the host or, on the contrary, inducing high local accumulation with subsequent increased toxicity (Gillois et al., 2018). To date, few *in vitro* studies using intestinal cell models have considered mucus in the toxicological assessment of AgNPs and were limited to short-term exposure conditions. In the study of Georgantzopoulou et al. (2016), Caco-2/HT29-MTX (90/10) cells were acutely exposed to synthetic AgNPs (10–100 µg/mL) for 24 h. The mucus layer was able to trap 200-nm AgNPs, thus reducing their interaction with the cellular membrane and resulting in lower levels of toxicity, oxidative stress, IL-8 release, and proteomic alterations than for 20-nm AgNPs and silver nitrate, used as a control (Georgantzopoulou et al., 2016). More recently, Caco-2/HT29-MTX (75/25) cells were acutely exposed to pristine vs. *in vitro* digested lipoic acid- and citrate-coated 50-nm AgNPs (250–2500 µg/mL) for 24 h. Exposure to increasing concentrations of AgNPs resulted in a concentration-dependent increase of total Ag and AgNP content in the cellular fractions, with lower levels observed for digested AgNPs relative to their pristine counterparts. Confocal microscopy imaging showed clusters of silver or AgNPs mainly localized to the cell cytoplasm and, to some extent, the nucleus (Abdelkhalik et al., 2020). Moreover, Saez-Tenorio et al. (2019) described a time-dependent increase in cellular uptake and internalization after exposure of Caco-2/HT29 cells to small (approximately 5 nm) laboratory-synthesized AgNPs. After 24 h of exposure, most of the AgNPs were embedded in the mucus layer and at the end of the exposure period (96 h), a higher number of AgNPs was able to cross the mucus barrier and enter the cells (Saez-Tenorio et al., 2019). To gain further insights of the role of mucus in our conditions (commercial colloidal silver products, low doses, Caco-2/HT29-MTX cell model, repeated exposure), immunofluorescence staining of mucus was performed using the anti-MUC5AC antibody, as MUC5AC is the major gel-forming mucin produced by HT29-MTX cells (Lesuffleur et al., 1993). Mucus did not form a uniform layer over the cell surface, but rather a patchy structure, as observed by confocal microscopy. This observation is in agreement with those of previous studies in which mucus patches were visualized in HT29-MTX cell layers (Coic et al., 2012; Etzold et al., 2014; Radziwill-Bienkowska et al., 2017; Sperandio et al., 2013; Talbot et al., 2018), Caco-2/HT29-MTX co-cultures (70/30) (Dorier et al., 2017) and Caco-2/HT29 co-cultures at varying ratios of 70/30, 80/20, and 90/10 with no differences in mucus secretion or distribution (García-Rodríguez et al., 2018). However, it was also reported that mucus secreted by Caco-2/HT29-MTX co-cultures (90/10) formed a mucus layer that completely covered the cell surface (Mahler et al., 2009). These discrepancies stress the necessity of examining the mucus when HT29-MTX cells are used for the toxicological assessment of AgNPs and other dietary inorganic nanoparticles. After repeated exposure to Mesosilver™ or AgC, confocal-microscopy based qualitative inspection showed that mucus

secretion remained unchanged in repeatedly-exposed cells relative to untreated cells, as previously reported for TiO₂ nanoparticles (Dorier et al., 2017). Due to its patchy structure, the mucus was probably unable to exert its trapping properties and thus mitigate the deleterious effects of Mesosilver™ or AgC on Caco-2 cells. This is why both the Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cell models exhibited comparable silver translocation, albeit to only a slight extent (between 0.09 and 0.20% of apical silver content), as measured by ICP-MS in the basolateral compartment at the end of the repeated treatment with Mesosilver™ or AgC. These findings differ from those reported by Vila et al. (2018), who found no silver translocation in Caco-2 cells after 24 h of acute exposure to 1 to 50 µg/mL of synthetic AgNPs. However, in the study reported by Imai et al. (2017) on Caco-2 cells acutely exposed to AgNPs at 5 µg/mL, 0.28% and 0.22% of silver transported to the basolateral side were measured for citrate-ligand and lipoic-acid capped AgNPs, respectively (vs. 0.27% for ionic silver). Interestingly, in the aforementioned study, the amount of silver found in the basolateral medium was markedly lower when the cells were treated with AgNPs or ionic silver at 4 °C, suggesting active transport (Imai et al., 2017). Abdelkhalik et al. (2020) obtained values below 0.1% for the translocation of either pristine or digested AgNPs through acutely-exposed Caco-2/HT29-MTX cells, either as total Ag or AgNPs. This is of the same order of magnitude as our results, despite different products and exposure regimes.

TEM was used as a first approach to visualize internalized AgNPs to support these findings on silver uptake and fate *in vitro*, but no clear presence of these particles was detected inside the cells, probably due to the granulated nature of the cell cytoplasm (data not shown). Dark-field hyperspectral imaging (CytoViva™) and high-resolution SIMS-based chemical imaging are powerful techniques that are increasingly used to investigate the distribution of NPs and chemical elements within biological matrices. CytoViva™ hyperspectral imaging was thus performed on Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells repeatedly exposed to Mesosilver™ or AgC. CytoViva™ is a high contrast optical dark-field system, used in the nanotoxicology field for imaging TiO₂ NPs (Konstantinova et al., 2017) and, more recently, AgNPs (Fizeşan et al., 2019; Mehennaoui et al., 2018). Nanoparticles and other light-scattering objects appear as bright features on a dark background; thus, fluorescent labelling of NPs, which could modify their physico-chemical properties, is not required. Complementarily to CytoViva™, high-resolution chemical imaging was used on the same repeatedly-exposed samples; only Caco-2 cells were considered. Helium Ion Microscopy (HIM, ZEISS, Peabody, USA) consists of scanning the sample with a finely focussed He⁺ ion beam of sub-nm resolution and detecting secondary electrons to generate images (Hlawacek and G.A., 2016). In contrast to conventional Scanning Electron Microscopy (SEM), which uses an electron beam to scan the sample, HIM provides better contrast details due to smaller beam-sample interaction volumes, a better depth of field, and the possibility to image insulating samples without prior deposition of a conductive film. In addition, the HIM used for this study was equipped with a Secondary Ion Mass Spectrometer (SIMS) system developed by LIST, Luxembourg (Dowsett and Wirtz, 2017; Wirtz et al., 2019). The integrated HIM-SIMS instrument allows the acquisition of both high-resolution structural information and elemental/chemical information from the same field of view. It has been successfully applied to imaging a lithium titanate and magnesium oxide NP mixture (Dowsett and Wirtz, 2017) and correlating the morphology and composition of AgNPs (Fizeşan et al., 2019). In the present study, the CytoViva™ and HIM-SIMS results converged on the cell uptake and internalization of silver (AgNPs and/or ionic silver) for both colloidal silver products and cell models, which may be influenced by the formation and nature of the biomolecular corona around AgNPs (Barbalinardo et al., 2018; Monteiro-Riviere et al., 2013).

In conclusion, the results of this study demonstrate that differences in the relative percentage of particulate (AgNPs) vs. soluble silver (ionic silver) in commercially available colloidal silver products, here Mesosilver™ and AgC, influence their toxicological impact *in vitro* on Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX intestinal cell models, under realistic conditions that mimic

human exposure, with low doses (0.1–12 µg/mL) and a repeated exposure regimen (every two days for 18 days). The most striking effects, including cytotoxicity and intestinal barrier impairment on differentiated Caco-2 cells, and genotoxicity on proliferating Caco-2 cells, were observed with the commercial product containing only ionic silver (AgC). Due to its patchy structure, the presence of mucus on intestinal cells in the Caco-2/HT29-MTX co-culture model only slightly mitigated these effects, underlining the necessity of examining mucus when HT29-MTX cells are used for the toxicological assessment of dietary inorganic nanoparticles and other chemicals. Regardless of the cell model, silver uptake and intracellular localization, as shown by CytoViva™ and HIM-SIMS, and subsequent silver translocation, were similar for both colloidal silver products. These findings demonstrate that high-resolution (chemical) imaging is a powerful approach to provide novel insights into mechanisms behind nanoparticle toxicity.

Beyond analytical developments for the in-depth characterization of silver forms in native colloidal-silver based consumer products and biological fluids and tissues after exposure, future studies are needed to explore their gut toxicity in physiologically relevant *in vitro* and *in vivo* models to better understand the potential human exposure risks posed by these consumer products, which are becoming a growing concern.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142324>.

CRediT authorship contribution statement

MHR, VT, HR, and MMB conceived and designed the study. MHR and MMB obtained funding. KG, ML, JB, and VM performed and analysed the *in vitro* experiments on cell cultures. IF, CS, SC, and JNA prepared, performed, and analysed the high-resolution imaging experiments. KG, JV, and GM designed, performed, and analysed the genotoxicity experiments. HT and MHR designed, performed, and analysed the ICP-MS experiments. KG, CS, JNA, MHR, HR, and MMB wrote the manuscript. All authors contributed to the discussion and approved the final manuscript.

Declaration of competing interest

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

Acknowledgements

The authors would like to thank T. Lesuffleur (INSERM U938, Paris, France) for her generous gift of the HT29-MTX cells, and Anne Fernandez-Vidal (University of Toulouse, Toulouse, France) for helpful discussions. The authors also thank Jelena Lorvic for fruitful scientific collaboration, Carole La and Marion Rivoal from the Laboratoire de Planétologie et Géodynamique (LPG, UMR 6112) for help to perform the ICP-MS and Eric Gautron from the Institut des Matériaux Jean Rouxel (Nantes, France) for performing the TEM measurements.

Funding

This work was supported by INRAE (TRANSFORM/MICA/AlimH inter-division 2018 call, NanoStress project) and INRAE (AlimH division)/Région Occitanie (France) through the doctoral grant of Kévin Gillois (2017–2020).

The work of LIST was financed by the FluoGut project, INTER/ANR/18/12545362.

References

- Abdelkhalik, A., van der Zande, M., Undas, A.K., Peters, R.J.B., Bouwmeester, H., 2020. Impact of *in vitro* digestion on gastrointestinal fate and uptake of silver nanoparticles with different surface modifications. *Nanotoxicology* 14, 111–126. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1675794>.

- Arai, Y., Miyayama, T., Hirano, S., 2015. Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages. *Toxicology* 328, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.12.014>.
- Ashkarar, A.A., Ghavami, M., Aghaverdi, H., Stroeve, P., Mahmoudi, M., 2012. Bacterial effects and protein corona evaluations: crucial ignored factors in the prediction of bio-efficacy of various forms of silver nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1231–1242. <https://doi.org/10.1021/tx300083s>.
- Barbalinardo, M., Caicci, F., Cavallini, M., Gentili, D., 2018. Protein corona mediated uptake and cytotoxicity of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblast. *Small* 14, 1801219. <https://doi.org/10.1002/sml.201801219>.
- Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., Lamprecht, A., 2014. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017>.
- Bi, Y., Marcus, A.K., Robert, H., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., Westerhoff, P., Ropers, M.H., Mercier-Bonin, M., 2020. The complex puzzle of dietary silver nanoparticles, mucus and microbiota in the gut. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* 7404. <https://doi.org/10.1080/10937404.2019.1710914>.
- Böhmert, L., Ctröd, M., Hansen, U., Maul, R., Knappe, P., Niemann, B., Weidner, S.M., Thünemann, A.F., Lampen, A., 2014. Analytically monitored digestion of silver nanoparticles and their toxicity on human intestinal cells. *Nanotoxicology* 8, 631–642. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.815284>.
- Böhmert, L., Niemann, B., Lichtenstein, D., Jüling, S., Lampen, A., 2015. Molecular mechanism of silver nanoparticles in human intestinal cells. *Nanotoxicology* 9, 852–860. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.980760>.
- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., Pommier, Y., 2008. γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* <https://doi.org/10.1038/nrc2523>.
- Brun, E., Barreau, F., Veronesi, G., Fayard, B., Sorieul, S., Chanéac, C., Carapito, C., Rabilloud, T., Mabondzo, A., Herfin-Boime, N., Carrière, M., 2014. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-13>.
- Burczka, A., Gräf, V., Walz, E., Greiner, R., 2015. Impact of surface coating and food-mimicking media on nanosilver-protein interaction. *J. Nanopart. Res.* 17, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3235-7>.
- Cascio, C., Geiss, O., Franchini, F., Ojeda-Jimenez, I., Rossi, F., Gilliland, D., Calzolari, L., 2015. Detection, quantification and derivation of number size distribution of silver nanoparticles in antimicrobial consumer products. *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 1255–1265. <https://doi.org/10.1039/c4ja00410h>.
- Chen, N., Song, Z.-M., Tang, H., Xi, W.-S., Cao, A., Liu, Y., Wang, H., 2016. Toxicological effects of Caco-2 cells following short-term and long-term exposure to Ag nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 974. <https://doi.org/10.3390/ijms17060974>.
- Coic, Y.M., Balex, F., Poyraz, Ö., Thibaut, R., Labryere, E., Chretien, F., Sobhani, I., Lazure, T., Wyplosz, B., Schneider, G., Mulard, L., Sansonetti, P.J., Marteyn, B.S., 2012. Design of a specific colonic mucus marker using a human commensal bacterium cell surface domain. *J. Biol. Chem.* 287, 15916–15922. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310003>.
- De Leersnyder, I., Rijckaert, H., De Gelder, L., Driessche, I., Van, Vermeir, P., Van Driessche, I., Vermeir, P., 2020. High variability in silver particle characteristics, silver concentrations, and production batches of commercially available products indicates the need for a more rigorous approach. *Nanomaterials* 10, 1–22. <https://doi.org/10.3390/nano10071394>.
- De Matteis, V., Ada Malvindi, M., Galeone, A., Brunetti, V., De Luca, E., Kote, S., Kshirsagar, P., Sabella, S., Bardi, G., Paolo Pompa, P., Malvindi, M.A., Galeone, A., Brunetti, V., De Luca, E., Kote, S., Kshirsagar, P., Sabella, S., Bardi, G., Pompa, P.P., 2015. Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: the role of Ag⁺ ion release in the cytosol. *Nanomedicine* 11, 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.11.002>.
- Dorier, M., Béal, D., Marie-Desvergne, C., Dubosson, M., Barreau, F., Houdeau, E., Herfin-Boime, N., Carrière, M., 2017. Continuous in vitro exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology* 11, 751–761. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1349203>.
- Dowsett, D., Wirtz, T., 2017. Co-registered in situ secondary electron and mass spectral imaging on the helium ion microscope demonstrated using lithium titanate and magnesium oxide nanoparticles. *Anal. Chem.* 89, 8957–8965. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01481>.
- Durán, N., Silveira, C.P., Durán, M., Martínez, D.S.T., 2015. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *J. Nanobiotechnology* 13, 55. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0114-4>.
- Etzold, S., Kober, O.J., Mackenzie, D.A., Tailford, L.E., Gunning, A.P., Walshaw, J., Hemmings, A.M., Juge, N., 2014. Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ. Microbiol.* 16, 888–903. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12377>.
- Farmen, E., Mikkelsen, H.N., Evensen, Einset, J., Heier, L.S., Rosseland, B.O., Salbu, B., Tollefsen, K.E., Oughton, D.H., 2012. Acute and sub-lethal effects in juvenile Atlantic salmon exposed to low μ g/L concentrations of Ag nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 108, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.007>.
- Fizejan, I., Cambier, S., Moschini, E., Chary, A., Nelissen, I., Ziebel, J., Audinot, J.N., Wirtz, T., Kruszewski, M., Pop, A., Kiss, B., Serchi, T., Loghin, F., Gutleb, A.C., 2019. In vitro exposure of a 3D-tetraculture representative for the alveolar barrier at the air-liquid interface to silver particles and nanowires. *Part. Fibre Toxicol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0297-1>.
- Gao, X., Topping, V.D., Keltner, Z., Sprando, R.L., Yourick, J.J., 2017. Toxicity of nano- and ionic silver to embryonic stem cells: a comparative toxicogenomic study. *J. Nanobiotechnology* 15, 31. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0265-6>.
- García-Reyero, N., Kennedy, A.J., Escalon, B.L., Habib, T., Laird, J.G., Rawat, A., Wiseman, S., Hecker, M., Denslow, N., Stevens, J.A., Perkins, E.J., 2014. Differential effects and potential adverse outcomes of ionic silver and silver nanoparticles in vivo and in vitro. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4546–4555. <https://doi.org/10.1021/es4042258>.
- García-Rodríguez, A., Vila, L., Cortés, C., Hernández, A., Marcos, R., 2018. Exploring the usefulness of the complex in vitro intestinal epithelial model Caco-2/HT29/Raji-B in nanotoxicology. *Food Chem. Toxicol.* 113, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.042>.
- Georgantzopoulou, A., Serchi, T., Cambier, S., Leclercq, C.C., Renaut, J., Shao, J., Kruszewski, M., Lentzen, E., Gryan, P., Eswara, S., Audinot, J.N., Conral, S., Ziebel, J., Guignard, C., Hoffmann, L., Murk, A.T.J., Gutleb, A.C., 2016. Effects of silver nanoparticles and ions on a co-culture model for the gastrointestinal epithelium. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 9. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0117-9>.
- Gillois, K., Lévêque, M., Théodorou, V., Robert, H., Mercier-Bonin, M., 2018. Mucus: an underestimated gut target for environmental pollutants and food additives. *Microorg. Rev.* 6, 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020053>.
- Hadrup, N., Sharma, A.K., Loeschner, K., Jacobsen, N.R., 2020. Pulmonary toxicity of silver vapours, nanoparticles and fine dusts: a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 115, 104690. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104690>.
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C.G., Lipka, E., Amidon, G.L., Langguth, P., 2000. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J. Pharm. Sci.* 89, 63–75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200001\)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-G).
- Hlawacek, G., G.A., 2016. Helium Ion Microscopy. Springer.
- Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., Calabrese, E.J., 2018. Nanoparticle exposure and hormetic dose-responses: An update. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030805>.
- Imai, S., Morishita, Y., Hata, T., Kondoh, M., Yagi, K., Gao, J.Q., Nagano, K., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., 2017. Cellular internalization, transcellular transport, and cellular effects of silver nanoparticles in polarized Caco-2 cells following apical or basolateral exposure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 484, 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.114>.
- Jüling, S., Niedzwiecka, A., Böhmert, L., Lichtenstein, D., Selve, S., Braeuning, A., Thünemann, A.F., Krause, E., Lampen, A., 2017. Protein corona analysis of silver nanoparticles links to their cellular effects. *J. Proteome Res.* 16, 4020–4034. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00412>.
- Konstantinova, V., Ibrahim, M., Lie, S.A., Birkeland, E.S., Neppelberg, E., Marthinussen, M.C., Costea, D.E., Cimpan, M.R., 2017. Nano-TiO₂ penetration of oral mucosa: in vitro analysis using 3D organotypic human buccal mucosa models. *J. Oral Pathol. Med.* 46, 214–222. <https://doi.org/10.1111/jop.12469>.
- Larsen, P.B., Christensen, F., Jensen, K.A., Brinch, A., Mikkelsen, S.H., 2015. Exposure assessment of nanomaterials in consumer products. *Environ. Proj. No.* 1636, 2015. Danish Environ. Prot. Agency.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D., Gum, J.R., Kim, Y.S., Real, F.X., Zweibaum, A., 1993. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J. Cell Sci.* 106, 771–783.
- Lichtenstein, D., Ehmeyer, J., Knappe, P., Jüling, S., Böhmert, L., Selve, S., Niemann, B., Braeuning, A., Thünemann, A.F., Lampen, A., 2015. Impact of food components during in vitro digestion of silver nanoparticles on cellular uptake and cytotoxicity in intestinal cells. *Biol. Chem.* 396, 1255–1264. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0145>.
- Lozoya-Agullo, I., Araújo, F., González-Álvarez, I., Merino-Sanjuán, M., González-Álvarez, M., Bermejo, M., Sarmento, B., 2017. Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B coculture models to predict intestinal and colonic permeability compared to Caco-2 monoculture. *Mol. Pharm.* 14, 1264–1270. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165>.
- Mahler, G.J., Shuler, M.L., Glahn, R.P., 2009. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *J. Nutr. Biochem.* 20, 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.006>.
- Mehennaoui, K., Cambier, S., Serchi, T., Ziebel, J., Lentzen, E., Valle, N., Guérol, F., Thomann, J.S., Giamberini, L., Gutleb, A.C., 2018. Do the pristine physico-chemical properties of silver and gold nanoparticles influence uptake and molecular effects on *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda)? *Sci. Total Environ.* 643, 1200–1215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.208>.
- Mello, D.F., Trevisan, R., Rivera, N., Geitner, N.J., Di Giulio, R.T., Wiesner, M.R., Hsu-Kim, H., Meyer, J.N., 2020. Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 315. <https://doi.org/10.1016/j.cb.2019.108868>.
- Monteiro-Riviere, N.A., Samberg, M.E., Oldenburg, S.J., Riviere, J.E., 2013. Protein binding modulates the cellular uptake of silver nanoparticles into human cells: implications for in vitro to in vivo extrapolations? *Toxicol. Lett.* 220, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.04.022>.
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., Fernig, D.G., 2014. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* 139, 4855–4861. <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>.
- Pietroliusti, A., Bergamaschi, E., Campagna, M., Campagnolo, L., De Palma, G., Iavicoli, S., Leso, V., Magrini, A., Miragoli, M., Pedata, P., Palombi, L., Iavicoli, I., 2017. The unrecognized occupational relevance of the interaction between engineered nanomaterials and the gastro-intestinal tract: a consensus paper from a multidisciplinary working group. *Part. Fibre Toxicol.* <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0226-0>.
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., Arnaud, P., 2001. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J. Pharm. Sci.* 90, 1608–1619. <https://doi.org/10.1002/jps.1111>.
- Radziwiłł-Bienkowska, J.M., Robert, V., Drabot, K., Chain, F., Cherbuy, C., Langella, P., Thomas, M., Bardowski, J.K., Mercier-Bonin, M., Kowalczyk, M., 2017. Contribution of plasmid-encoded peptidase S8 (PrpP) to adhesion and transit in the gut of *Lactococcus lactis* IBB477 strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 5709–5721. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8334-1>.

- Reed, R.B., Faust, J.J., Yang, Y., Doudrick, K., Capco, D.G., Hristovski, K., Westerhoff, P., 2014. Characterization of nanomaterials in metal colloid-containing dietary supplement drinks and assessment of their potential interactions after ingestion. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2, 1616–1624. <https://doi.org/10.1021/sc500108m>.
- Riaz Ahmed, K.B., Nagy, A.M., Brown, R.P., Zhang, Q., Malghan, S.G., Goering, P.L., 2017. Silver nanoparticles: significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicol. in Vitro* 38, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.012>.
- Rogakou, E.P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., Bonner, W.M., 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* 275, 9390–9395. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9390>.
- Rogers, K.R., Navratilova, J., Stefaniak, A., Bowers, L., Knepp, A.K., Al-Abed, S.R., Potter, P., Citipour, A., Radwan, L., Nelson, C., Bradham, K.D., 2018. Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. *Sci. Total Environ.* 619–620, 1375–1384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.195>.
- Rogers, K.R., Henson, T.E., Navratilova, J., Surette, M., Hughes, M.F., Bradham, K.D., Stefaniak, A.B., Knepp, A.K., Bowers, L., 2020. In vitro intestinal toxicity of commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. *Sci. Total Environ.* 728, 138611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138611>.
- Rong, H., Garg, S., Westerhoff, P., Waite, T.D., 2018. In vitro characterization of reactive oxygen species (ROS) generation by the commercially available Mesosilver™ dietary supplement. *Environ. Sci. Nano* 5, 2686–2698. <https://doi.org/10.1039/c8en00701b>.
- Saez-Tenorio, M., Domenech, J., García-Rodríguez, A., Velázquez, A., Hernández, A., Marcos, R., Cortés, C., 2019. Assessing the relevance of exposure time in differentiated Caco-2/HT29 cocultures. Effects of silver nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.* 123, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.009>.
- Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B., Zheng, W., 2004. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev. Technol.* 2, 363–372. <https://doi.org/10.1089/adr.2004.2.363>.
- Sperandio, B., Fischer, N., Chevalier-Curt, M.J., Rossez, Y., Roux, P., Masselot, C.R., Sansonetti, P.J., 2013. Virulent shigella flexneri affects secretion, expression, and glycosylation of gel-forming mucins in mucus-producing cells. *Infect. Immun.* 81, 3632–3643. <https://doi.org/10.1128/IAI00551-13>.
- Talbot, P., Radziwill-Bienkowska, J.M., Kamphuis, J.B.J., Steenkeste, K., Bettini, S., Robert, V., Noordine, M.L., Mayeur, C., Gaultier, E., Langella, P., Robbe-Masselot, C., Houdeau, E., Thomas, M., Mercier-Bonin, M., 2018. Food-grade TiO2 is trapped by intestinal mucus in vitro but does not impair mucin O-glycosylation and short-chain fatty acid synthesis in vivo: implications for gut barrier protection. *J. Nanobiotechnology* 16, 53. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0379-5>.
- The Woodrow Wilson International Center, 2019. Consumer products inventory. <http://www.nanotechproject.org/cpi/>. (Accessed December 2019).
- Tulve, N.S., Stefaniak, A.B., Vance, M.E., Rogers, K., Mwilu, S., LeBouf, R.F., Schwegler-Berry, D., Willis, R., Thomas, T.A., Marr, L.C., 2015. Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children's potential exposures. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218, 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.02.002>.
- Van der Zande, M., Undas, A.K., Kramer, E., Monopoli, M.P., Peters, R.J., Garry, D., Antunes Fernandes, E.C., Hendriksen, P.J., Marvin, H.J.P., Peijnenburg, A.A., Bouwmeester, H., 2016. Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action. *Nanotoxicology* 10, 1431–1441. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1225132>.
- Vila, L., Marcos, R., Hernández, A., 2017. Long-term effects of silver nanoparticles in caco-2 cells. *Nanotoxicology* 11, 771–780. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1355997>.
- Vila, L., García-Rodríguez, A., Cortés, C., Marcos, R., Hernández, A., 2018. Assessing the effects of silver nanoparticles on monolayers of differentiated Caco-2 cells, as a model of intestinal barrier. *Food Chem. Toxicol.* 116, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.008>.
- Wijnhoven, S.W.P., Peijnenburg, W.J.G.M., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Domen, A.G., Heugens, E.H.W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van De Meent, D., Dekkers, S., De Jong, W.H., Van Zijverden, M., Sips, A.J.A.M., Geertsma, R.E., 2009. Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* <https://doi.org/10.1080/17435390902725914>.
- Williams, K.M., Gokulan, K., Cerniglia, C.E., Khare, S., 2016. Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium. *J. Nanobiotechnology* 14. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0214-9>.
- Wirtz, T., De Castro, O., Audinot, J.-N., Philipp, P., 2019. Imaging and analytics on the helium ion microscope. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 12, 523–543. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061318-115457>.
- Wu, W., Zhang, R., McClements, D.J., Chefetz, B., Polubesova, T., Xing, B., 2018. Transformation and speciation analysis of silver nanoparticles of dietary supplement in simulated human gastrointestinal tract. *Environ. Sci. Technol.* 52, 8792–8800. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01393>.

Repeated exposure of Caco-2 *versus* Caco-2/HT29-MTX intestinal cell models to (nano)silver *in vitro*: Comparison of two commercially available colloidal silver products

Supplementary Information

Material and Methods

Histology of Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells

Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX (90/10) cells were cultured in Transwells for 28 days. Transwells were washed with PBS and fixed in Carnoy's fixative (60% (v/v) ethanol, 30% (v/v) chloroform, 10% (v/v) glacial acetic acid) for 20 min. Thereafter, polycarbonate membranes were cut and processed by a Shandon™ Excelsior™ ES Tissue Processor using the following program: 2 × 60 min anhydrous ethanol, 2 × 60 min butanol, 480 min butanol, 3 × 80 min paraffin at 60 °C. Samples were included in paraffin blocks using a HistoStar™ Embedding Workstation (Thermo Fisher Scientific). 5-µm transversal sections were made using a Microm™ HM 340 E microtome (Thermo Fisher Scientific) and attached on slides. Samples were deparaffinised using Ottix Plus™ (Microm Microtech, Brignais, France) and subsequently dehydrated by increasingly diluted ethanol-water series. Staining was performed by 2 min in Hematoxylin, 10 min in running water, 15 min in Alcian Blue solution (pH 3.0) followed by 5 min in running water, 2 min in Eosin, 2 min in 95% (v/v) ethanol, 2 min in dry ethanol and ending with 3 baths of American Ottix Plus™, followed by mounting with Diamount mountant (DiaPath, Martinengo, Italy). Samples were imaged using a Nikon

Eclipse 90i microscope fitted with a DXM 1200 F Digital Camera. Image sets were taken with 200x magnification.

Immunostaining of Caco-2/HT29-MTX cells for mucus detection

At the end of the 18-day exposure period to the Mesosilver™ or AgC suspension (concentration of 3 µg/mL), Caco-2/HT29-MTX cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100. Untreated cells were also considered as control. After PBS washing, cells were blocked in PBS with 3% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Igepal (Sigma) overnight. After blocking, cells were incubated with a rabbit anti Muc5AC (Abcam, Paris, France) at a 1:250 dilution, followed by incubation with Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) at a 1:100 dilution. Transwell membranes were cut with a scalpel and mounted using ProLong Gold antifade reagent with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen). Slides were visualized under a 20× objective on a TCS SP8 AOBS inverted confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

Table S1. Main characteristics of Mesosilver™ in pure or diluted form (at a concentration of 3 µg/mL) in cell culture medium containing or not 2 % (v/v) FBS after 48 h of exposure.

Mesosilver™	[FBS] % (v/v)	Time (h)	TEM Diameter (nm)	DLS Diameter (Maximum Peak - nm)	PDI	Zeta potential (mV)	pH
In pure form	-	-	12.0 ± 4.1	79	0.60	-30.1 ± 4.8	7.3
In culture medium at 3 µg/mL	0	0	-	164	0.27	-9.2 ± 0.2	7.2
	0	48	-	1281	0.45	-13.5 ± 0.3	7.7
	2	0	-	79	0.22	-9.0 ± 1.0	7.2
	2	48	-	91	0.47	-9.7 ± 0.4	7.7

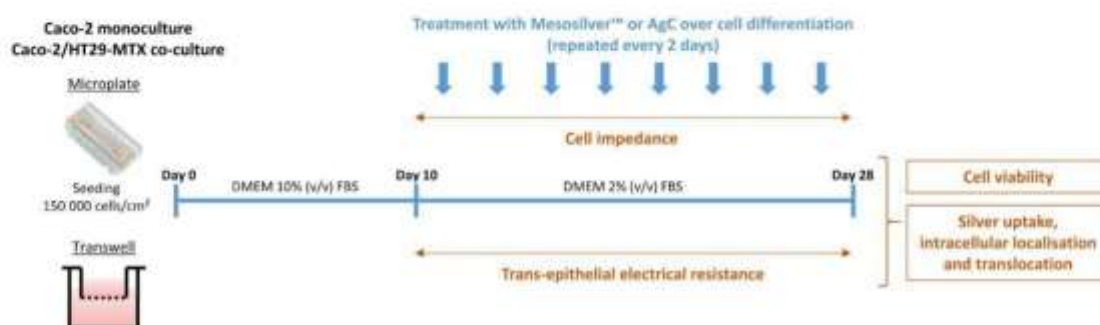


Fig. S1. Schematic representation of repeated exposure of Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells to Mesosilver™ and AgC.

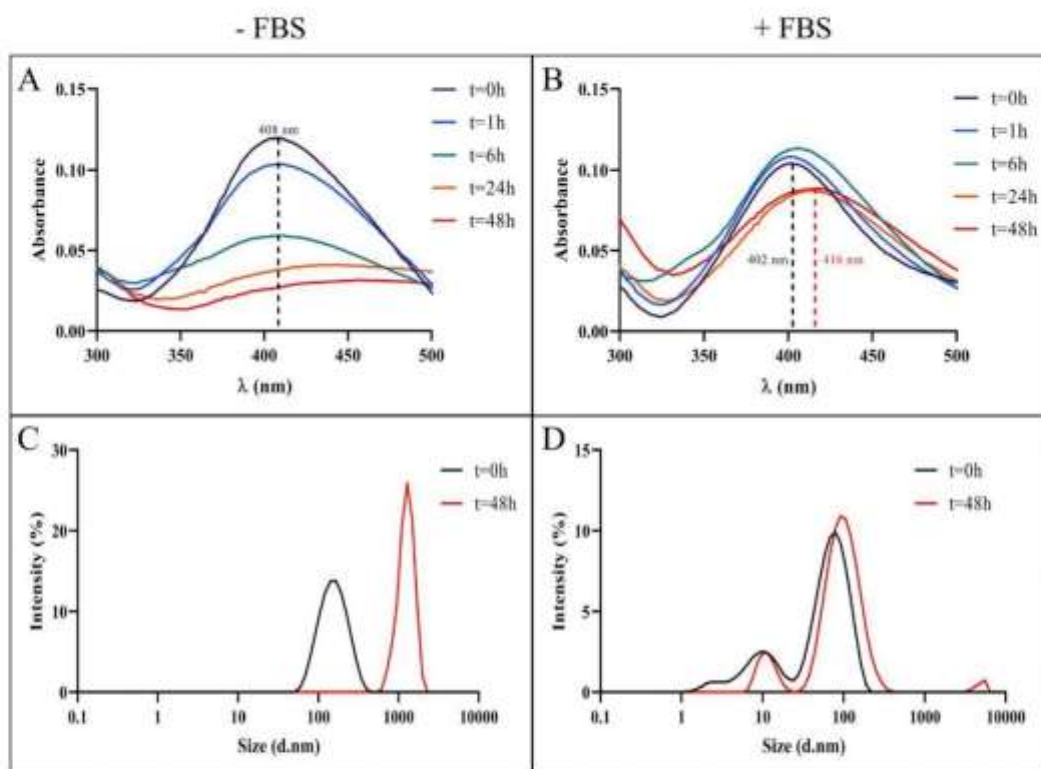


Fig. S2. Physico-chemical characterization of Mesosilver™ at 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in cell culture medium without (A,C) or with (B,D) 2% (v/v) FBS. (A,B) Time variation of UV-vis absorbance during 48 h of exposure with the maximum absorption wavelength (λ_{max}) labelled; (C,D) hydrodynamic diameter distribution of AgNPs, initially and after 48 h of exposure, obtained from DLS measurements.

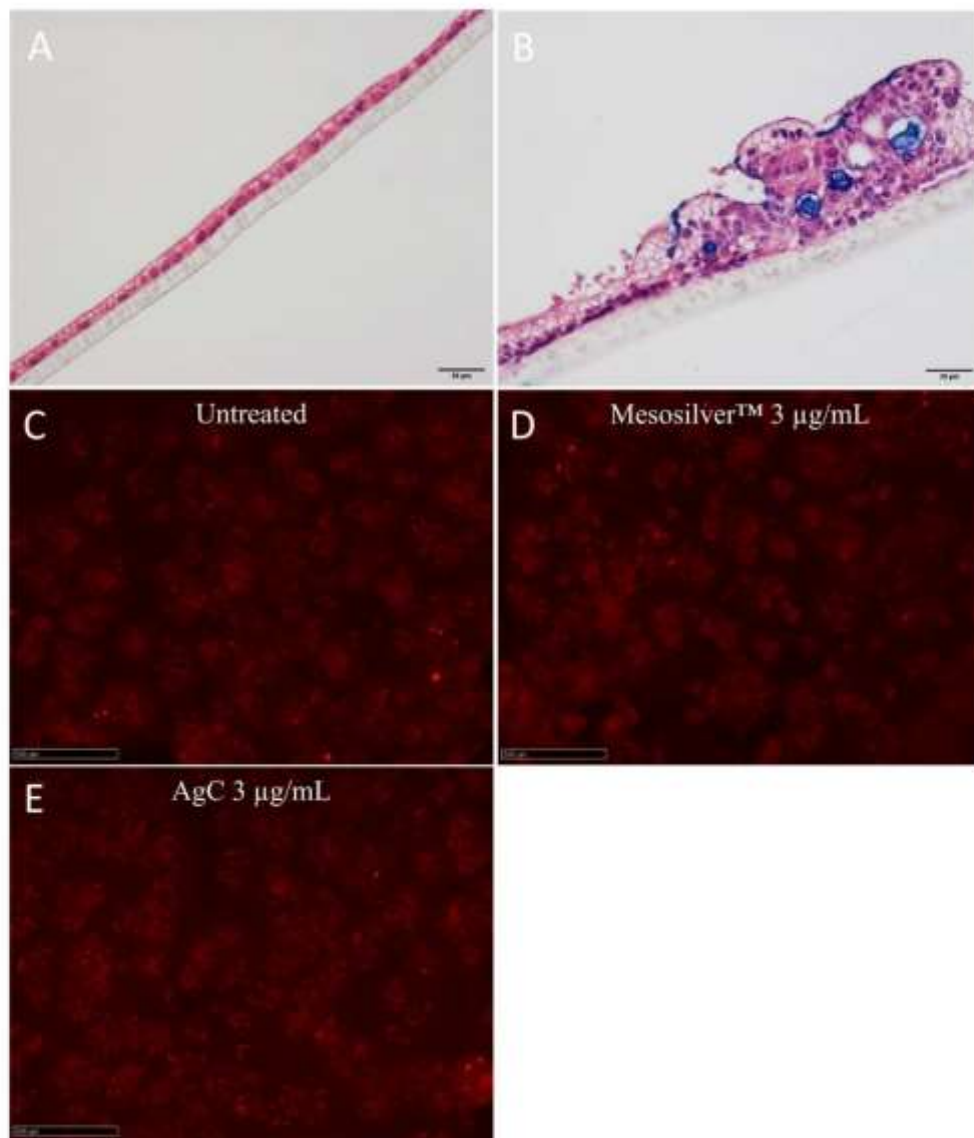


Fig. S3. Characterization of *in vitro* cell models. (A,B) Representative images of Caco-2 monoculture (A) and Caco-2/HT29-MTX co-culture (B) after Hemalun & Eosine staining with Alcian Blue; (C-E) MUC5AC immunofluorescence staining of Caco-2/HT29-MTX cells, untreated (C) or repeatedly exposed to Mesosilver™ (D) and AgC (E) at a concentration of 3 µg/mL for 18 days.

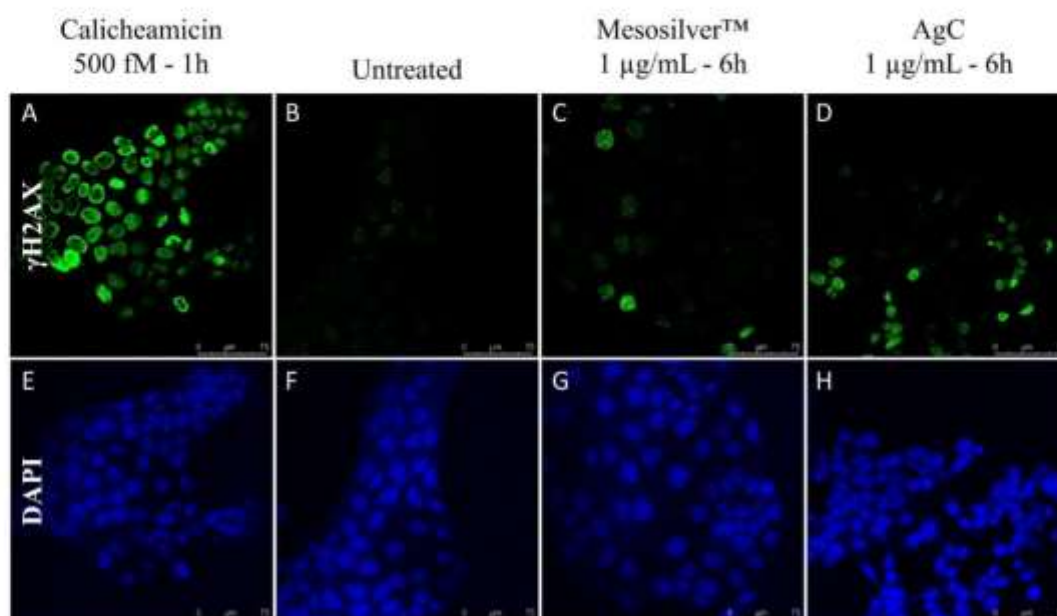


Fig. S4. Representative images of DNA damage induced by Mesosilver™ or AgC (concentration of 1 µg/mL) on Caco-2 proliferating cells after a 6-h acute exposure. DNA damage was measured by γ H2AX immunofluorescence staining (A-D); DAPI was used to stain cell nucleus (E-H). Positive control with 500 f. calicheamicin (A,E); untreated cells (B,F); cells exposed for 6 h to 1 µg/mL Mesosilver™ (C,G) or AgC (D,H). Scale bar corresponds to 75 µm.

Partie 2

Exposition orale à l'argent colloïdal commercial Mesosilver™ ou AgC chez la souris mâle adulte : biodistribution de l'argent et conséquences sur la fonction barrière intestinale intègre ou fragilisée par un stress psychologique chronique

1. Introduction

Les nanoparticules d'argent (AgNP) et l'argent ionique (Ag⁺) sont utilisés dans de nombreux produits de la vie courante pour leurs propriétés antimicrobiennes (Medici et al., 2019; Lem et al., 2011). C'est notamment le cas des compléments alimentaires qui sont vendus sous le nom d'argent colloïdal pour leurs effets supposés sur le bien être intestinal (Reed et al., 2014; Rong et al., 2018). La consommation régulière de ces produits pourrait avoir un impact délétère sur l'organisme et plus particulièrement sur la sphère digestive, celle-ci se trouvant la première exposée lors d'une prise orale. Différentes études *in vivo* rapportent les effets délétères des AgNP et/ou d'Ag⁺ sur la fonction barrière intestinale, tant sur l'épithélium (Chen et al., 2017; Shahare et al., 2013), le mucus (Jeong et al., 2010) que sur le microbiote, mais uniquement dans sa composante bactérienne (Chen et al., 2017; Van den Brule et al., 2016; Williams et al., 2015). Cependant, aucune étude à ce jour n'a évalué l'impact de formes « réelles » d'argent colloïdal ingéré par l'Homme. Or la toxicité induite par l'argent est fortement dépendante de ses propriétés physico-chimiques (taille et forme des AgNP, ratio AgNP/Ag⁺, etc.) (Reidy et al., 2013), ces dernières pouvant aussi varier avec l'environnement digestif (Cao et al., 2016; Cueva et al., 2019). Ainsi, les AgNP modèles utilisées jusqu'alors dans les études toxicologiques ne sont pas représentatives de l'argent colloïdal commercial réellement ingéré par le consommateur. De plus, aucune étude de la littérature n'a évalué l'impact de l'argent colloïdal sur une fonction barrière intestinale fragilisée par un stress psychologique chronique, avec des effets observés à la fois sur l'épithélium, le mucus et le microbiote intestinal (Da Silva et al., 2014; Ilchmann-Diounou and Menard, 2020; Lackner et al., 2010; Söderholm et al., 2002; Sun et al., 2013).

Enfin, l'étude bibliographique a montré l'intérêt de coupler différentes techniques analytiques pour une meilleure compréhension du devenir, des transformations physico-

chimiques ainsi que de la toxicité de l'argent sous sa forme nanoparticulaire et/ou ionique. Nous avons ainsi mis en œuvre dans la présente étude *in vivo* non seulement l'ICP-MS, en continuité avec l'approche *in vitro* présentée dans la partie précédente, mais également la micro-fluorescence X (μ XRF), combinée à la micro-absorption X (μ XAS), pour cartographier la présence d'argent dans les tissus organiques et déterminer son degré d'oxydation, ainsi que les interactions avec son environnement proche. Ce travail autour des apports analytiques avait également pour finalité de proposer une innovation méthodologique en nanotoxicologie alimentaire grâce à la spectroscopie proche infrarouge. Il s'agit d'une méthode de spectroscopie optique reposant sur l'étude de l'absorption des rayonnements électromagnétiques émis dans le proche infrarouge par des composés organiques. Le proche infrarouge est un domaine du spectre électromagnétique correspondant à la gamme de longueurs d'onde comprise entre 780 et 3000 nm (ISO 2007). La spectroscopie infrarouge est basée sur les transitions vibrationnelles. Elles correspondent à une augmentation des vibrations des molécules en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Lorsque l'énergie apportée par une longueur d'onde infrarouge est proche de l'énergie de vibration d'une liaison moléculaire, celle-ci absorbe une partie de cette énergie. L'analyse en spectroscopie proche infrarouge consiste à éclairer l'échantillon avec différentes longueurs d'ondes et de voir celles qui ont été absorbées. Ceci fournit un spectre d'absorption global dans le proche infrarouge, fournissant une « empreinte » de la composition organique de l'échantillon. Contrairement au moyen infrarouge, cette technique ne permet cependant pas d'identifier précisément les structures chimiques associées à l'empreinte observée à cause du chevauchement des bandes d'absorption fondamentales et des harmoniques. La spectroscopie proche infrarouge est très avantageuse, étant peu coûteuse, rapide à réaliser, non-destructive et ne demandant aucune préparation de l'échantillon avant analyse (Bertrand, 2002). Elle est donc couramment utilisée en agroalimentaire (Bertrand, 2002; Jimaré Benito et al., 2008; Li et al., 2020), mais également dans les procédés de synthèses chimiques (Chung, 2007) ou encore en pharmacologie (Razuc et al., 2019). A notre connaissance, il s'agit de la première application de la spectroscopie proche infrarouge en nanotoxicologie alimentaire, en explorant les conséquences liées à l'exposition orale à de l'argent colloïdal commercial sur l'organisme, et plus particulièrement sur la sphère digestive.

Dans la partie précédente, nous avons montré que les deux produits commerciaux d'argent colloïdal, le Mesosilver™ et l'AgC, composés respectivement d'AgNP majoritairement et d'Ag⁺ exclusivement, sont capables d'induire à des degrés différents une cytotoxicité, une génotoxicité et une altération de la fonction barrière intestinale *in vitro* sur des

modèles d'épithélium humain producteurs ou non de mucus (Gillois et al., 2020). Dans le contexte scientifique et méthodologique introduit ci-dessus, la présente étude, réalisée chez la souris mâle adulte, a pour objectifs 1) de déterminer la biodistribution et les transformations physico-chimiques de l'argent provenant de ces deux produits commerciaux lors d'une exposition orale à forte dose (de l'ordre de 3 mg/kg p.c./jour) avec des analyses effectuées après 7 ou 28 jours de traitement ; et 2) d'évaluer leur toxicité sur les acteurs de la fonction barrière intestinale (épithélium, mucus et microbiote), en choisissant un mode d'exposition plus représentatif de l'exposition humaine. Nous avons ainsi considéré les effets d'une exposition orale sub-chronique (28 jours) à une dose plus faible de 0,15 mg/kg p.c./jour, à la fois sur une fonction barrière intestinale intègre ou fragilisée par un stress psychologique chronique : le stress d'évitement passif de l'eau (WAS).

2. Matériels et méthodes

2.1. Argent colloïdal

L'argent colloïdal Mesosilver™, annoncé à 20 µg/mL et vendu en tant que complément alimentaire, a été acheté chez le fournisseur Purest Colloids, inc. (Westampton, NJ, États-Unis) en 2018. L'argent colloïdal AgC, annoncé à 15 µg/mL et commercialisé en France par le laboratoire Bio Colloïdal (Saint-Fort, France), a également été acheté en 2018. La concentration en argent, mesurée par ICP-MS, a été rectifiée à 22,1 µg/mL pour le Mesosilver™ et 17,1 µg/mL pour l'AgC. Ces concentrations ont alors servi au calcul des doses d'exposition. Les deux produits d'argent colloïdal ont été stockés à température ambiante et à l'obscurité pendant toute la durée des expérimentations.

2.2. Animaux

Des souris mâles C57BL/6N âgées de six semaines (poids $21,6 \pm 1,6$ g ; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) ont été utilisées dans cette étude. Elles ont été maintenues en animalerie en condition exempte de tout pathogène à une température constante ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) avec un cycle jour/nuit de 12 h. Les animaux ont eu libre accès à l'eau et à l'aliment (Harlan Teklad 2018, Envigo, Indianapolis, IN, USA). Pour minimiser le stress lors de la réception, une semaine d'acclimatation a été mise en place avant la réalisation des expérimentations. Les procédures et protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique local,

conformément à la directive européenne 2010/63/UE (accords #TOXCOM_213HRO et APAFiS #15298– 2018053011161943).

2.3. Protocoles expérimentaux

Deux types de protocole expérimental ont été mis en œuvre : le premier pour l'étude de la biodistribution et le second pour l'évaluation toxicologique des deux produits commerciaux d'argent colloïdal en condition de fonction barrière intestinale intègre ou fragilisée. Cette dichotomie a été nécessaire afin, d'une part, de pouvoir déterminer la biodistribution de l'argent à une dose compatible avec la limite de détection en ICP-MS, et d'autre part de déterminer l'impact toxicologique sur la fonction barrière intestinale à une dose d'exposition inférieure, plus réaliste vis-à-vis de l'exposition humaine.

2.3.1. Biodistribution de l'argent colloïdal

Les expérimentations ont été réalisées sur un total de 11 souris réparties en 3 groupes. Après l'acclimatation d'une semaine, l'eau de boisson des animaux a été remplacée par du Mesosilver™ (4 animaux) ou de l'AgC (3 animaux), étant alors la seule source hydrique disponible. L'eau de boisson correspond au groupe contrôle (4 animaux). Etant donné les différences de concentration initiale entre les deux produits commerciaux, il est à noter un écart modéré entre les doses administrées (voir section 3.3.1, p146). L'exposition a été réalisée sur une durée totale de 28 jours ; un suivi du poids, de la consommation alimentaire et hydrique a été réalisé régulièrement (tous les 3-4 jours). Au 7^{ème} jour d'exposition, un animal du groupe contrôle et un animal du groupe Mesosilver™ ont été sacrifiés pour l'étude, à partir du foie et du contenu colique, de la localisation et de la forme de l'argent après digestion en μ XRF sur la ligne de lumière LUCIA du Synchrotron SOLEIL. Les 3 animaux restants pour chaque groupe ont été sacrifiés au 28^{ème} jour d'exposition pour l'analyse de la biodistribution de l'argent par ICP-MS dans les différents organes, tissus et contenus d'intérêt.

2.3.2. Toxicité orale de l'argent colloïdal

Les expérimentations ont été réalisées sur un total de 72 souris subdivisées en 6 groupes (12 animaux/groupe) : 3 groupes en condition physiologique et 3 groupes en condition physiopathologique ayant subi le stress psychologique chronique WAS. Pour chaque condition, le premier groupe a reçu 0,15 mg/kg p.c./jour de Mesosilver™, le second groupe 0,15 mg/kg

p.c./jour d'AgC et le dernier groupe de l'eau stérilisée milliQ (contrôle) par administration orale (gavage, 200 µL maximum/gavage) sur une durée totale de 28 jours. Le gavage a été réalisé du lundi au vendredi à 9 h du matin. Les lundi et vendredi, un deuxième gavage a été réalisé l'après-midi (17 h) pour s'affranchir de l'absence de gavage durant le week-end. Sur les deux dernières semaines, les animaux soumis au WAS ont été placés 1 h par jour sur une plateforme de 3 x 3 cm² fixée au centre d'une bassine de 40 x 40 cm² remplie d'eau du robinet jusqu'à atteindre un niveau à 1 cm en dessous de la plateforme. Chaque session de WAS a été réalisée le matin entre 8 h et 9 h, du lundi au vendredi (10 jours au total), avec un suivi de la défécation. L'état sanitaire des animaux a été contrôlé quotidiennement et la consommation alimentaire et hydrique suivie régulièrement (tous les 3-4 jours). Au 26^{ème} jour d'exposition, une mesure de la perméabilité intestinale *in vivo* a été réalisée. Au 28^{ème} jour d'exposition, les fèces ont été collectées puis stockées à -80°C pour l'analyse du microbiote, puis les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Les tissus intestinaux (jéjunum, côlon) ont été congelés dans l'azote liquide pour une analyse ultérieure en RT-qPCR afin d'évaluer l'expression des gènes d'intérêt. Les contenus coliques ont été prélevés pour la mesure de la lipocaline-2. Les muqueuses du jéjunum et du côlon ont été grattées puis stockées à -80°C pour l'analyse du O-glycobiome du mucus. Des échantillons de côlon distal, avec contenu, ont été fixés en solution Carnoy (60 % (v/v) éthanol, 30 % (v/v) chloroforme, 10 % (v/v) acide acétique glacial) pour déterminer l'épaisseur du mucus.

2.4. ICP-MS

La biodistribution de l'argent a été déterminée par ICP-MS dans les différents organes (foie, rate, rein), tissus intestinaux (jéjunum, côlon) et contenus intestinaux (jéjunum, iléon, caecum et côlon). À la fin de l'exposition de 28 jours par la boisson, les organes, tissus et contenus d'intérêt ont été prélevés et directement congelés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C jusqu'à envoi à l'Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA) de Nantes. Les analyses ont été réalisées par Marie-Hélène Ropers (BIA, Nantes) et Hélène Terrisse (Institut des Matériaux Jean Rouxel, Nantes – IMN) au Laboratoire de Planétologie et Géodynamique (LPG Nantes, UMR 6112) sur un appareil ICP-MS-Q (spectromètre à plasma à couplage inductif quadripolaire, Varian 820-MS; Melbourne, Australie). Pour ces analyses, deux échantillons pour chaque condition (n=2) ont été considérés. Les échantillons, préalablement pesés, ont été digérés avec 2 mL d'acide nitrique HNO₃ concentré (65 %) pendant 30 min à 65°C, puis portés à 110°C pendant 2 h. 375 µL de la solution, préalablement refroidie, ont été

prélevés et dilués avec de l'eau ultrapure jusqu'à obtenir une concentration en HNO₃ de 2 %. Pour les échantillons présentant encore un trouble à l'issue de cette préparation, une centrifugation a été effectuée à 3000 g pendant 5 min.

La concentration totale d'argent a été déterminée par étalonnage externe en utilisant des solutions étalons de référence (étalon de référence IONEX à 1000 µg/mL ; ChemLab, Zedelgem, Belgique). Chaque étalon a été préparé pour obtenir une solution à 2 % de HNO₃, comme pour les échantillons à analyser. Les deux isotopes d'argent analysés (107Ag et 109Ag) ont donné des résultats similaires. 115In a été utilisé comme étalon interne. Pour ces analyses, la limite de détection et la limite de quantification sont de 0,109 et 0,230 ng/g de tissu, respectivement.

2.5. Cartographie en micro-fluorescence X et micro-absorption X

2.5.1. *Caractéristiques et réglages de la ligne de lumière LUCIA*

Les expérimentations et analyses ont été réalisées par Marie-Hélène Ropers (BIA – Nantes), Bernard Humbert (IMN – Nantes), Muriel Mercier-Bonin (Toxalim – Toulouse) et Camille Rivard (INRAE-SOLEIL, Gif-sur-Yvette) sur la ligne de lumière LUCIA (Ligne Utilisée pour la Caractérisation par Imagerie et Absorption, Vantelon et al., 2016) au Synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France). Cette ligne de lumière permet de combiner l'imagerie µXRF à la µXAS dans le domaine des rayons X mous et tendres (0,6 à 8 keV). Le monochromateur utilisé pour déterminer l'énergie de la ligne pour le seuil L3 de l'argent est un monochromateur double cristaux de Si(111). La calibration du monochromateur a été réalisée à partir du spectre XANES obtenu d'une feuille d'argent métallique (DeRoche, Villejuif, France). Le faisceau est focalisé à 3,1 x 2,6 µm² (H x V) à l'aide de miroirs en configuration Kirkpatrick-Baez. Le détecteur de fluorescence utilisé est une diode en Si mono-élément de 60 mm² (Bruker). La chambre expérimentale est sous vide afin de réduire l'absorption et la diffusion des rayons X par l'air. Elle est équipée d'un cryostat à azote liquide connecté par une tresse en cuivre au porte-échantillon permettant de maintenir une température de -140°C sur l'échantillon. Les échantillons sont transférés congelés dans la chambre expérimentale sous vapeur d'azote liquide afin de maintenir la chaîne du froid.

2.5.2. Préparation des échantillons

Après 7 jours d'exposition, un animal du groupe contrôle et un animal ayant été exposé au Mesosilver™ par la boisson ont été sacrifiés. Un prélèvement du foie et du contenu colique (côlon distal) a été réalisé et les échantillons ont été cryofixés dans l'isopentane préalablement refroidi à -160°C dans l'azote liquide puis stockés à -80°C avant transfert au Synchrotron SOLEIL. Des coupes de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryo-microtome (Shandon Cryotome FSE Cryostats, Thermo Fisher Scientific). Les sections fines ont été placées entre deux films d'ultralène (SPEX SamplePrep) dans un support en cuivre de la ligne LUCIA.

Pour la préparation des références, une poudre d'AgCl (99% pur ; PanReac, Castellar del Vallès, Espagne) a été broyée sur un support en cuivre. Les complexes argent-glutathion réduit (Ag-GSH) ont été préparés selon le protocole de Doolette et al. (2013) et conservés sous atmosphère anoxique jusqu'à l'analyse. Ils permettent ainsi d'obtenir un spectre XANES d'argent lié à une fonction thiol. Pour les références sous forme de liquide (argent colloïdal Mesosilver™ et complexes Ag-GSH), une goutte de la solution a été prélevée, déposée sur un support en cuivre et immédiatement immergée dans l'azote liquide pour une congélation rapide.

2.5.3. Acquisition des données

Les cartes µXRF ont été collectées à 3,5 keV sur des zones d'environ 750 x 750 µm² en acquisition continue (mode flyscan) avec une taille de pas équivalent de 3 µm et un temps d'acquisition de 200 ms/pixel. Trois échantillons ont été analysés : le contenu colique de l'animal en condition contrôle et le contenu colique et le foie de l'animal ayant été exposé au Mesosilver™ par la boisson sur une durée de 7 jours. Ces cartes permettent de localiser l'argent, de visualiser son abondance relative et d'identifier les co-localisations avec d'autres éléments (soufre, chlore, etc.) présents dans les organes, tissus et contenus intestinaux. Les zones d'acquisition des spectres µXANES ont été choisies en fonction de ces cartes, en veillant à sélectionner à la fois des points avec une abondance faible ou élevée en argent. Les spectres XANES ont été enregistrés en fluorescence sur la gamme d'énergie de 3,3 à 3,5 keV en adaptant la taille des pas en fonction de la gamme en énergie du XANES (pas de 0,5 eV autour du seuil entre 3,33 et 3,40 keV) et avec un temps d'acquisition de 5 s/point.

2.5.4. *Traitement des données*

Lors de l'acquisition des cartes, un spectre de fluorescence a été collecté en chaque pixel de la carte. Le logiciel PyMCA (Solé et al., 2007) a été utilisé pour modéliser chaque spectre de fluorescence et extraire les cartes élémentaires correspondant aux éléments présents dans le spectre. Le signal de fluorescence a été corrigé par le signal du faisceau incident et par la valeur du temps mort du détecteur. Les cartes de fluorescence RGB ont été produites en utilisant le logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012) .

Les spectres XANES ont été traités selon les procédures standard en utilisant le logiciel Athena de la suite Demeter (Ravel and Newville, 2005). Le seuil en énergie E₀ a été choisi comme le maximum de la dérivée première du spectre XANES. Le bruit de fond a été soustrait des spectres en utilisant une régression linéaire dans la région avant seuil et une régression polynomiale après seuil afin d'obtenir un signal horizontal après seuil.

2.6. Spectroscopie proche infrarouge

2.6.1. *Acquisition des spectres*

Des spectres proche infrarouge ont été collectés, grâce à la collaboration mise en place avec l'Ecole d'Ingénieurs de PURPAN de Toulouse et Cécile Levasseur, sur des souris issues des deux protocoles d'exposition mis en œuvre, soit par la boisson (3 animaux/groupe), soit par gavage, mais uniquement en condition physiologique (3 animaux contrôles, 5 animaux exposés au Mesosilver™, 5 animaux exposés à l'AgC). Après sacrifice, un spectromètre MicroNIR OnSite (Viavi, États-Unis) a été utilisé en mode réflectance directement sur les tissus intestinaux (jéjunum, iléon, côlon) et contenus intestinaux (estomac, jéjunum, caecum et côlon), ainsi que sur le foie. Ce dispositif a pour grand avantage d'être portable et peu volumineux ; l'acquisition peut être très rapidement effectuée (1 s) sur l'échantillon préalablement déposé sur une feuille d'aluminium. Chaque spectre est la moyenne de 100 scans sur une gamme spectrale de 908 à 1676 nm, avec un pas de 6 nm. Les spectres de réflectance ont été convertis en spectres d'absorbance en utilisant le logiciel du spectromètre MicroNIR™ Pro v2.5. Pour chaque échantillon, 10 mesures ont été réalisées.

2.6.2. Chimiométrie

Du fait de la complexité des spectres obtenus, un traitement informatique et mathématique a été mis en place, faisant appel au domaine de la chimiométrie, dont la profondeur d'analyse dépend du type d'échantillon et des informations recherchées. Le bruit et les décalages des spectres bruts ont tout d'abord été corrigés par MSC (*Multiplicative Scatter Correction*) et l'ensemble des 10 spectres, pour un échantillon donné, ont été moyennés.

Une analyse en composantes principales (ACP) a ensuite été réalisée pour simplifier les données spectrales en passant de 125 variables, les longueurs d'onde, à 20 composantes principales non corrélées entre elles. Ces composantes principales vont servir de variables explicatives lors de la construction du modèle selon deux étapes : 1) développement du modèle, d'une part à partir des 69 spectres pour l'étude relative à l'exposition au Mesosilver™ et à l'AgC par la boisson, et d'autre part sur les 75 spectres pour celle de l'exposition aux deux produits d'intérêt par gavage ; 2) validation croisée.

Les modèles prédictifs sont mis en place à partir d'arbres de classification⁹, réalisés avec Minitab (Minitab Inc, Statistical Software version 19, State College, PA, États-Unis), utilisant les 20 composantes principales comme variables discriminantes. Pour la validation croisée, l'ensemble des spectres ont été divisés en 10 groupes, et chaque sous-groupe a successivement été confronté aux 9 autres groupes de données, afin d'obtenir en fin d'analyse le meilleur modèle de prédiction. La qualité de prédiction du modèle a été évaluée à travers une matrice de confusion.

2.7. Perméabilité intestinale *in vivo*

La fluorescéine isothiocyanate-dextran de poids moléculaire 4 kDa (FD4) est un marqueur fluorescent permettant de mesurer la perméabilité intestinale *in vivo* en mesurant son taux plasmatique après administration orale (Moussaoui et al., 2014; Woting and Blaut, 2018). Au 26^{ème} jour d'exposition, les animaux ont été mis à jeun sur une durée de 3 h puis il leur a été administré par gavage oral une solution de FD4 (TdB, Uppsala, Suède) à une dose de 750 mg/kg p.c. (solution préparée à 200 mg/mL dans de l'eau, administration d'environ 100 µL par souris). 3 h après administration, environ 50 µL de sang ont été prélevés à la veine sous-mandibulaire et centrifugés à 3500 g pendant 10 min. Le plasma a été récupéré et dilué au 1/10^{ème} dans une

⁹ <https://www.statsoft.fr/concepts-statistiques/arbres-de-classification/arbres-de-classification.php>

solution saline (NaCl 0,9 % (m/v), Sigma) puis la fluorescence du FD4 a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 385 nm et une longueur d'onde d'émission de 525 nm avec un fluoromètre SPARK (TECAN, Männedorf, Suisse). Une gamme étalon, réalisée à partir de la solution de FD4 à 200 mg/mL, a permis de déterminer la concentration sanguine de FD4 à partir des valeurs de fluorescence obtenues. Les résultats sont exprimés en pourcentage comparativement à la moyenne du groupe contrôle.

2.8. Concentration de la lipocaline-2 colique

La lipocaline-2 (LCN-2) est une lipocaline associée à la *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL), contenue dans les granules des neutrophiles et utilisée comme biomarqueur de l'inflammation intestinale (Chassaing et al., 2012; Yvon et al., 2019). Pour quantifier la LCN-2, le contenu colique (environ 50 mg), collecté au cours du sacrifice, a été broyé au FastPrep (MP Biomedicals, Illkirch, France ; 20 s à 6 m/s) en présence de 0,5 mL de PBS froid (4°C) contenant un cocktail d'anti-protéases (cOmplete ; Roche, Bâle, Suisse). Une centrifugation a été réalisée pendant 10 min à 13000 g à 4°C, puis le surnageant a été stocké à -80°C jusqu'à analyse. La mesure du taux de LCN-2 dans les échantillons a été réalisée à l'aide du kit ELISA LCN-2 murin Duoset (R&D Systems, Minneapolis, MN, États-Unis). Les valeurs obtenues ont été normalisées par la masse du contenu colique préalablement broyé.

2.9. Expression génique dans le jéjunum et le côlon

2.9.1. Extraction ARN et rétrotranscription

L'extraction de l'ARN des tissus a été réalisée avec le RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les procédures indiquées par le fournisseur. Les tissus, préalablement stockés à -80°C, ont été rapidement déposés dans un tube fast prep lysing beads matrix D (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) en présence de tampon de lyse dans la glace (tampon RLT + 1 % β -mercaptoéthanol). Les tissus ont été immédiatement broyés au Precellys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) avec deux sessions de 10 s à 10000 rpm, séparées d'un temps d'attente de 15 min dans la glace. Les étapes de purifications et de centrifugations successives ont été réalisées en accord avec les préconisations du kit et la fraction purifiée d'ARN a été stockée à -80°C jusqu'à rétrotranscription. La qualité de l'ARN a été vérifiée avec la TapeStation 4200 (Agilent, Santa Clara, CA, États-Unis) et la concentration déterminée à l'aide du DropSense96 (Trinean, Gand, Belgique) de la plateforme

GeT-TRIX (Génomique et Transcriptomique) de Toulouse. La rétrotranscription de l'ARN (1 µg) en ADNc a été réalisée avec l'enzyme IScript reverse transcription supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis) sur le thermocycleur CFX96 (Bio-Rad) avec le programme suivant : 5 min à 25°C, 30 min à 42°C et 5 min à 95°C. Les ADNc ont été dilués au 1/10^{ème} et stockés à -20°C avant analyse par qPCR de l'expression des gènes d'intérêt.

2.9.2. qPCR

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été réalisée en plaque 384 puits sur un appareil ViiA7 (Applied Biosystem, Naerum, Danemark) dans un volume final de 5 µL avec 1 µL d'ADNc dans un tampon de réaction IQ SybrGreen Supermix (Bio-Rad) contenant 600 nM des amorces sens et anti-sens. Les séquences des amorces utilisées sont données dans le Tableau 5. L'efficacité de la PCR pour chaque paire d'amorces a été calculée par le logiciel LinRegPCR. Chaque échantillon a été analysé en double et l'amplification spécifique du gène analysé a été contrôlée par évaluation de la courbe de fusion des produits de la PCR. Le niveau d'expression relatif des gènes considérés a été calculé par la méthode $\Delta\Delta C_t$ ($2^{\Delta\Delta C_t}$), avec comme gène de référence l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (*Hprt*).

Tableau 5 : liste des amorces utilisées pour la qPCR.

Catégorie	Gènes		Séquences amorces	
Gène de référence	<i>Hprt</i>	sens :	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	
		anti-sens :	GGGGCTGTAAGTCTTAACCAG	
Inflammation	<i>Tnfa</i>	sens :	CCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC	
		anti-sens :	GGTCTGGGCCATAGAAGTGTG	
	<i>Il1β</i>	sens :	ACCTTCCAGGATGAGGACATGAG	
		anti-sens :	CATCCCATGAGTCACAGAGGATG	
	<i>Il6</i>	sens :	CGTGGTTGTCACCAGCATCA	
		anti-sens :	CTCTGCAAGAGACTTCCATCCAGT	
Peptides antimicrobiens	<i>Lyz</i>	sens :	CTGGCTGACTGGGTGTGTTTAG	
		anti-sens :	GGATCTCTCACCACCCTCTTTG	
	<i>Camp</i>	sens :	AAGGAACAGGGGTGGTG	
		anti-sens :	CCGGGAAATTTTCTTGAACC	
Mucus	<i>Tff3</i>	sens :	CTGGTGCTTCAAACCTCTGC	
		anti-sens :	GCCTGGACAGCTTCAAATG	
	<i>Muc1</i>	sens :	TTGGTTGCTTTGGCTATCGT	
		anti-sens :	TTACCTGCCGAAACCTCCT	
	<i>Muc2</i>	sens :	ATTATTCTGAAGCCTGGGGAGA	
		anti-sens :	TGGAGCCTGAAACACAATCACT	
	<i>Muc3</i>	sens :	GTGATCCTCGTGATCCTCCTC	
		anti-sens :	GTTTAGGGAAGGCTGGAAGGT	
	<i>Muc4</i>	sens :	GGCTCTGAACCTAAGTATGCTG	
		anti-sens :	CCGTAGAATGCCCAAGTTT	
	Jonctions cellulaires	<i>Zo1</i>	sens :	AATTATCCCACAAGGAGCCATT
			anti-sens :	ACACATCACTAGGGGGCTCAG
<i>Ocln</i>		sens :	GCTGGATGACTACAGAGAGGAGA	
		anti-sens :	TTTGCTCTTCAACTGCTTGC	
<i>Cln1</i>		sens :	GCTGTCATTGGGGGCATAATA	
		anti-sens :	GGGGTCAAGGGGTCATAGAAT	
<i>Cln2</i>		sens :	GGGCTGTTAGGCACATCCAT	
		anti-sens :	GTCGCACACTCCATCCAGAG	
<i>Cln5</i>		sens :	TTTCTTCTATGCGCAGTTGG	
		anti-sens :	GCAGTTTGGTGCCTACTTCA	
<i>JamA</i>		sens :	TCTTGATTTTGGCGTCTGG	
		anti-sens :	ACTGGGCTGGCTGTAAATGA	

2.10. Epaisseur du mucus dans le côlon distal

2.10.1. Préparation des colorations

Les échantillons de côlon distal avec contenu ont été fixés en solution Carnoy au cours de la nuit suivant le sacrifice. Par la suite, les tissus ont été déshydratés en utilisant le Thermo Scientific™ Excelsior™ ES Tissue Processor (Thermo Fisher Scientific) avec le programme de bains successifs suivant : 2 x 60 min dans l'éthanol anhydre, 2 x 60 min de butanol, 480 min de butanol, 3 x 80 min de paraffine à 60°C. Les tissus ont été inclus en blocs de paraffine en utilisant une station d'enrobage en paraffine HistoStar™ Embedding Workstation (Thermo Fisher Scientific). Une fois les blocs de paraffine formés, des sections de 5 µm d'épaisseur en coupes transversales ont été réalisées avec un microtome Microm™ HM 340 E (Thermo Fisher Scientific) et déposées sur lames (Thermo Scientific Menzel-Gläser Superfrost®, Thermo Fisher Scientific). Les coupes obtenues ont été déparaffinées en utilisant du Ottix Plus™ (Microm Microtech, Brignais, France), puis réhydratées par une série de bains indiqués dans le Tableau 6 ; sont également indiquées les différentes étapes de coloration réalisées en Hématoxyline/Eosine et Bleu Alcian. En fin de traitement, les lames ont été rapidement égouttées et les échantillons montés entre lame et lamelle avec le milieu de montage Diamount (DiaPath, Martinengo, Italie). Les lames ont été séchées 12 h avant la première observation au microscope. Les images ont été obtenues par scanner de lame NanoZoomer HT (Plateforme d'imagerie TRI-Genotoul, Campus INRAE Auzeville) avec un objectif à grossissement 200x.

Tableau 6 : étapes pour la réalisation des colorations Hématoxyline/Eosine et Bleu Alcian

Processus	Solution	Temps (min)
Hydratation	Ottix Plus™	30 + 2 + 2
	Ethanol anhydre	3 + 3
	Ethanol 95°	3 + 3
	H ₂ O distillée	2 + 2
Coloration	Hématoxyline	2
	H ₂ O courante	7
	H ₂ O distillée	2
	Bleu Alcian (pH 3.0)	15
	H ₂ O courante	1 + 1 + 1
	H ₂ O distillée	2
	Eosine	2
Déshydratation	Ethanol 95°	2
	Ethanol anhydre	3 + 3
	Ottix Plus™	2 + 2 + 5

2.10.2. Analyse d'images

Le traitement d'images a débuté avec le logiciel NDP view 2 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japon) dans le but d'identifier les zones d'intérêt et d'exporter les images sous un format compatible avec le logiciel Fiji Image J (Schindelin et al., 2012). L'épaisseur du mucus a ensuite été mesurée avec ce logiciel sur tout le pourtour du contenu colique avec un pas de mesure de 100 μm . Pour chaque coupe (soit environ 60 mesures/coupe), l'épaisseur moyenne et le coefficient de variation (correspondant à l'écart-type divisé par la moyenne) ont été déterminés. Une coupe représentative par animal a été analysée.

2.11. O-glycosylation des mucines jéjunales et coliques

Cette analyse a été effectuée en collaboration avec Catherine Robbe-Masselot de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq. Les différentes étapes nécessaires sont détaillées ci-après.

2.11.1. Extraction des mucines

Les mucines jéjunales et coliques, contenues dans les muqueuses grattées, ont été solubilisées dans un tampon d'extraction (4 M de chlorure de guanidine, 5 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), 10 mM de benzamidine, 5 mM de N-éthylmaléimide, 0,1 mg/mL d'inhibiteur de trypsine et 1 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyle). Du chlorure de césium a été ajouté pour atteindre une densité initiale de 1,4 g/mL. Les mucines de densité comprise entre 1,35 et 1,4 g/mL sont purifiées par ultracentrifugation en gradient de densité à 417600 g à 15°C pendant 72 h (ultracentrifugeuse Beckman Coulter LE80 K; rotor 70.1 Ti). Les mucines ont été repérées par une coloration au PAS (*Periodic Acid Schiff*) après transfert des différentes fractions sur une membrane de nitrocellulose par slot-blotting.

2.11.2. β -élimination

Les fractions contenant les mucines ont été rassemblées, dialysées et lyophilisées. Les mucines ont été soumises à une β -élimination dans des conditions réductrices (0,1 M NaOH, 1 M BH_4Na) pendant 24 h à 45°C. Les sels de borate ont été éliminés par plusieurs co-évaporations avec du méthanol avant purification sur une colonne de résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 2, 200–400 mesh, forme H^+). Les oligosaccharides ont été élués avec de

l'eau déminéralisée tandis que les peptides sont restés fixés sur la résine. Les glycanes libérés sous forme d'oligosaccharides-alditols ont été lyophilisés.

2.11.3. Perméthylation et purification

La perméthylation des oligosaccharides-alditols, sous forme anhydre, a été réalisée par dissolution dans une solution de perméthylation (200 μ L de diméthylsulfoxyde, 300 μ L de iodométhane, 1 g NaOH), placée sous agitation pendant 2 h et stoppée avec ajout de 1 mL d'acide acétique (5 % (v/v)). Une nouvelle purification a été réalisée sur colonne C18 Sep-Pak (Oasis HLB, Waters, Milford, MA, USA) en présence de méthanol.

2.11.4. Analyse des oligosaccharides purifiés

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse de géométrie MALDI-TOF-TOF de type Analyzer 4800 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada) équipé d'une source laser. Les échantillons ont été dissous dans un solvant méthanol/eau (50:50) et déposés sur une cible MALDI en addition avec une matrice DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) à une dilution volume/volume. Pour chaque structure d'intérêt, l'intensité de 10 pics d'expériences indépendantes a été mesurée. La moyenne et l'écart-type de ces intensités ont été calculés. Un exemple de spectre après analyse est présenté dans la Figure 27.

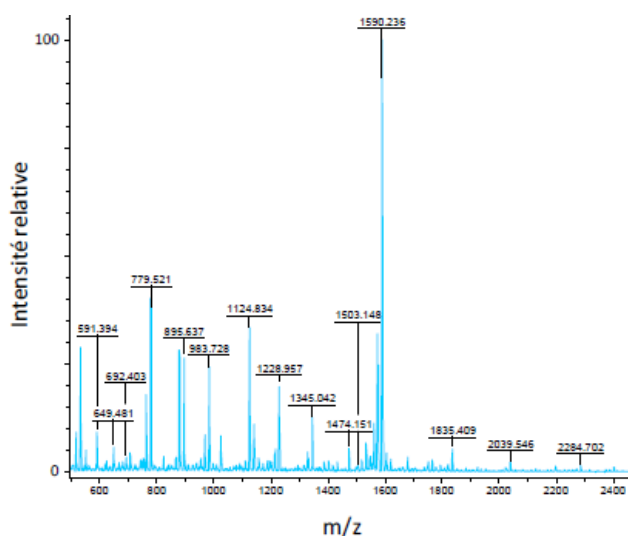


Figure 27 : exemple de spectre MALDI des O-glycanes perméthylés issus des mucines intestinales purifiées. Pour les O-glycanes perméthylés, la charge « z » vaut 1, l'axe des abscisses pouvant donc être également exprimé en Daltons (référant à « m » pour masse).

2.12. Composition du microbiote fécal

L'analyse au niveau fécal de la composition des microbiotes bactérien et fongique pour l'ensemble des animaux traités a été effectuée en fin d'exposition (jour 28) grâce à la collaboration avec Emmanuelle Maguin et Mathias Lavie-Richard de l'Institut Micalis à Jouy en Josas.

2.12.1. Génération d'amplicon ARNr 16S et ITS2 pour le séquençage MiSeq

L'ADN génomique présent dans les fèces a été extrait selon la procédure décrite par Godon et al. (1997) avec quelques modifications. L'intégrité et la concentration de l'ADN extrait ont été vérifiées par spectrométrie NanoDrop®.

La diversité bactérienne a été déterminée pour chaque échantillon en ciblant une partie des gènes ribosomiaux. La région V3-V4 a été amplifiée au cours de 30 cycles d'amplifications à 65°C à partir d'ADN purifié avec les amorces F343 (CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG) et R784 (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT). Les longueurs d'amplicon étaient d'environ 510 pb (la longueur exacte varie en fonction de l'espèce). L'amplicon a été purifié pour éliminer les amplifications non spécifiques. Les amplicons ont été placés par la suite dans une plaque de 96 puits puis envoyés à la plateforme de séquençage « Génome et Transcriptome » (GeT) de GenoToul (Toulouse, France). Les amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNr 16S sont : AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGAC (amorce directe) CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGT (amorce inverse) pour 12 cycles de PCR à l'aide de la technologie IlluminaMiSeq®.

Une approche similaire a été utilisée pour le microbiote fongique en utilisant les amorces ITS2 (sens) 5'-GTGARTCATCGAATCTTT-3' et (antisens) 5'-GATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'. Les ADN ont été envoyés à l'entreprise Genoscreen (Lille) qui a effectué la PCR et le séquençage à l'aide de la technologie IlluminaMiSeq®.

2.12.2. Analyse bio-informatique

Les lectures ont été regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU, abréviation de l'anglais "Operational Taxonomic Unit") au niveau d'identité de 97% à l'aide

de l'outil Galaxy pour les séquences 16S (Escudié et al., 2018) et grâce au pipeline dédié sous FROGS¹⁰ pour les séquences ITS. Chaque OTU a été assignée à différents niveaux taxonomiques (du phylum jusqu'à l'espèce) moyennant la base de données Silva et le classificateur RDP pour le microbiote bactérien (Wang et al., 2007) et la base de données UNITE ITS pour le microbiote fongique (Kõljalg et al., 2013).

2.13. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Le traitement statistique de ces données a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism, version 8.3 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, États-Unis). L'homogénéité des variances (test de Bartlett) a été vérifiée afin de déterminer la réalisation d'analyses paramétriques ou non paramétriques. Dans le cas de validation de l'homogénéité des variances, un test ANOVA à 1 facteur a été effectué avec un post-test de Tukey. Dans le cas contraire, un test Kruskal Wallis a été réalisé avec un post-test de Dunn. Dans l'étude de la O-glycosylation des mucines, un test ANOVA à 2 facteurs a été choisi avec un post-test de Tukey. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives pour une valeur $p < 0,05$.

Les analyses statistiques des données de séquences 16S pour le microbiote bactérien ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2015, R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche). La diversité alpha a été estimée à l'aide de l'indice de diversité de Shannon ou du nombre d'espèces observées. La diversité bêta a été mesurée par une matrice de distance de Bray – Curtis et a été utilisée pour construire des graphiques d'analyse en composantes principales (PCoA). Après raréfaction de toutes les séquences à des profondeurs d'échantillonnage égales, les abondances de toutes les familles ont été calculées en agglomérant les OTU attribuées à ces familles. Pour chacune de ces familles, le test statistique Kruskal-Wallis, suivi du test de Dunn, a été réalisé pour détecter les combinaisons significativement différentes en termes d'abondance. Le niveau de signification a été fixé à $p \leq 0,05$. La même procédure a été appliquée pour chaque genre et pour chaque OTU.

Concernant l'analyse des données de séquences ITS du microbiote fongique, l'outil R a aussi été utilisé avec le package Phyloseq pour l'analyse en alpha et bêta diversités (cf. analyse 16S). DeSeq2 sous R et LefSE¹¹ sous Galaxy ont été utilisés pour les analyses différentielles.

¹⁰ <http://frogs.toulouse.inra.fr>

¹¹ <https://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>

Ce sont deux outils particulièrement adaptés à l'analyse de données de séquençage où les tableaux d'analyse sont essentiellement remplis de zéro (donnée « sparse ») et que des outils classiques d'analyse statistique ne peuvent pas analyser de manière performante.

3. Résultats et Discussion

Dans cette étude, deux protocoles d'exposition par voie orale aux produits commerciaux d'argent colloïdal, le Mesosilver™ et l'AgC, ont été réalisés. D'une part, des animaux ont été exposés au Mesosilver™ ou à l'AgC directement par la boisson sur une durée totale de 28 jours, représentant leur seule source d'apport hydrique journalier. Cette procédure a eu pour objectif de déterminer la biodistribution de ces produits dans différents tissus et organes, avec dans le cas du Mesosilver™ un focus sur les transformations physico-chimiques subies lors de la digestion *in vivo*. La dose élevée choisie (de l'ordre de 3 mg/kg p.c./jour) a permis de s'affranchir des limites de sensibilité de la méthode ICP-MS mise en œuvre ici pour détecter et quantifier l'argent dans les différentes matrices biologiques. D'autre part, des animaux ont été exposés au Mesosilver™ ou à l'AgC par gavage quotidien à une dose plus faible de 0,15 mg/kg p.c./jour sur une durée totale de 28 jours. Au cours de ce protocole, un stress WAS a été appliqué sur la moitié des animaux traités, durant les deux dernières semaines. Cette procédure a eu pour objectif d'évaluer l'impact de ces deux produits d'argent colloïdal à une dose plus représentative de l'exposition humaine, en considérant une fonction barrière intestinale intègre ou fragilisée par le WAS pour révéler de possibles effets de potentialisation ou d'exacerbation.

3.1. Détermination de la biodistribution de l'argent lors d'une exposition orale sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC à forte dose

3.1.1. *Suivi du poids et de la prise alimentaire des animaux*

Pour les animaux ayant été exposés oralement par la boisson au Mesosilver™ ou à l'AgC sur une durée de 28 jours, aucune modification du poids et de la consommation alimentaire n'a été observée (Figure 28A,B). De plus, le suivi de la consommation hydrique nous a permis de nous assurer que la nature de la boisson (Mesosilver™ ou AgC) n'altère pas la prise hydrique (Figure 28C). En considérant la moyenne de la consommation hydrique quotidienne au cours de l'expérimentation, l'exposition moyenne à ces deux produits d'argent colloïdal a été déterminée. Ainsi, avec une consommation moyenne de $3,39 \pm 0,43$ mL/jour et $3,62 \pm 0,45$ mL/jour pour les souris exposées au Mesosilver™ et à l'AgC, respectivement, cela

correspond à une exposition de $3,05 \pm 0,39$ mg/kg p.c./jour pour le Mesosilver™ et $2,45 \pm 0,31$ mg/kg p.c./jour pour l'AgC. La différence de niveau d'exposition entre les deux produits s'explique par leur écart de concentration ($22,1 \mu\text{g/mL}$ et $17,1 \mu\text{g/mL}$ pour le Mesosilver™ et l'AgC, respectivement). Un ajustement des concentrations en diluant le Mesosilver™ dans l'eau de boisson n'a pas pu être réalisé car les AgNP en suspension s'oxydent dès la mise en contact (données non présentées). Les résultats décrits dans la littérature sur l'impact des AgNP à des doses proches de la nôtre sur le poids des animaux sont contrastés. Dans l'étude de Chen et al. (2017), une exposition orale aux AgNP (taille ≈ 10 nm) à une dose de $2,5$ mg/kg p.c./jour pendant 7 jours a induit une diminution progressive du poids chez la souris CD-1 (sous-type de souris Swiss). À l'inverse, dans l'étude de Shahare et al. (2013), une exposition orale aux AgNP-citrate (3-20 nm) à une dose de 5 mg/kg p.c./jour pendant 21 jours a conduit à une augmentation du poids chez la souris Swiss dès 14 jours d'exposition. De nombreux paramètres pourraient expliquer ces différences, en commençant par la lignée de souris utilisée, mais également les propriétés physico-chimiques des AgNP étudiées (taille, présence de revêtement citrate par exemple). De manière intéressante, aucune différence n'a été constatée entre les produits Mesosilver™ et AgC, confirmant l'intérêt d'étudier et de comparer les formes réelles d'argent consommées.

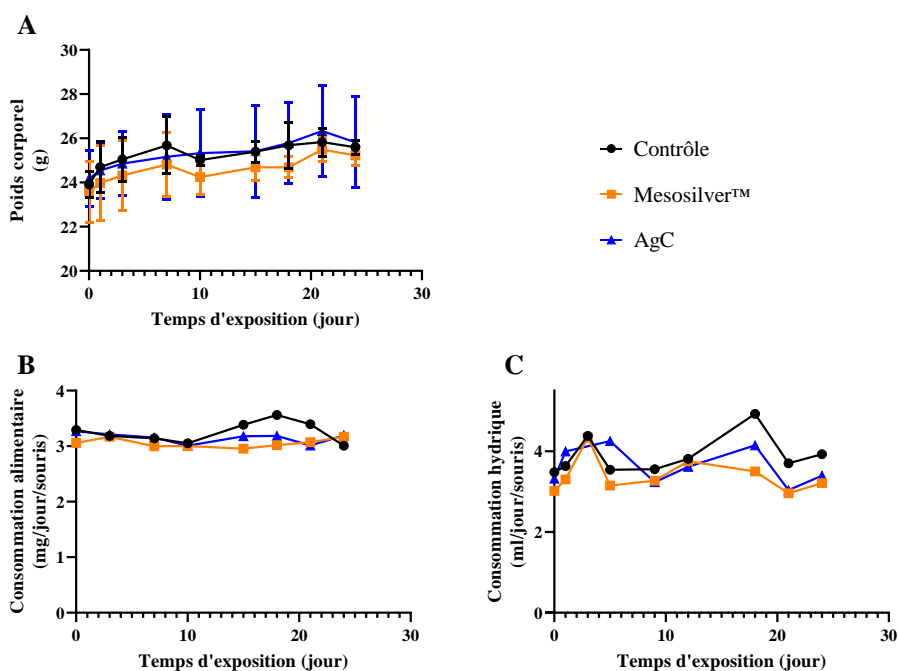


Figure 28 : suivi du poids (A), de la consommation alimentaire (B) et de la prise hydrique (C) des animaux ayant été exposés par la boisson au Mesosilver™, à l'AgC ou à l'eau du robinet (contrôle) sur une durée de 28 jours ; $n=3-4$ animaux par groupe. Pour les panels B et C, l'ensemble des valeurs correspondent à la moyenne de consommation pour une cage hébergeant les animaux, la consommation spécifique de chaque animal ne pouvant être déterminée et ne permettant donc pas une analyse statistique.

3.1.2. Quantification de l'argent dans les tissus, contenus et organes par ICP-MS

La concentration en argent dans les différents tissus, contenus et organes a été mesurée par ICP-MS à la fin des 28 jours d'exposition orale par la boisson au Mesosilver™ ou à l'AgC (Figure 29). Globalement, pour les deux types d'argent colloïdal, les niveaux d'argent sont plus élevés dans les contenus intestinaux que dans les différents organes et tissus analysés. Dans ces mêmes contenus, les concentrations mesurées sont croissantes du jéjunum ($3,69 \pm 2,93$ et $7,68 \pm 2,57$ $\mu\text{g/g}$ de contenu pour le Mesosilver™ et l'AgC, respectivement) vers le côlon ($30,57 \pm 9,20$ et $28,91 \pm 18,49$ $\mu\text{g/g}$ de contenu pour le Mesosilver™ et l'AgC, respectivement). Ce gradient de concentration mesuré pourrait être dû au ralentissement du transit dans les régions les plus distales du tractus digestif. Il souligne également qu'une grande partie de l'argent est excrétée par voie fécale, ce qui corrobore l'ensemble de la littérature existante à ce sujet sur des AgNP modèles (Bergin et al., 2016; Garcia et al., 2016; Loeschner et al., 2011; Tiwari et al., 2017; Yun et al., 2015). Outre les contenus intestinaux, les tissus jéjunal et colique présentent une accumulation d'argent globalement supérieure au reste des organes analysés (entre 0,33 et 1,00 $\mu\text{g/g}$ de tissu en fonction des conditions et du tissu). L'argent a en effet été mesuré en faible concentration dans le foie ($\approx 0,4$ $\mu\text{g/g}$ de tissu), la rate ($\approx 0,2$ - $0,4$ $\mu\text{g/g}$ de tissu), et dans une moindre mesure dans le rein ($< 0,2$ $\mu\text{g/g}$ de tissu).

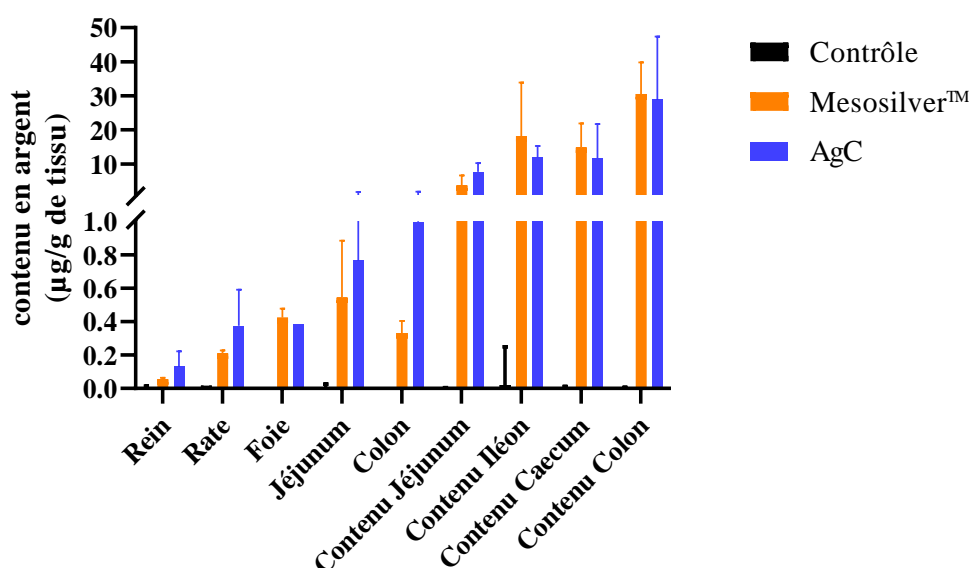


Figure 29 : concentration en argent, déterminée par ICP-MS, dans les organes, tissus et contenus intestinaux des souris exposées 28 jours au Mesosilver™ ou à l'AgC par la boisson ; n=2 animaux par groupe.

Lorsque l'on compare la biodistribution de l'argent dans les différents tissus et contenus après une exposition orale au Mesosilver™ ou à l'AgC, des niveaux similaires sont retrouvés pour les deux produits et il semble que la concentration en argent soit plus élevée pour l'AgC dans le côlon. Pour rappel, l'exposition quotidienne à l'argent chez les animaux ayant consommé l'AgC est plus faible que celle des animaux ayant consommé le Mesosilver™ ($2,45 \pm 0,31$ mg/kg p.c./jour pour l'AgC contre $3,05 \pm 0,39$ mg/kg p.c./jour pour le Mesosilver™). Ceci suggère une bioaccumulation d'argent plus importante provenant du produit AgC comparativement au Mesosilver™. L'AgC étant composé exclusivement d'ions Ag^+ (voir partie 1 des résultats expérimentaux), ces résultats sont en accord avec les observations réalisées sur différentes études chez le rat, montrant une bioaccumulation plus élevée de l'argent sous sa forme ionique comparativement à sa forme nanoparticulaire (Loeschner et al., 2011; Qin et al., 2017). À titre d'exemple, l'étude de Qin et al. (2017) rapporte qu'après une exposition de 28 jours par gavage à 1 mg/kg p.c./jour d'AgNP-PVP (30 nm) vs AgNO_3 (Ag^+), le niveau d'argent mesuré dans le foie, les reins et la rate était nettement supérieur (d'un facteur de 2 à 3) chez les animaux exposés à AgNO_3 comparativement à ceux exposés aux AgNP.

3.1.3. Détermination de la nature de l'argent après digestion du Mesosilver™ par μXRF et μXAS

Les analyses ICP-MS permettent de détecter et de mesurer de faibles concentrations d'argent dans les tissus, contenus et organes mais sans pouvoir déterminer sous quelle forme (Ag^+/Ag^0) l'argent est présent. En effet, une étape de dissolution des matrices en milieu acide est nécessaire pour l'analyse, induisant alors une oxydation totale de l'argent présent. Grâce à l'utilisation de la μXRF , combinée à la μXAS , sur la ligne de lumière LUCIA du Synchrotron SOLEIL, il est possible de cartographier la présence d'argent dans les tissus organiques et de déterminer son degré d'oxydation, ainsi que les interactions avec son environnement proche.

La μXRF ne permettant pas d'analyser de nombreux échantillons en raison du temps nécessaire à l'acquisition et à l'analyse des données, il a été décidé de se focaliser sur le Mesosilver™, du fait de la co-existence des formes Ag^0 (AgNP) et Ag^+ dans le produit initial, et d'examiner le contenu colique, caractérisé par une forte présence d'argent, et le foie en tant qu'organe cible de bioaccumulation (Figure 29), après une exposition par la boisson limitée ici à 7 jours.

Les spectres moyens obtenus en cartographie μXRF permettent de déterminer la composition élémentaire des deux échantillons d'intérêt, comparativement à un échantillon

contrôle de contenu colique (Figure 30A). La signature spectrale du contenu colique après exposition au Mesosilver™ révèle la présence d'argent sous sa forme élémentaire avec l'apparition d'un pic autour de 3 keV qui n'est retrouvé ni dans le foie, ni dans le contenu colique contrôle. Cela est confirmé sur les images de la cartographie μ XRF où aucune signature de l'élément argent n'est retrouvée pour ces deux conditions (Figure 30C et D), contrairement à celle correspondant au contenu colique après exposition au Mesosilver™ (Figure 30B). L'argent ayant été quantifié par ICP-MS dans le foie des animaux exposés (Figure 29), l'absence de détection de l'argent par μ XRF dans cet organe pourrait potentiellement s'expliquer par le temps d'exposition plus faible (7 jours, contre 28 jours pour les analyses ICP-MS), ou par une accumulation hétérogène de l'argent au niveau hépatique, la zone étudiée n'étant peut-être pas représentative de l'ensemble de l'organe.

Dans le cas du contenu colique fortement concentré en argent après exposition au Mesosilver™, la carte de corrélation RVB (Rouge-Vert-Bleu), présentée sur la Figure 30B (et reprise sur la Figure 31A), met en évidence une co-localisation quasi systématique de l'argent avec le soufre, comme indiqué par la coloration violette dominante. Certaines zones discrètes, colorées en rouge, correspondent à une accumulation maximale en argent.

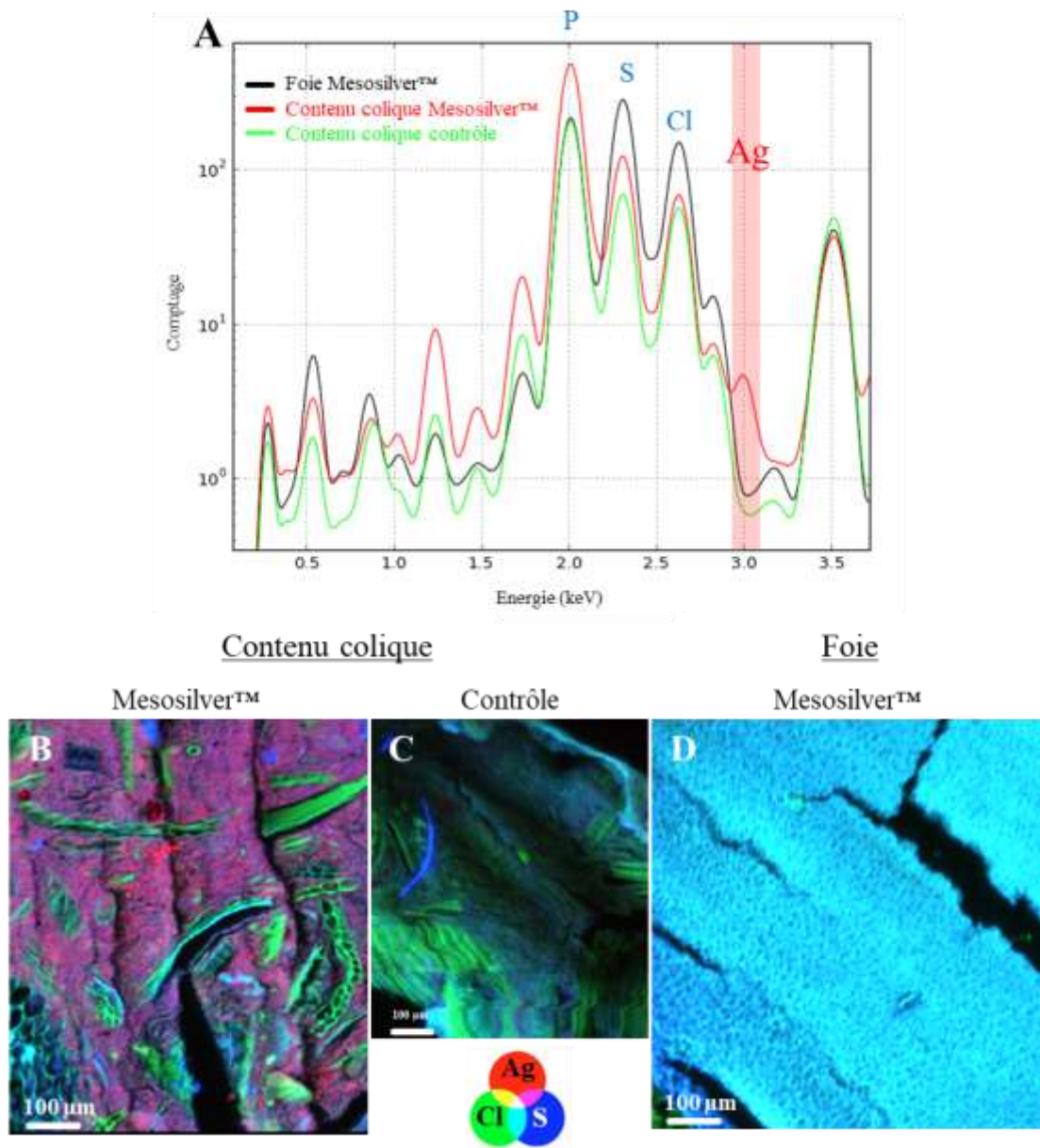


Figure 30 : cartographie du foie et du contenu colique en micro- fluorescence X (μ XRF). (A) Spectres moyens de l'ensemble des spectres cumulés de la cartographie réalisée pour chaque échantillon. La bande rouge correspond à la signature énergétique de l'argent (≈ 3 keV). (B-D) Distribution de l'argent (Ag), du chlore (Cl) et du soufre (S) dans le contenu colique d'un animal exposé au Mesosilver™ (B) ou à l'eau (C), ainsi que dans le foie de l'animal exposé au Mesosilver™ (D). L'intensité des couleurs est identique entre les différents échantillons. L'exposition a été réalisée par la boisson sur une durée de 7 jours avant analyse.

Afin d'identifier la forme (Ag^+/Ag^0) de l'argent dans le contenu colique après exposition au Mesosilver™, différentes zones d'intérêt, représentées par des points (POI, *Point of Interest*), ont été sélectionnées (Figure 31B), correspondant à des zones avec des concentrations variables en argent (Figure 31A). Les spectres XANES associés ont été analysés (Figure 31C). L'ensemble des spectres présentent le même profil avec un seuil à 3351,6 eV. La comparaison avec le spectre XANES du Mesosilver™ pur montre des différences significatives : les trois

oscillations observables pour le Mesosilver™ après le seuil à 3377,5, 3397,6 et 3433,7 eV ne sont pas retrouvées sur les spectres du contenu colique après exposition, indiquant des transformations physico-chimiques du produit *in vivo*. La différence avec les spectres d'argent métallique (Ag^0) et d' AgCl montre que l'argent présent dans le Mesosilver™ (dans sa composante AgNP) ne reste vraisemblablement pas sous sa forme Ag^0 pendant la digestion et que son oxydation en Ag^+ ne se traduit pas forcément par la formation de complexes AgCl . En revanche, les spectres sont proches de celui d' Ag-GSH . Ceci suggère une liaison de l'argent, une fois oxydé dans le tractus digestif, aux groupements thiols (-SH) des protéines et/ou peptides présents dans l'intestin, et plus précisément ici le côlon.

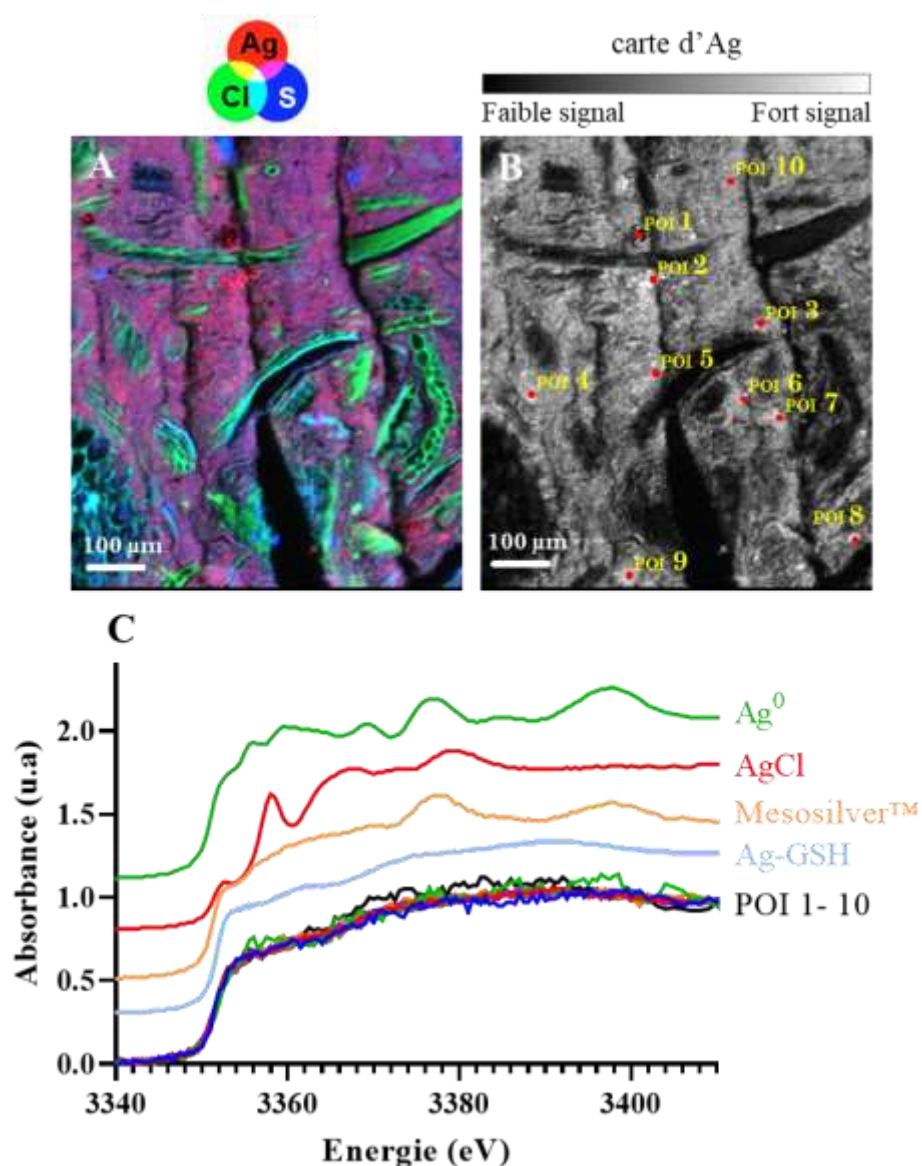


Figure 31 : identification de la forme (Ag^+/Ag^0) de l'argent dans le contenu colique après exposition au Mesosilver™ par analyse XANES. À partir de la cartographie μXRF obtenue sur le contenu colique (A), 10 zones ont été sélectionnées (B), analysées par XANES et comparées avec les références Ag^0 , AgCl , Mesosilver™ et Ag-GSH (C).

Une liaison préférentielle de l'argent avec les groupements thiols a été à plusieurs reprises observée tant à l'échelle tissulaire (Smulders et al., 2015) que cellulaire (Tardillo Suárez et al., 2020; Veronesi et al., 2015), mais c'est la première fois que ce mode d'interaction est mis en évidence au niveau d'un contenu intestinal. L'argent ainsi lié pourrait être moins disponible, ce qui minimiserait son impact délétère sur l'épithélium et/ou le microbiote intestinal, malgré une co-localisation probable bactéries/argent au sein du contenu. Il s'agit également de la première exploration par rayonnement Synchrotron des transformations physico-chimiques subies par un produit commercial d'argent colloïdal à base d'AgNP, ici le Mesosilver™, lors de sa digestion *in vivo*. Les conséquences de la liaison préférentielle de l'argent avec les groupements thiols sont fortement dépendantes de la cible. En effet les protéines, riches en groupements thiols, peuvent être dénaturées par l'interaction avec l'argent (Gordon et al., 2010), avec des effets sur la perte d'activité dans le cas particulier des enzymes. Cependant, une importante quantité de molécules anti-oxydantes riches en groupements thiols, telles que la GSH ou encore les métallothionéines, capables de chélater les ions métalliques et d'inhiber leur potentiel cytotoxique, sont présentes dans les cellules et bactéries (Liu et al., 2017; Wu et al., 2004). Elles peuvent favoriser également l'excrétion de ces ions métalliques des cellules de mammifères (Ballatori et al., 2009). Les capacités anti-oxydantes des cellules eucaryotes ou procaryotes sont donc un élément clé dans la réponse à l'effet cytotoxique de l'argent, un excès d'argent pouvant réduire ces mêmes capacités et conduire à un stress oxydatif délétère pour la cellule. L'étude de Mendonça et al. (2019) met ainsi bien en évidence l'importance des capacités anti-oxydantes dans l'inhibition des effets cytotoxiques des AgNP. Dans leur étude, une injection en intraveineuse de 5 mg/kg p.c. d'AgNP (79,3 nm) chez le rat a induit une hépatotoxicité, pouvant être prévenue par une injection de l'anti-oxydant N-acétylcystéine (1 g/kg p.c.), riche en groupements thiols.

3.2. Mise en évidence par spectroscopie proche infrarouge des modifications organiques induites chez la souris par une exposition orale sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC à faible et forte doses

Etant donné la présence et les transformations physico-chimiques subies par l'argent colloïdal lors de sa digestion *in vivo*, nous avons voulu connaître de manière réciproque son impact, éventuellement différent en fonction du produit considéré (Mesosilver™ ou AgC) et de la dose administrée, sur les organes, tissus et contenus intestinaux par une approche intégrée en

spectroscopie proche infrarouge. Cette analyse a ainsi été réalisée conjointement chez les animaux ayant été exposés 28 jours par la boisson (à la dose précédente de l'ordre de 3 mg/kg p.c./jour) et par gavage (dose plus faible de 0,15 mg/kg p.c./jour) aux deux produits d'intérêt Mesosilver™ et AgC et ce, en condition physiologique (i.e. fonction barrière intestinale intègre).

En nous basant sur la représentation des deux premières composantes principales, nous pouvons observer que les différences entre les spectres proche infrarouge obtenus pour les trois groupes étudiés (contrôle, Mesosilver™ et AgC) sont faibles, tant sur le mode d'exposition par la boisson (Figure 32A) que par gavage (Figure 32B). Cependant, les modèles de prédiction, créés sur les 20 premières composantes principales, présentent de bonnes performances de discrimination pour les deux modes d'administration (Tableau 7 et Tableau 8 pour boisson et gavage, respectivement).

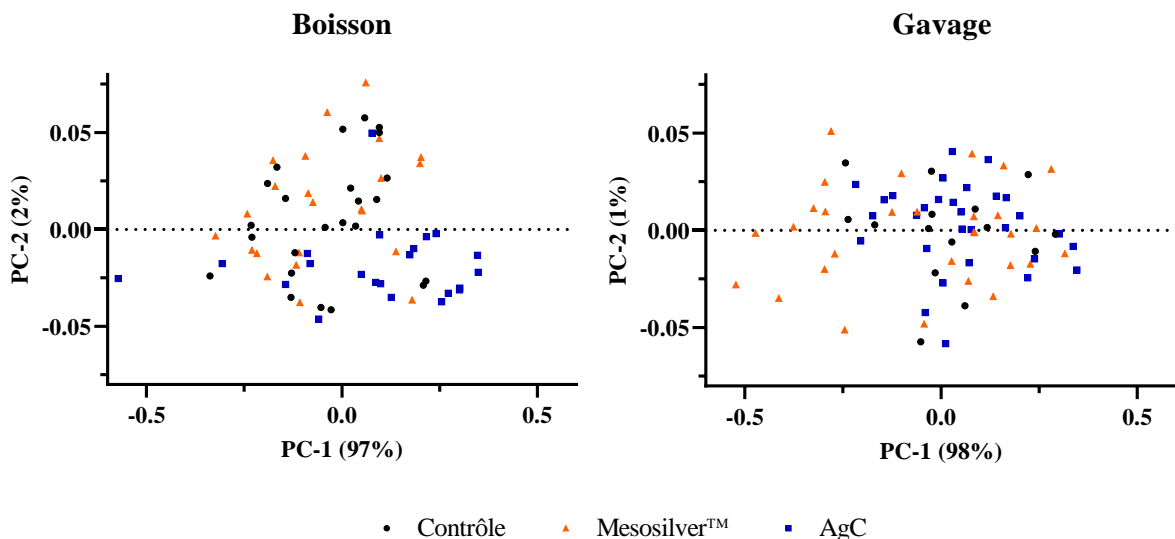


Figure 32 : analyse en composantes principales des spectres obtenus par spectroscopie proche infrarouge sur les animaux contrôles, exposés au Mesosilver™ ou à l'AgC par la boisson (environ 3 mg/kg p.c./jour) (A) ou par gavage (0,15 mg/kg p.c./jour) (B) sur une durée totale de 28 jours.

En effet, sur l'étude d'exposition par la boisson à une dose de l'ordre de 3 mg/kg p.c./jour (Tableau 7), le modèle de prédiction, basé sur un arbre de classification considérant les 20 premières composantes principales, permet d'assigner, avec une bonne performance, les spectres correspondant à la condition contrôle (87 %), Mesosilver™ (87,5 %) ou AgC (77,3 %). Il est à noter que la discrimination des spectres appartenant à la condition AgC est la moins performante, 4 spectres provenant de la condition AgC ayant été attribués à la condition

contrôle. Ces résultats montrent que l'exposition à l'argent colloïdal induit chez la souris et de manière globale des modifications organiques sur l'ensemble des organes (intestin, foie), tissus (jéjunum, iléon, côlon) et contenus (estomac, jéjunum, caecum et côlon) testés et ce, de manière spécifique au produit d'argent colloïdal considéré.

Tableau 7 : matrice de confusion du modèle d'exposition par la boisson sur les 69 spectres totaux correspondants. Les spectres ont été obtenus lors de l'analyse des tissus intestinaux (jéjunum, iléon, côlon), contenus intestinaux (estomac, jéjunum, caecum et côlon) et foie.

Classe réelle	Dénombrement	Contrôle	Classe prévue (test)		% correct
			Mesosilver™	AgC	
Contrôle	23	20	0	3	87,0
Mesosilver™	24	1	21	2	87,5
AgC	22	4	1	17	77,3
Total	69	25	22	22	

Sur l'étude d'exposition par gavage (Tableau 8), pour laquelle la dose administrée est plus faible (0,15 mg/kg p.c./jour), les performances du modèle de prédiction sont globalement moins bonnes, excepté pour les spectres appartenant à la condition contrôle avec 100 % d'assignation correcte. Il est intéressant d'observer que la performance moindre pour les conditions Mesosilver™ (56,7 %) et AgC (70,0 %) est due à une confusion d'assignation des spectres entre ces deux groupes, mais pas à la condition contrôle. En effet, aucune confusion n'est faite entre les spectres appartenant à la condition contrôle et ceux correspondant aux conditions avec argent colloïdal (Mesosilver™ ou AgC). Ces résultats confirment les modifications organiques globales au niveau de l'organisme, liées à l'exposition des souris à l'argent colloïdal et ce, de manière toujours spécifique au produit considéré, même si la dose administrée plus faible ici limite une parfaite discrimination.

Tableau 8 : matrice de confusion du modèle d'exposition par gavage sur les 75 spectres totaux correspondants. Les spectres ont été obtenus lors de l'analyse des tissus intestinaux (jéjunum, iléon, côlon), contenus intestinaux (estomac, jéjunum, caecum et côlon) et foie.

Classe réelle	Dénombrement	Contrôle	Classe prévue (test)		% correct
			Mesosilver™	AgC	
Contrôle	15	15	0	0	100,0
Mesosilver™	30	0	17	13	56,7
AgC	30	0	9	21	70,0
Total	75	15	26	34	

Au cours de cette étude exploratoire par spectroscopie proche infrarouge, réalisée pour la première fois dans le domaine de la toxicologie alimentaire, chaque modèle de prédiction a été capable de discriminer les différentes conditions (Mesosilver™, AgC ou contrôle) pour les deux modes d'exposition (boisson et gavage) avec une bonne performance et ce, malgré le nombre limité d'animaux testés (entre 3 et 5 par groupe) et de spectres collectés exploitables. De plus, la génération d'un modèle d'analyse en validation croisée a été nécessaire, ce type de modèle de prédiction étant généralement considéré comme « optimiste » (Geladi and Davies, 2002). En effet, les données servant au test d'évaluation sont celles qui ont participé à la constitution du modèle. Il est également à noter que les différences spectrales entre les différentes conditions, pouvant être discriminées par le modèle d'analyse le plus approprié, restent limitées au regard de la répartition des spectres selon l'analyse en composantes principales, en considérant les deux principales composantes. Quoiqu'il en soit, l'exposition aux produits d'argent colloïdal par la boisson a donné des résultats particulièrement probants, sûrement du fait de la dose administrée quotidiennement plus forte (20 fois supérieure à celle administrée par gavage). La distinction des conditions Mesosilver™ et AgC témoigne de la spécificité d'action des deux produits, probablement en raison de leur composition différente (le Mesosilver™ majoritairement composé d'AgNP et l'AgC exclusivement ionique). Dans les conditions d'exposition par gavage, le modèle de prédiction discrimine avec une très bonne performance les conditions d'exposition avec l'argent et la condition contrôle, la distinction entre les traitements Mesosilver™ et AgC étant toutefois beaucoup moins aisée.

En conclusion, malgré les limites soulevées précédemment et les développements ultérieurs nécessaires, la spectroscopie proche infrarouge est une technique prometteuse permettant d'avoir une empreinte globale des effets de l'argent colloïdal sur l'organisme. Ceci pourrait à terme être mis à profit sur des fèces par exemple, en tant qu'outil de diagnostic. L'ensemble des résultats traduisent des modifications organiques au niveau du tractus digestif et du foie, liées à l'exposition des souris aux deux produits Mesosilver™ et AgC comparativement à la condition contrôle et ce, de manière différente en fonction du produit considéré. Cela nous a amenés à étudier plus finement les conséquences de cette exposition en nous focalisant sur la dose administrée la plus faible (0,15 mg/kg p.c./jour) et en considérant les trois acteurs de la fonction barrière intestinale (épithélium, mucus et microbiote intestinal), en condition physiologique ou physiopathologique par l'application du stress psychologique chronique WAS.

3.3. Effet d'une exposition orale sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC à faible dose sur la fonction barrière intestinale : rôle du stress psychologique chronique WAS

3.3.1. Suivi du poids et de la prise alimentaire des animaux

Aucune modification du poids et de la prise alimentaire n'a été observée chez les animaux ayant été exposés aux produits d'argent colloïdal et/ou au WAS (Figure 33). Concernant l'argent, nos résultats corroborent les données existantes dans la littérature sur l'effet des AgNP et/ou Ag⁺, ces faibles doses d'exposition (entre 0,1 à 0,2 mg/kg p.c./jour) n'induisant pas de modification du poids ni de la prise alimentaire (Bergin et al., 2016; Skalska et al., 2020; Van den Brule et al., 2016). Concernant le WAS, ces observations diffèrent de celles réalisées par Sun et al. (2013) sur ce même modèle de stress psychologique chronique, les auteurs ayant mesuré une diminution de la prise de poids chez les souris C57BL/6. Il est important de mentionner que, dans le cas de notre étude, la diminution de poids observable pour l'ensemble des groupes en fin de traitement est principalement due à la mesure de la perméabilité intestinale réalisée au 26^{ème} jour (Figure 33A).

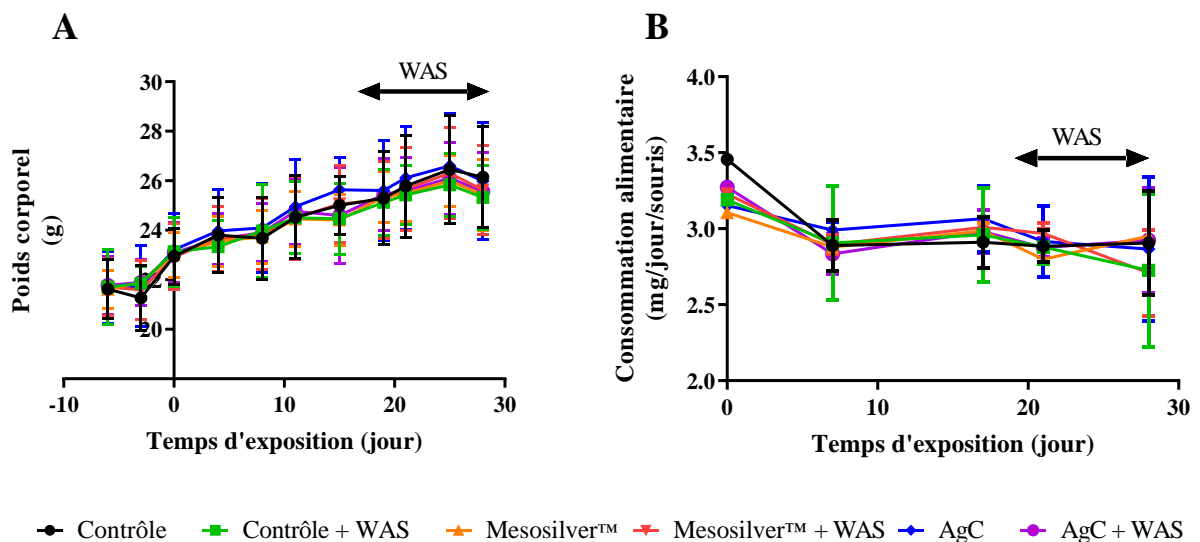


Figure 33 : suivi du poids (A), de la consommation alimentaire (B) des animaux ayant été exposés au Mesosilver™, à l'AgC ou à l'eau du robinet (contrôle) par gavage sur une durée de 28 jours. La période où les souris ont été exposées au WAS est indiquée par une double flèche noire.

3.3.2. Stress et défécation

L'accélération de la motilité intestinale, se caractérisant par une défécation augmentée, est un marqueur d'induction d'un stress très largement utilisé chez l'animal (Bahlouli et al., 2020; Bonaz and Taché, 1994; Bradesi et al., 2005; Lee et al., 2016; Mönnikes et al., 1993). Dans notre étude, nous avons évalué les niveaux de défécation des animaux du groupe contrôle + WAS au cours de la procédure de stress (Figure 34). Ces données ont été comparées au niveau de défécation du groupe contrôle sur une même durée (1 h) en condition d'hébergement standard. Les résultats montrent que les niveaux de défécation au cours du WAS sont significativement augmentés comparativement à ceux du groupe contrôle sur l'ensemble des 10 jours de stress et que les animaux ne deviennent pas « tolérants » à la procédure de WAS malgré sa répétition sur plusieurs jours. Ces données sont intéressantes car il a été montré chez le rat Wistar que l'augmentation de la motilité intestinale induite par le WAS était nettement amoindrie au 10^{ème} jour de la procédure comparativement au 1^{er} jour (Bradesi et al., 2005).

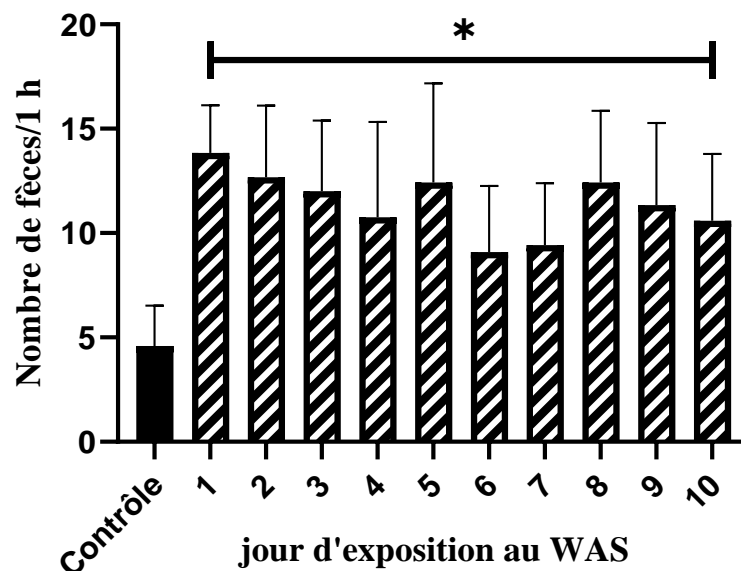


Figure 34 : effet du WAS sur la défécation des animaux. Sur l'ensemble des 10 jours de la procédure, le nombre de fèces excrétées a été comptabilisé pour le groupe contrôle exposé au WAS. La défécation a aussi été mesurée pour le groupe contrôle. n=12 animaux par groupe.

3.3.3. Perméabilité et inflammation intestinale

La perméabilité intestinale, mesurée *in vivo* par le passage du FD4 dans le sang, n'a pas significativement été modifiée après 26 jours d'exposition orale à 0,15 mg/kg p.c./jour de Mesosilver™ ou d'AgC, que ce soit en condition physiologique ou en condition de stress psychologique chronique (WAS). Une tendance à l'augmentation ($p=0,057$) de la perméabilité en condition de stress combiné à une exposition à l'AgC est toutefois observée, tendance qui n'est pas retrouvée avec le Mesosilver™. Pour la perméabilité intestinale en réponse au stress seul, nous pouvons noter une légère tendance à l'augmentation ($p=0,1311$), moindre que celle obtenue par Yvon et al. (2019) dans une étude antérieure réalisée au laboratoire. En ce qui concerne le taux colique de LCN-2 en réponse au stress seul, une tendance à l'augmentation est observée ($p=0,07$) (Figure 35B), là encore plus faible que celle décrite dans les travaux de Yvon et al. (2019). Cependant, une augmentation significative du taux de LCN-2 apparaît dans le groupe exposé à l'AgC, seul ou combiné avec le stress. Dans le cas du Mesosilver™, son exposition seule n'induit pas de modification du taux de LCN-2 mais sa combinaison avec le WAS provoque une augmentation significative de celui-ci. L'ensemble de ces résultats mettent en avant un effet plus important de l'AgC comparativement au Mesosilver™, même si les effets restent modérés. Ainsi l'augmentation significative de LCN-2 n'est manifestement pas suffisante pour être associée à des conséquences physiopathologiques sur l'organisme.

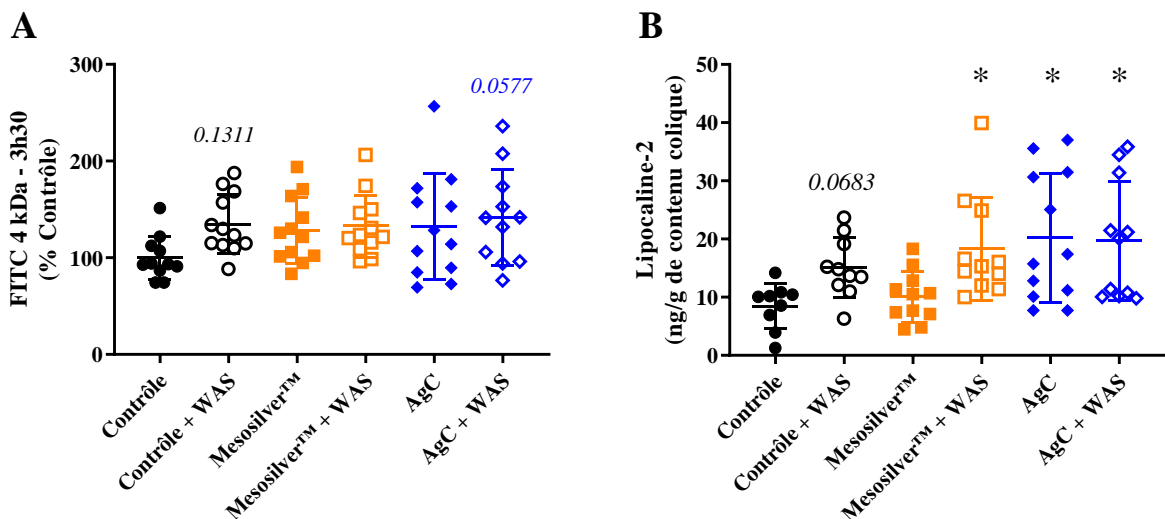


Figure 35 : effets d'une exposition orale sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur la perméabilité intestinale (A) et sur le taux de lipocaline-2 (LCN-2) (B). Les différences significatives ont été évaluées par ANOVA à 1 facteur avec * $p < 0,05$ comparativement au groupe contrôle. $n=12$ animaux par groupe.

3.3.4. Profil d'expression génique de l'épithélium intestinal

L'expression de différents gènes d'intérêt, impliqués dans la réponse inflammatoire de l'épithélium (*Tnfa*, *Il1 β* , *Il6*), la synthèse de mucus (*Muc1*, *Muc2*, *Muc3*, *Muc4*, *Tff3*), ou codant des peptides antimicrobiens (*Lyz*, *Camp*) et des protéines de jonctions cellulaires (*Ocln*, *Zo1*, *Cln1*, *Cln2*, *Cln5*, *JamA*) a été mesurée. De manière globale, les résultats obtenus montrent, dans le jéjunum (Figure 36) et le côlon (Figure 37), l'absence notable de modification de l'expression génique en réponse à l'exposition sub-chronique de 28 jours aux deux produits d'argent colloïdal, Mesosilver™ et AgC, à la dose de 0,15 mg/kg p.c./jour, que ce soit en exposition seule ou combinée avec le WAS. La seule modification significative de l'expression génique est la diminution de l'expression du gène *Lyz* dans le côlon des animaux contrôles ayant été exposés au WAS, comparativement au groupe contrôle (Figure 37). Ceci pourrait engendrer une diminution de la production de lysozyme au niveau de l'épithélium colique et limiter son action dans le contrôle des populations bactériennes (Dupont et al., 2015). Il serait ainsi intéressant d'évaluer, par immunofluorescence (Schaubeck et al., 2016), la production de lysozyme dans cette condition.

En accord avec les données de perméabilité intestinale *in vivo* et de taux colique de LCN-2, l'ensemble de ces résultats confirment le faible impact, dans les conditions d'exposition retenues, des deux produits Mesosilver™ et AgC, seuls ou en combinaison avec le stress, sur l'inflammation intestinale et l'intégrité de la barrière épithéliale au niveau du jéjunum et du côlon. Dans la continuité de cette étude par RT-qPCR, et pour compléter le volet fonctionnel, nous nous sommes intéressés aux propriétés du mucus (épaisseur, O-glycosylation des mucines) et à la composition du microbiote intestinal (composantes bactérienne et fongique).

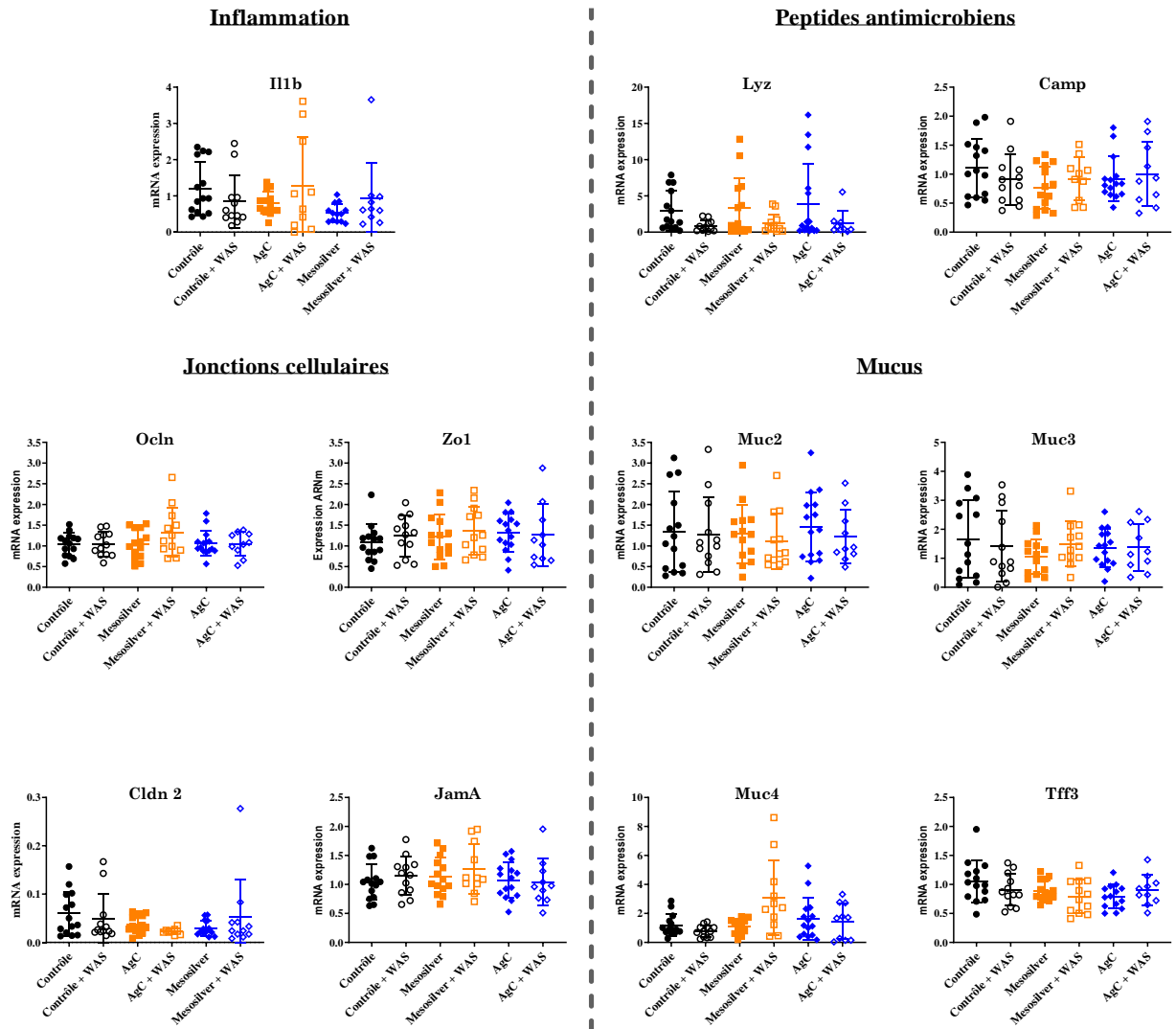


Figure 36 : effet d'une exposition sub-chronique d'une durée de 28 jours à 0,15 mg/kg p.c./jour de Mesosilver™ ou d'AgC sur l'expression d'ARNm dans le jéjunum. Les niveaux d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la production de peptides antimicrobiens, la formation des jonctions serrées et la production de mucus ont été analysés. L'expression des gènes d'intérêt a été normalisée par celle du gène de référence Hprt et exprimée en 2^{44Ct} . Les différences significatives ont été évaluées par ANOVA à 1 facteur. n=12 animaux par groupe.

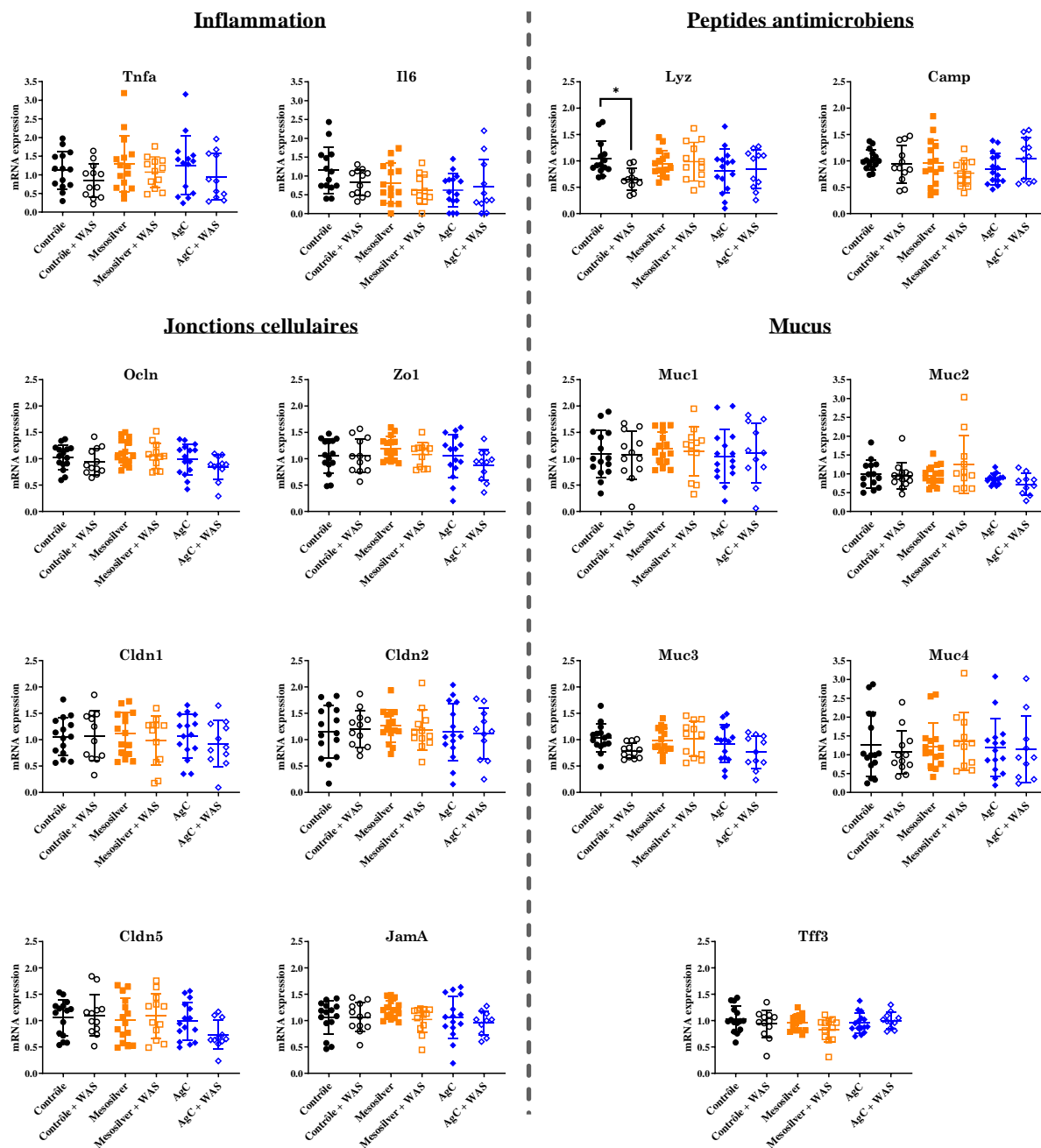


Figure 37 : effet d'une exposition sub-chronique d'une durée de 28 jours à 0,15 mg/kg p.c./jour de Mesosilver™ ou d'AgC sur l'expression d'ARNm dans le côlon. Les niveaux d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la production de peptides antimicrobiens, la formation des jonctions serrées et la production de mucus ont été analysés. L'expression des gènes d'intérêt a été normalisée par celle du gène de référence Hprt et exprimée en $2^{\Delta\Delta Ct}$. Les différences significatives ont été évaluées par ANOVA à 1 facteur (* $p < 0,05$). $n=12$ animaux par groupe.

3.3.5. Propriétés du mucus

a) Epaisseur du mucus dans le côlon distal

Dans le prolongement des travaux du laboratoire sur la caractérisation du mucus colique (Kamphuis et al., 2017), nous avons adapté et optimisé la méthode permettant, à partir de coupes de côlon avec contenu en coloration H&E et Bleu Alcian (Figure 38A), d'accéder à l'épaisseur moyenne, ainsi qu'à la variabilité de cette épaisseur, de la couche de mucus « fécale ». Cette dernière joue un rôle important dans le maintien d'une barrière protectrice vis-à-vis des cellules épithéliales en confinant le microbiote intestinal (Figure 38). Une modification des deux paramètres, épaisseur moyenne et variabilité de cette épaisseur, pourrait indiquer une perturbation de la fonction barrière du mucus, induite par le traitement à l'argent colloïdal et/ou le stress. Or ceci n'a pas été observé dans notre étude, quelle que soit la condition considérée (Figure 38B et C). Concernant l'effet du WAS, l'étude de Aguilera et al. (2013) a montré qu'un WAS de 7 jours consécutifs provoque une diminution de moitié de l'épaisseur de mucus chez une lignée de souris identique à la nôtre (C57BL/6N), passant de $23,01 \pm 1,89 \mu\text{m}$ chez les animaux contrôles à $11,87 \pm 0,32 \mu\text{m}$ chez les animaux stressés. Il est intéressant de noter que, dans notre étude, les animaux en condition contrôle présentent une épaisseur moyenne de $11,72 \pm 1,19 \mu\text{m}$, valeur comparable à celle observée pour les animaux stressés dans l'étude de Aguilera et al. (2013). Les disparités entre cette étude et la nôtre pourraient notamment s'expliquer par des différences dans la méthode d'analyse, jusqu'alors limitée à des observations de quelques zones d'intérêt et non, comme dans notre cas, systématisée sur l'ensemble du pourtour du contenu colique.

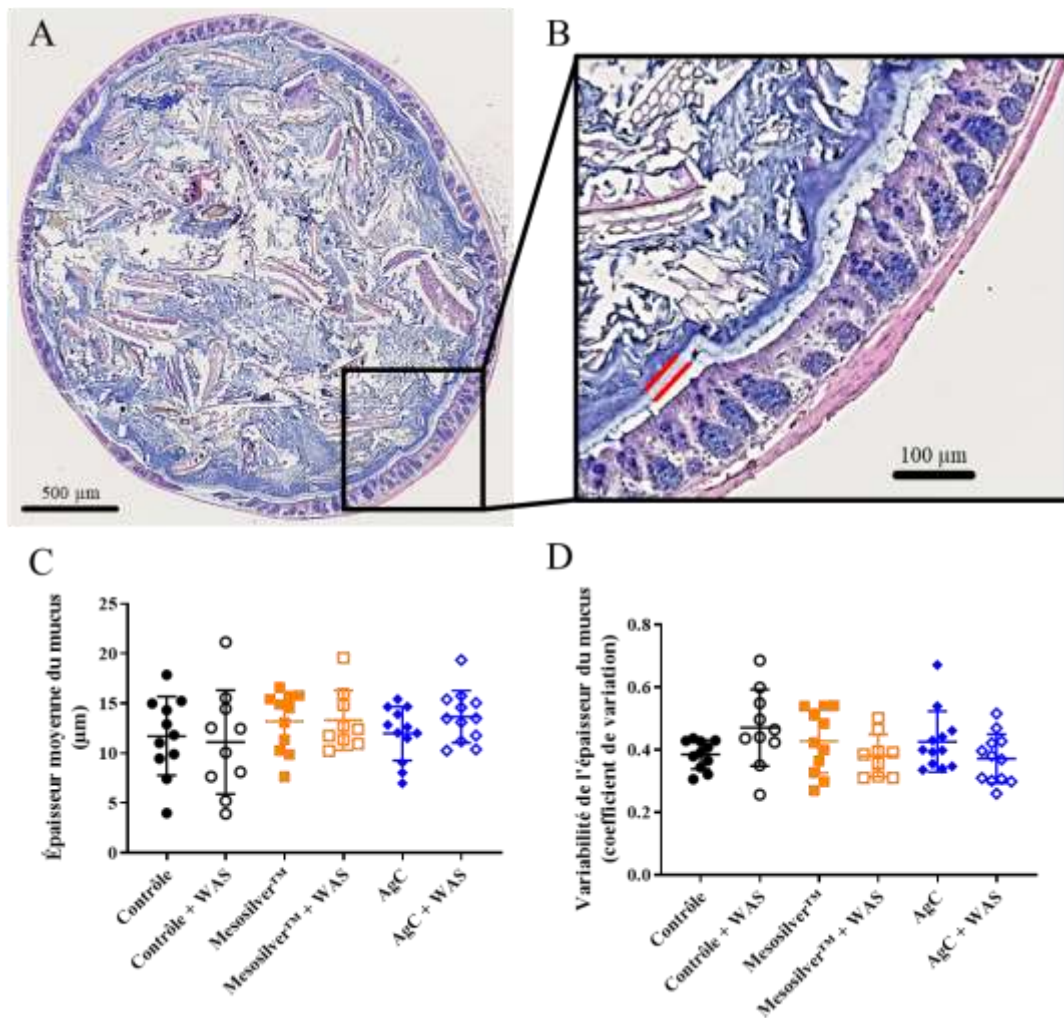


Figure 38 : effets d'une exposition sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur le mucus. Après coloration H&E et Bleu Alcian sur coupe transversale de côlon avec contenu (A), la couche de mucus fécale a été mesurée (B) et l'épaisseur moyenne de cette couche (C) ainsi que la variabilité de celle-ci (D) ont été déterminées. Les deux traits rouges (B) indiquent la couche analysée tout le tour du contenu. n=12 animaux par groupe.

b) O-glycobiome du mucus

La nature des O-glycanes composant les mucines, ainsi que leurs modifications en fonction du traitement à l'argent colloïdal et/ou du WAS, ont été déterminées en s'intéressant à la variation des fractions neutres, sulfatées et sialylées et ce, à la fois pour le jéjunum et le côlon. Le profil diffère pour les deux régions considérées, mais il est également partiellement modulé en réponse au stress et aux deux produits d'argent colloïdal (Figure 39A,B). Globalement, les structures sulfatées sont peu représentées dans le jéjunum et le côlon. Les structures sialylées sont majoritaires dans le jéjunum, représentant environ 60% de la proportion

totale (Figure 39A), cette proportion étant largement diminuée dans le côlon au profit des structures neutres (80 % de la proportion totale, Figure 39B).

Peu d'informations sont disponibles dans la littérature chez le rongeur sur les profils de O-glycosylation des mucines en fonction des régions du tractus digestif, cependant ces profils peuvent fortement changer en fonction de l'espèce/lignée considérée mais également de l'environnement de l'expérimentation. Pour exemple, deux études réalisées sur des rats Wistar diffèrent en termes de profils de glycosylation des mucines pour une même région analysée, le côlon distal. Ainsi, l'étude de Talbot et al. (2018) présente un taux comparable de structures sialylées et neutres (45-50 %), avec une faible proportion de structures sulfatées (5 %). L'étude de Da Silva et al. (2014) montre, à l'inverse, une proportion importante de structures sulfatées (40-45 %) et neutres (35-40 %), la proportion de structure sialylées étant relativement faible (15 %).

En considérant l'effet du WAS, celui-ci induit une augmentation significative des structures neutres dans le jéjunum, associée à une diminution des structures sulfatées (Figure 39A). À l'inverse, la proportion des structures neutres est significativement diminuée dans le côlon des animaux ayant été soumis au WAS, une tendance pouvant être observée à l'augmentation des structures sulfatées (Figure 39B). De plus, une augmentation de la proportion de O-glycanes à longue chaîne (masse > 1000 Da) peut être observée dans le côlon (Figure 39D), mais non dans le jéjunum (Figure 39C).

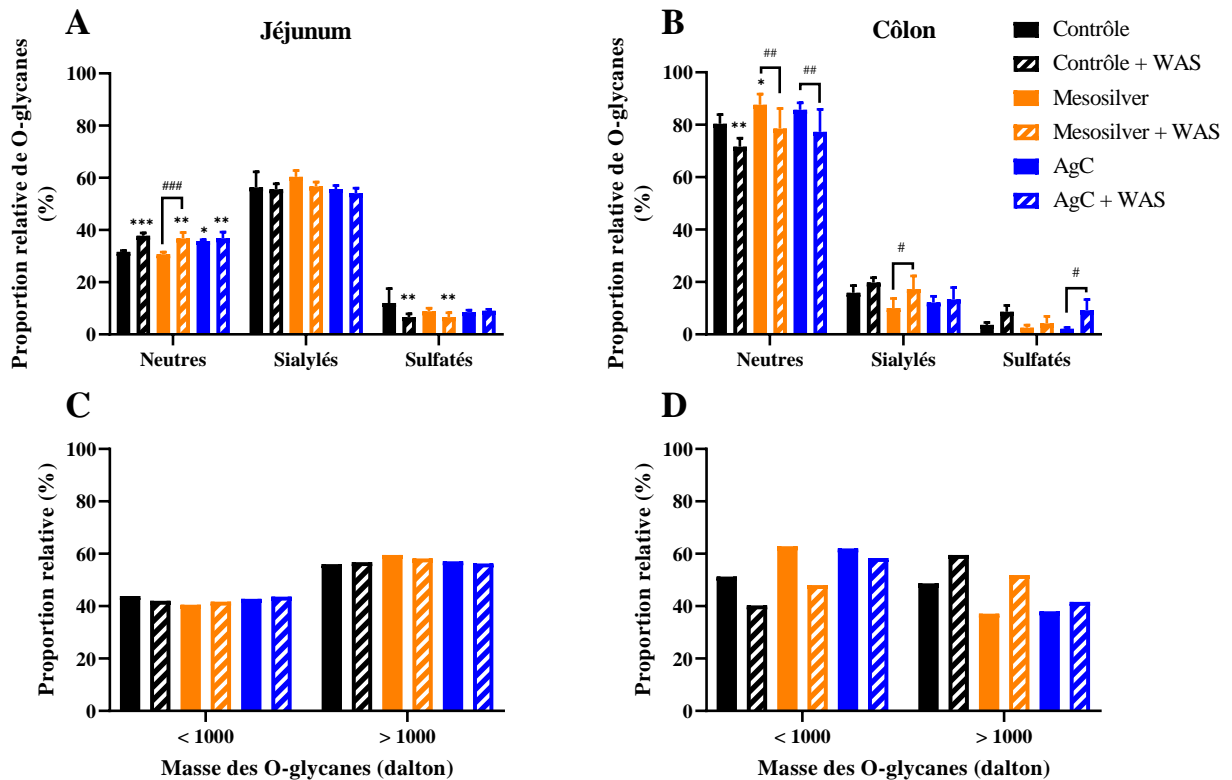


Figure 39 : effets d'une exposition sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur la O-glycosylation des mucines dans le jéjunum (A,C) et le côlon (B,D). La proportion relative des O-glycannes en fonction de leur nature chimique (A,B) et de leur masse (C,D) est présentée. n=6 animaux par groupe. Pour les panels A et B, les différences significatives comparativement à la condition contrôle ou à la condition argent colloïdal seul sont indiquées avec des astérisques (*, # p < 0,05 ; **, ## p < 0,01 ; ***,### p < 0,001). Pour les panels C et D, l'ensemble des valeurs pour chaque condition ont été agrégées, ne permettant pas d'analyses statistiques.

La seule étude ayant évalué l'effet du stress psychologique chronique WAS a été réalisée au laboratoire par Da Silva et al. (2014) chez le rat. Les auteurs n'ont pas observé chez les rats stressés de modifications de la proportion de O-glycannes neutres, sialylés ou sulfatés, mais ils ont mis en évidence une élongation des chaînes de O-glycannes dans le côlon (ainsi que dans l'iléon), comparable aux observations effectuées dans notre étude sur la même région intestinale (Figure 40). Cette modification de la structure des O-glycannes ayant été liée à une perte des propriétés cohésives du mucus chez le rat (Da Silva et al., 2014), il serait intéressant d'évaluer dans notre modèle murin l'impact de ces changements de O-glycosylation des mucines sur la fonctionnalité du mucus en termes de protection.

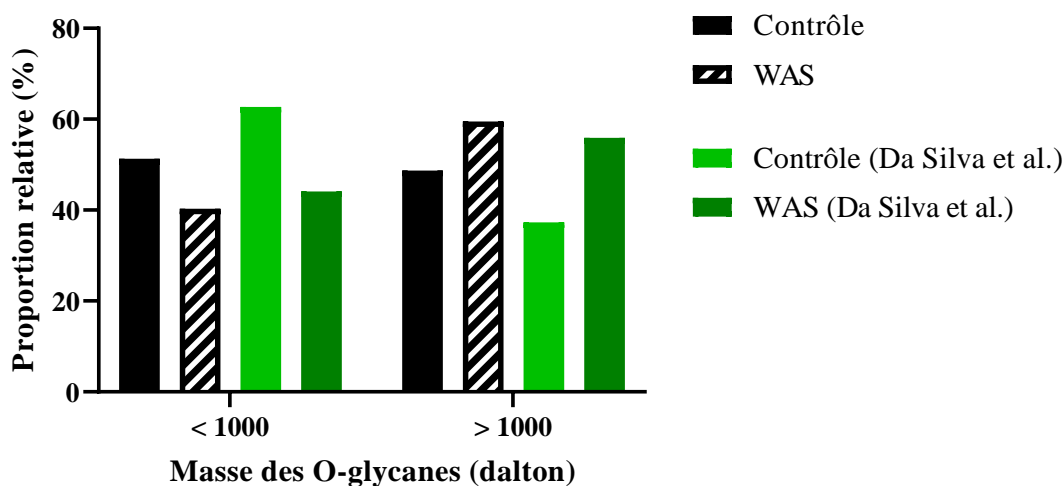


Figure 40 : comparaison des effets du WAS entre notre étude et celle de Da Silva et al. (2014) sur la proportion des O-glycanes classés en fonction de leur masse (inférieure ou supérieure à 1000 Da).

En considérant les effets du Mesosilver™ et de l'AgC, les profils de O-glycosylation des mucines divergent en certains points. Dans le jéjunum, l'AgC seul induit une augmentation de la proportion des structures neutres par rapport aux conditions contrôles (Figure 39A), tandis que cet effet est observé dans le côlon uniquement pour les animaux ayant été exposés au Mesosilver™ seul (Figure 39B). À l'inverse du WAS, les animaux exposés au Mesosilver™ ou à l'AgC seul présentent une proportion de O-glycanes à longue chaîne moins importante que les animaux contrôles. Aucun effet additif entre les stress chimique (argent colloïdal) et psychologique (WAS) n'a été observé. Il peut être noté que dans le côlon nous retrouvons l'effet du WAS sur la diminution de la proportion des structures neutres pour les animaux exposés à l'argent colloïdal (Mesosilver™ ou AgC) (Figure 39B). Dans le cas du Mesosilver™ uniquement, nous retrouvons également l'effet du WAS sur l'augmentation de la proportion de O-glycanes à longue chaîne (masse > 1000 Da) (Figure 39D).

La seule étude ayant évalué *in vivo* l'effet des AgNP sur les propriétés du mucus a été réalisée par Jeong et al. (2010) chez des rats, mâles et femelles, exposés par voie orale à des AgNP modèles (60 nm) à une dose de 30, 300 ou 1000 mg/kg p.c./jour pendant 28 jours en condition physiologique. Aucune altération de la production de mucus n'a été observée dans le côlon mais une modification de la nature des mucines au niveau glycanique a été mise en évidence. Par différentes colorations histologiques, les auteurs ont ainsi démontré une diminution des mucines neutres et acides, et parmi ces dernières, la proportion des mucines sulfatées a diminué, tandis que celle des mucines sialylées a augmenté.

Les modifications du profil de O-glycosylation des mucines, observées ici de manière différentielle en fonction du stress et/ou du produit d'argent colloïdal considéré, pourraient avoir un impact sur les caractéristiques du microbiote intestinal, ou à l'inverse être une conséquence d'une modification du microbiote pour lequel les O-glycanes des mucines sont une importante source d'énergie (Bäckhed et al., 2005; Gillois et al., 2018; Kaoutari et al., 2013; Sonnenburg et al., 2005). C'est la raison pour laquelle nous nous sommes ensuite intéressés à la composition du microbiote fécal (à la fois bactérien et fongique) et son évolution en réponse au stress WAS et/ou au traitement aux deux produits d'argent colloïdal, le Mesosilver™ et l'AgC.

3.3.6. Composition des microbiotes bactérien et fongique

L'abondance des principaux phyla bactériens et fongiques n'est pas modifiée en réponse à l'exposition au Mesosilver™ ou à l'AgC (Figure 41A ; Figure 42A), seul ou combiné avec le WAS. Il en est de même pour la diversité alpha (Figure 41B ; Figure 42B), qui représente la diversité des espèces dans un même échantillon, ainsi que la diversité bêta (Figure 41C ; Figure 42C), qui permet de comparer les différents échantillons entre eux.

Il peut être observé toutefois que l'abondance de certaines familles et certains genres bactériens est modulée en réponse à l'exposition au Mesosilver™ ou à l'AgC, seul ou combiné avec le WAS (Figure 41D et E). Concernant l'effet du WAS seul, l'analyse n'a pas révélé de changements significatifs. Il a toutefois été montré dans la littérature que le stress WAS chez la souris C57BL/6 provoque une dysbiose du microbiote bactérien fécal après 10 jours de stress, se caractérisant par une forte augmentation du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* ainsi que des *γ-Proteobacteria* (Sun et al., 2013). Les auteurs ont montré également que cette dysbiose est source, en partie, de l'hyperperméabilité intestinale et de l'inflammation intestinale induite par le WAS. En ce qui concerne l'effet du traitement à l'argent colloïdal seul, nous pouvons noter une signature bactérienne différente entre les animaux exposés au Mesosilver™ ou l'AgC. D'une part, une diminution de la famille *Ruminococcaceae* (comprenant *Ruminococcus*) et une augmentation des genres *Intestinimonas* et *Lachnospiraceae A2* sont observées pour le Mesosilver™. D'autre part, une augmentation de la famille *Anaerovoracaceae* et du genre *Tyzzerella* apparaît pour l'AgC. Concernant les genres bactériens affectés, leur abondance est globalement très faible, excepté pour *Ruminococcus* qui comprend les bactéries mucolytiques *R. gnavus* et *R. torques* (Croft et al., 2013; Png et al., 2010). *R. gnavus* est dotée d'une adhésine (*carbohydrate-binding module CMB40*) lui permettant de se lier aux acides sialiques (Owen et

al., 2017) des chaînes de O-glycanes, ainsi que d'équipements enzymatiques tels que l' α -L-fucosidase qui est une hydrolase permettant la formation de L-fucose à partir d' α -L-fucoside pouvant être utilisé comme source de substrat par la bactérie (Wu et al., 2020). De plus, l'étude de Graziani et al. (2016) a montré que la souche *R. gnavus* E1 induit une augmentation de l'expression des gènes des mucines chez la souris et dans les cellules HT29-MTX et module également le profil de glycosylation des mucines en induisant une augmentation de l'expression des gènes de glycosyltransférases. Les auteurs ont suggéré que cette espèce bactérienne pourrait être bénéfique pour l'individu, bien que l'augmentation de *R. gnavus* ait été rapportée chez les patients MICI (Hall et al., 2017; Nishino et al., 2018).

Du point de vue du microbiote bactérien, en considérant la littérature existante sur les expositions sub-chroniques à des AgNP modèles chez le rongeur, les études fournissent des résultats contrastés, en raison des différences de caractéristiques et doses des AgNP, d'espèce (rat/souris), de durée de traitement, de région intestinale considérée et de méthode d'analyse. Les études de Hadrup et al. (2012) et de Wilding et al. (2016), menées chez le rat et la souris, respectivement, n'ont pas mis en évidence de modifications du microbiote bactérien cœcal après 28 jours d'exposition orale aux AgNP (de taille comprise entre 10 et 20 nm) à une dose de 9 et 10 mg/kg p.c./jour, respectivement. À l'inverse, les études de Chen et al. (2017) et de Van den Brule et al. (2016) ont révélé l'apparition d'une dysbiose du microbiote intestinal bactérien en réponse à une exposition orale aux AgNP. D'une part, Chen et al. (2017) ont montré une modification du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* au profit des *Bacteroidetes*, avec une diminution des lactobacilles, dans le microbiote fécal de souris exposées oralement à des AgNP de 12 nm à une dose de 2,5 mg/kg p.c./jour pendant 7 jours ; d'autre part, Van den Brule et al. (2016) rapportent une augmentation du phylum des *Firmicutes* comparativement à celui des *Bacteroidetes* dans le microbiote fécal de souris C57BL/6 femelles lors d'une exposition à des AgNP-PVP incorporées dans l'aliment pendant 28 jours, pour une dose estimée de 0,01 mg/kg p.c./jour, 0,11 mg/kg p.c./jour et 1,1 mg/kg p.c./jour. Pour la dose de 0,11 mg/kg p.c./jour, la plus proche des conditions de notre étude, des modifications de l'abondance relative de certains genres bactériens ont été observées. Ainsi, une augmentation significative de la proportion des genres *Coprococcus* et *Lactobacillus*, non retrouvée dans notre étude, a été mise en évidence. En outre, dans leur étude, contrairement à nos résultats, l'abondance du genre *Ruminococcus* n'a pas été modifiée. Ces différences avec l'étude de Van den Brule et al. (2016) peuvent s'expliquer, outre le sexe des animaux, par la source d'apport de l'argent, les AgNP-PVP ayant

été incorporées dans l'aliment, ce qui peut influencer leurs transformations physico-chimiques lors de la digestion *in vivo*.

A notre connaissance, aucune étude de la littérature n'a à ce jour évalué l'impact de contaminants/additifs alimentaires sur la composition du microbiote fongique. Malgré l'absence d'effets probants, nos travaux fournissent, pour la première fois, des informations sur l'impact de l'argent colloïdal, mais également d'un stress psychologique chronique, sur cet acteur microbien aujourd'hui reconnu comme jouant un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale. En effet, une altération du microbiote fongique est associée au développement de pathologies intestinales et métaboliques (Chin et al., 2020; Huseyin et al., 2017).

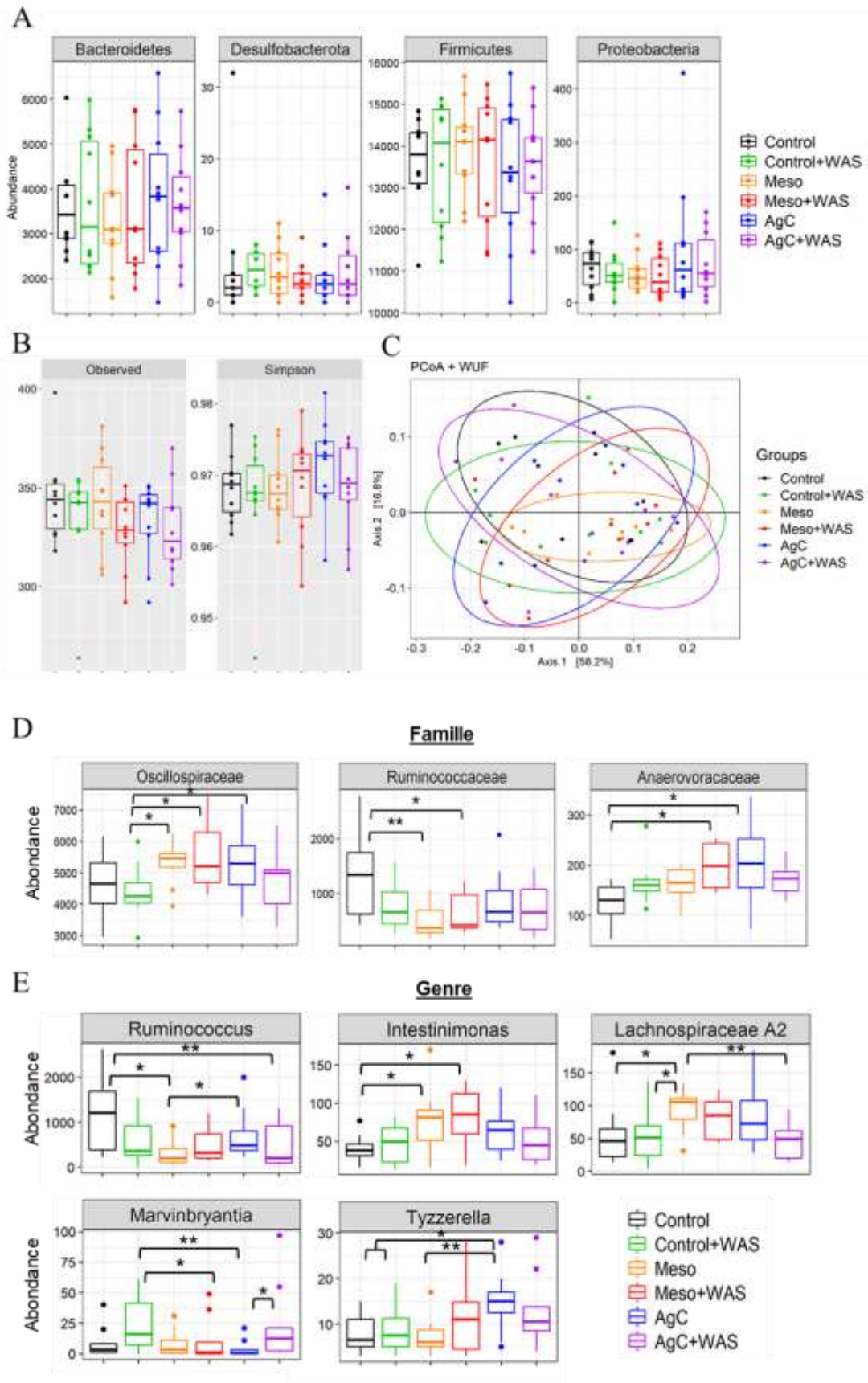


Figure 41 : effets d'une exposition sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur le microbiote bactérien fécal. Abondance des principaux phyla (A), α -diversité (B) et β -diversité (C) du microbiote bactérien. (D,E) Abondance des familles (D) et genres (E) bactériens.

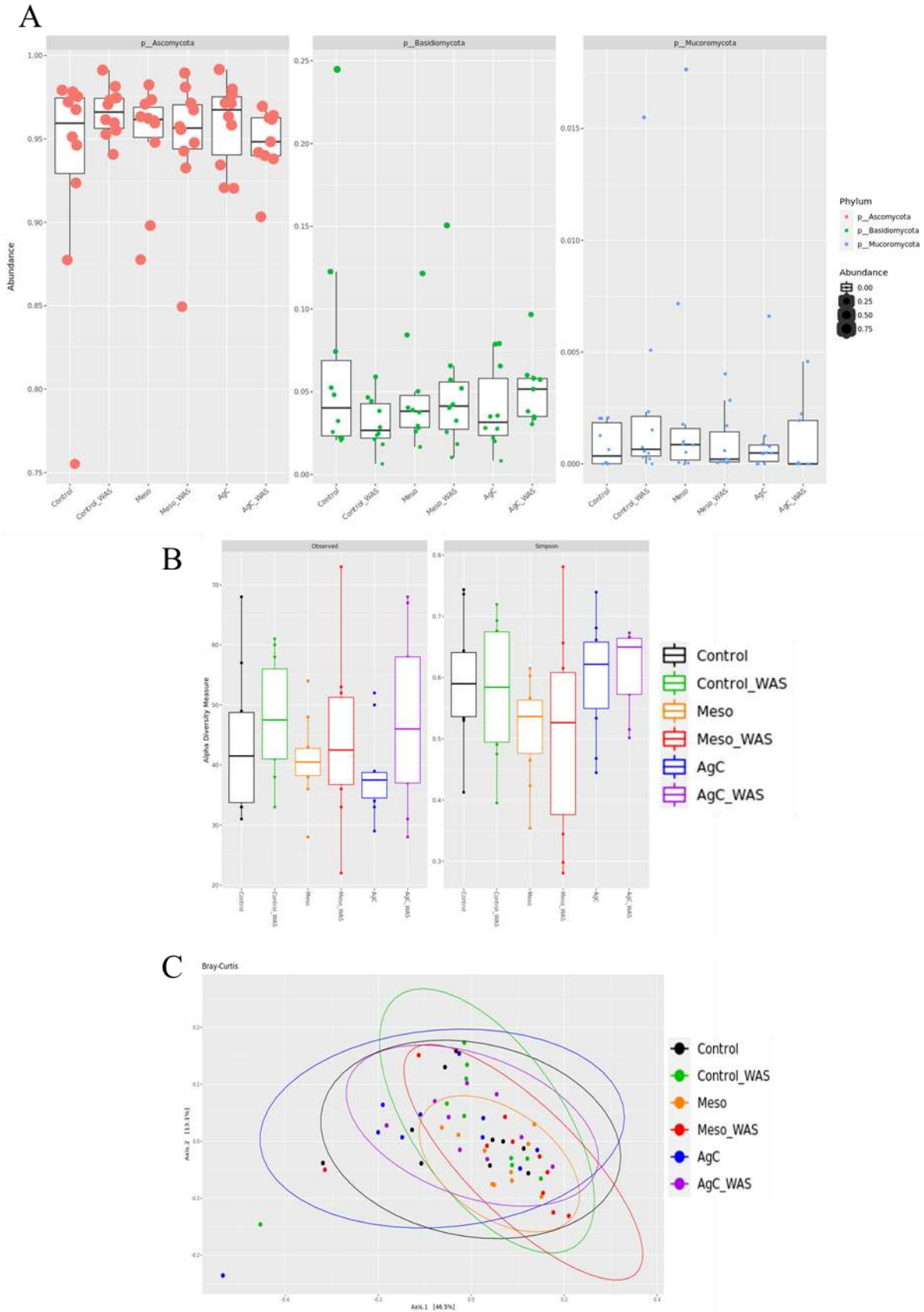


Figure 42 : effets d'une exposition sub-chronique au Mesosilver™ ou à l'AgC en absence ou en combinaison d'un stress WAS sur le microbiote fongique fécal. Abondance relative des principaux phyla (A), α -diversité (B) et β -diversité (C) du microbiote fongique.

4. Conclusion

Cette étude est la première ayant évalué l'impact sur la fonction barrière intestinale de l'argent directement ingéré par le consommateur sous la forme d'argent colloïdal, en comparant deux produits commerciaux de composition différente (AgNP avec le Mesosilver™ et argent ionique avec l'AgC) dans des conditions d'exposition réalistes (i.e. exposition sub-chronique à faible dose). Cette étude est également la première à avoir considéré de manière intégrée l'ensemble des acteurs de la fonction barrière de l'intestin sur son versant luminal, correspondant au triptyque épithélium/mucus/microbiote, avec pour ce dernier un focus à la fois sur ses composantes bactérienne et fongique. L'importance de considérer l'ensemble de ces acteurs en nanotoxicologie alimentaire, et en particulier l'interrelation entre le microbiote et le mucus, a d'ailleurs été soulignée par l'EFSA dans son rapport sur l'évaluation des risques associés à l'exposition humaine aux nanoparticules utilisées dans le secteur agroalimentaire (Hardy et al., 2018). Cette étude montre que l'exposition orale sub-chronique de 28 jours aux deux produits à une dose de 0,15 mg/kg p.c./jour n'induit pas d'effets délétères majeurs sur la fonction barrière intestinale. De légères perturbations ont pu toutefois être observées sur le profil de O-glycosylation des mucines, le marqueur d'inflammation intestinale LCN-2 et le microbiote bactérien fécal, soulignant l'importance d'évaluer les effets de ces produits à plus long terme, du fait de la chronicité d'exposition des consommateurs réguliers d'argent colloïdal. Enfin, nous avons souhaité évaluer l'impact du Mesosilver™ et de l'AgC sur une fonction barrière intestinale fragilisée en appliquant un stress psychologique chronique WAS. Dans nos conditions expérimentales, l'impact limité du stress sur les paramètres de la fonction barrière étudiés n'a pas permis de révéler de réels effets de potentialisation ou d'exacerbation, hormis dans quelques cas précis, comme le taux de LCN-2 pour le Mesosilver™ ou la perméabilité intestinale *in vivo* pour l'AgC. Cependant notre démarche expérimentale rappelle l'importance de considérer une fonction barrière intestinale fragilisée, notamment en mettant au point des modèles pertinents sur des durées d'exposition longues, pour les études futures de l'exposome dans le domaine de la toxicologie alimentaire. Un autre point fort de notre étude a été de contribuer à des innovations technologiques et méthodologiques pour évaluer les transformations physico-chimiques de l'argent colloïdal au cours de la digestion *in vivo* en rayonnement Synchrotron sur la ligne de lumière LUCIA et réciproquement caractériser les modifications induites globalement par l'argent sur l'organisme grâce à l'apport de la spectroscopie proche infrarouge.

Discussion générale

Ce projet de thèse, ayant bénéficié d'un co-financement INRAE/Région Occitanie, et prenant part au projet inter-départements INRAE AlimH/TRANSFORM/MICA « Exposition orale à l'argent des additifs et compléments alimentaires : transformations physico-chimiques et conséquences sur le mucus dans son dialogue avec le microbiote intestinal en condition de stress chronique (NanoStress) », a apporté pour la première fois un éclairage sur les dangers associés à une consommation orale d'argent sous la forme d'argent colloïdal sur la sphère intestinale. Ce dernier regroupe un large ensemble de produits pouvant être ingérés par l'Homme. Accessibles dans le commerce pour leurs supposées vertus pour la santé, et notamment pour le « bien être intestinal », ces produits contiennent des nanoparticules d'argent (AgNP) et/ou des ions argent (Ag⁺) aux propriétés antimicrobiennes reconnues (Medici et al., 2019), même si la caractérisation physico-chimique reste à ce jour limitée. Différentes études détaillées en partie introductive de ce manuscrit mettent en lumière les effets délétères liés à une exposition orale aux AgNP (et/ou Ag⁺), en considérant le plus souvent des particules modèles peu représentatives des formes ingérées. L'ingestion des produits d'argent colloïdal, pouvant être chronique, nécessite une évaluation des dangers associés pour la santé du consommateur (ANSES, 2015; EFSA, 2016; Younes et al., 2018). Ainsi, en 2015, l'ANSES a rappelé, sur la base de rapports précédents, que les données disponibles sur l'exposition aux AgNP étaient insuffisantes pour permettre une évaluation des risques sanitaires (ANSES, 2015), avis également partagé par l'EFSA dans le cadre de la réévaluation de l'argent en tant qu'additif alimentaire E174 (EFSA, 2016).

Sur la base de la littérature et des différentes conclusions et recommandations effectuées par l'ANSES et l'EFSA, nous nous sommes intéressés à deux produits commerciaux d'argent colloïdal, Mesosilver™ et AgC, de leur caractérisation physico-chimique à leur devenir et toxicité intestinale sur des modèles à la fois *in vitro* et *in vivo* chez le rongeur lors d'une exposition répétée. Nous avons ainsi considéré les aspects, identifiés comme prioritaires, suivants :

- a) L'utilisation de produits d'argent colloïdal commercialisés et représentatifs de l'exposition humaine ;
- b) Le besoin de recourir à une grande diversité de méthodes de caractérisation physico-chimique sur les produits natifs, mais également dans les milieux et tissus biologiques en contact avec les produits étudiés ;
- c) L'utilisation de modèles cellulaires et animaux, avec des stratégies d'exposition pertinentes, liées à la consommation journalière de ces produits. Notre objectif était de

fournir des connaissances précises sur le devenir, la biodisponibilité et les effets de ces produits sur les acteurs de la fonction barrière intestinale (épithélium, mucus et microbiote) et leurs interactions.

- d) L'utilisation de modèles pertinents de fragilisation de la fonction barrière intestinale. Notre objectif était d'évaluer les effets d'une exposition à ces produits sur une population « sensibilisée » par un stress psychologique chronique.

Pour chacun de ces points, nous allons détailler les principaux résultats obtenus en les replaçant dans le contexte bibliographique et aborder les perspectives à donner à ce travail.

- a) L'utilisation de produits d'argent colloïdal commercialisés et représentatifs de l'exposition humaine

Une grande diversité de produits d'argent colloïdal sont disponibles dans le commerce, en France ou à l'étranger, et leur composition est tout autant diversifiée d'un point de vue à la fois qualitatif et quantitatif. En effet, d'importantes disparités existent concernant la concentration en argent, la forme d'argent présente (AgNP et/ou Ag⁺), la taille des AgNP et la présence d'autres composés ou adjuvants (Cascio et al., 2015; De Leersnyder et al., 2020; Hagendorfer et al., 2012; Radwan et al., 2019; Reed et al., 2014; Rogers et al., 2018; Rong et al., 2018). Cependant, deux grandes catégories peuvent être distinguées : les produits contenant majoritairement des AgNP et ceux contenant majoritairement des ions Ag⁺. Face à la grande diversité de produits disponibles, nous avons fait le choix initial de sélectionner le Mesosilver™ et l'AgC sur la base de différents critères. Le Mesosilver™ est l'argent colloïdal le mieux caractérisé à ce jour ; composé en majorité d'AgNP, il est librement vendu aux États-Unis où sa consommation en tant que complément alimentaire est autorisée, et facilement accessible dans les autres pays sur les plateformes de e-commerce. Ce choix entre également dans le cadre de la collaboration avec l'équipe de Paul Westerhoff à l'*Arizona State University* aux États-Unis. L'AgC est un produit d'argent colloïdal vendu en France (laboratoire Bio Colloïdal) et jamais caractérisé auparavant. Une étude préliminaire effectuée lors du démarrage du projet NanoStress avait révélé qu'il était composé exclusivement d'Ag⁺, permettant ainsi de comparer des produits représentatifs des deux grandes catégories d'argent colloïdal commercialisé et de répondre, en partie, à la recommandation de l'ANSES sur la nécessité de « discriminer les effets générés par les nanoparticules d'argent avec ceux produits par les ions Ag⁺ » (ANSES, 2015).

Enfin, ces deux produits ne montrent la présence d'aucun contaminant en concentration importante au regard de celle de l'argent. Il est toutefois à noter que des traces de tungstène (Farmen et al., 2012), de cuivre et de calcium (Rong et al., 2018) ont été rapportées dans le Mesosilver™, non retrouvées dans notre étude et celle de Reed et al. (2014). Il s'agit d'un paramètre important, de nombreux produits d'argent colloïdal n'étant pas exclusivement à base d'AgNP et/ou Ag⁺, avec des effets délétères additifs souvent difficiles à appréhender. L'argent colloïdal pourrait également être en présence de contaminants alimentaires retrouvés dans l'alimentation, cela pouvant faire l'objet d'études ultérieures sur cet effet cocktail.

Les études de toxicologie environnementale fournissent des premières indications sur les dangers associés à une exposition croisée aux AgNP/contaminants alimentaires. L'étude de Kim et al. (2016) a mis en évidence chez le crustacé *Daphnia magna* qu'une exposition conjointe aux AgNP et à l'arsenic, le cuivre ou le cadmium modifie la bioaccumulation de ces métaux lourds et leur toxicité chez cet organisme. D'une part, la présence d'AgNP diminue la bioaccumulation de l'arsenic et du cuivre, sans pour autant modifier leur toxicité. D'autre part, la présence d'AgNP conduit à une bioaccumulation nettement supérieure du cadmium, associée à une toxicité accrue. En plus de ces observations, les auteurs ont mis en évidence que le cadmium se lie aux AgNP, et en extrapolant ce cas d'étude aux conditions d'exposition orale chez l'Homme, il n'est pas à exclure des phénomènes similaires. En effet, le cadmium est très répandu dans l'environnement et son ingestion peut présenter des risques pour la santé humaine, tels que des atteintes rénales (Savolainen, 1995). Avec une dose journalière tolérable fixée à 0,35 µg/kg p.c./jour (ANSES, 2019), dose étant estimée dépassée par 0,6 % de la population adulte (Arnich et al., 2012) et 15 % des enfants (de 3 à 17 ans) (Jean et al., 2018; Marín et al., 2017), l'exposition alimentaire au cadmium conjointe à celle d'argent colloïdal pourrait avoir des effets délétères pour la santé humaine.

- b) Le besoin de recourir à une grande diversité de méthodes de caractérisation physico-chimique sur les produits natifs, mais également dans les milieux et tissus biologiques en contact avec les produits étudiés

L'un des principaux enjeux liés à l'évaluation des risques associés à l'exposition à l'argent sous sa forme nanoparticulaire et/ou ionique, et dans notre cas précis aux deux produits d'argent colloïdal Mesosilver™ et AgC, est leur instabilité qui est dépendante de leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques (forme, taille, revêtement des AgNP) mais aussi de leur environnement proche (pH, présence de sels et de protéines...). L'utilisation de méthodes

de caractérisation physico-chimique variées et complémentaires est nécessaire afin de donner sens aux évaluations toxicologiques, tant sur les aspects *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, comme le soulignait l'ANSES dans son rapport en 2015, « trop peu d'études s'intéressent aux variations des paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent dans les tests *in vitro* et *in vivo* ».

Afin de faire face à ces enjeux, ce projet a fait appel à des partenariats ciblés permettant de réaliser des analyses physico-chimiques sur les produits natifs, mais également dans les milieux et tissus biologiques. Ainsi, une caractérisation poussée des produits Mesosilver™ et AgC natifs a été réalisée en déterminant la concentration en argent (par ICP-MS), la présence d'AgNP (par MET, spectrométrie UV-vis et DLS) et leur répartition en taille (par MET, taille moyenne de 12 nm pour le Mesosilver™). La répartition entre argent ionique et AgNP a également été explorée, l'AgC étant composé exclusivement d'Ag⁺ et le Mesosilver™ majoritairement d'AgNP dans une proportion qui sera à comparer avec la littérature (Farmen et al., 2012; Rong et al., 2018). Dans beaucoup d'études existantes sur les AgNP, les analyses physico-chimiques se limitent à ce stade. Pour notre part, la caractérisation de l'argent a été affinée en faisant appel aux avantages combinés de différentes méthodes multi-échelle : imageries CytoViva™ et HIM-SIM, ainsi que μ XRF et μ XAS en rayonnement Synchrotron sur la ligne de lumière LUCIA à SOLEIL.

La spectrométrie UV-vis nous a permis de contrôler facilement la stabilité des AgNP présentes dans le Mesosilver™ une fois en contact avec le milieu de culture cellulaire utilisé *in vitro* (DMEM). Nous avons ainsi pu identifier le sérum de veau fœtal (SVF) du milieu comme un composé stabilisateur des AgNP grâce à la formation d'une couronne protéique (« corona ») autour des nanoparticules, induisant le décalage du pic caractéristique des AgNP sur les spectres UV-vis (Ashkarran et al., 2012; Burcza et al., 2015). Le SVF est un composé important pour la croissance des cellules sur nos modèles *in vitro* Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX, ainsi l'interaction de l'argent avec les molécules le composant pourrait également moduler la toxicité des AgNP. Shannahan et al. (2013) ont étudié la composition de la couronne protéique autour des AgNP-citrate et AgNP-PVP (20 et 110 nm pour chaque type de nanoparticules) après une incubation dans un milieu DMEM avec 10% de SVF sur une durée de 24 h. Ils ont détecté de l'albumine, des apolipoprotéines et des kératines, ainsi que d'autres protéines du sérum présentes en moindre quantité. Dans une étude ultérieure, la même équipe a montré que la formation d'une couronne protéique, par la pré-incubation des AgNP-citrate de 20 nm avec de l'albumine de sérum humain, bovin ou avec des lipoprotéines de haute densité (HDL), diminue l'internalisation et la cytotoxicité des AgNP sur des modèles cellulaires cardiaques et

pulmonaires (Shannahan et al., 2015). À l'inverse, Barbalinardo et al. (2018) ont montré que la présence de SVF était nécessaire à l'internalisation des AgNP-citrate (15 ± 3 nm) et l'induction d'une cytotoxicité sur une lignée de fibroblastes murins. Ces différentes études soulignent l'importance des interactions entre l'argent et son environnement pour moduler son activité cytotoxique.

Dans ce contexte, les conditions d'exposition les plus réalistes sur des modèles cellulaires intestinaux *in vitro* seraient de considérer des produits ayant préalablement subi une étape de digestion. Les modèles les plus courants de digestion *in vitro* reposent sur une série de réactions chimiques et enzymatiques mimant les différentes phases digestives, incluant les phases buccale, gastrique et intestinale. Ces modèles ont été notamment utilisés pour la caractérisation (Laloux et al., 2020) et l'évaluation de la cytotoxicité (Abdelkhalik et al., 2020; Böhmert et al., 2014; Lichtenstein et al., 2015) d'AgNP modèles, mais également la caractérisation d'un produit commercial d'argent colloïdal (Wu et al., 2018). Dans l'étude de Wu et al. (2018), les propriétés physico-chimiques de ce produit composé d'un mélange AgNP/Ag⁺ (avec un rapport 70:30) ont été modifiées au cours du processus de digestion. En particulier, dans la phase gastrique, une oxydation/dissolution d'environ 70% des AgNP en Ag⁺ s'est opérée, les ions Ag⁺ se liant ensuite à des biomolécules (peptides et protéines). Ces données soulignent l'importance des transformations physico-chimiques de l'argent lors de la digestion, qui pourraient moduler son internalisation par les cellules et potentiellement sa cytotoxicité. Abdelkhalik et al. (2020) ont montré que des AgNP-citrate et AgNP-acide lipoïque (50 nm) étaient retrouvées en moindre quantité dans des cellules Caco-2 exposées pendant 24 h si ces AgNP avaient subi une digestion préalable. L'étude de Lichtenstein et al. (2015) met en avant que l'ajout d'une matrice alimentaire (lait en poudre, amidon et huile d'olive) au cours du processus de digestion *in vitro* est un paramètre qui module l'internalisation des AgNP par les cellules Caco-2, cette dernière étant augmentée en présence de la matrice alimentaire. Ces auteurs soulignent toutefois qu'avec ou sans digestion, de même qu'avec ou sans matrice alimentaire, les effets cytotoxiques d'AgNP (de 20 à 100 µg/mL) sont comparables lors d'une exposition de 24 h, confirmant les observations d'une étude antérieure de la même équipe (Böhmert et al., 2014).

La principale limite de l'application de ces étapes de digestion *in vitro* (bouche, estomac, intestin) à nos produits d'argent colloïdal, afin de les exposer par la suite aux modèles cellulaires d'intérêt, est relative aux dilutions successives effectuées. Concernant la littérature existante sur les AgNP, cela peut être de l'ordre de 1/5^{ème} (Wu et al., 2018) jusqu'à 1/100^{ème} (Böhmert et

al., 2014; Lichtenstein et al., 2015). De plus, le digestat ne peut pas être appliqué directement sur les cellules, au risque d'induire une cytotoxicité par les fluides digestifs, via notamment les enzymes digestives (Böhmert et al., 2014). Ainsi, une dilution du digestat est généralement réalisée dans le milieu de culture, de l'ordre de $1/10^{\text{ème}}$ (Abdelkhalik et al., 2020; Lichtenstein et al., 2015). Finalement, pour nos produits initialement peu concentrés en argent (22,1 $\mu\text{g/mL}$ pour le Mesosilver™ et 17,1 $\mu\text{g/mL}$ pour l'AgC), les concentrations finalement exposées seraient très faibles. Une optimisation des procédés de digestion appliqués pourrait toutefois être envisagée et faire l'objet d'un travail ultérieur. Pour notre part, nous avons fait le choix de conserver un modèle d'exposition en présence de SVF comme meilleur compromis expérimental.

Afin de s'affranchir des limites citées précédemment, une approche pertinente concerne l'exposition orale *in vivo*, mais celle-ci représente également un verrou pour la caractérisation de l'argent et les interactions avec l'environnement du tractus digestif lors de la digestion. Dans notre étude, la combinaison $\mu\text{XRF}/\mu\text{XAS}$ nous a permis d'identifier la localisation de l'argent, ainsi que la nature de celui-ci (Ag^+/Ag^0) dans le contenu colique après exposition orale au Mesosilver™. Nous avons montré pour la première fois que l'argent, après son oxydation *in vivo*, interagit préférentiellement avec les groupements thiols (R-SH) présents dans l'environnement digestif, ce type d'interaction ayant déjà été caractérisé dans plusieurs autres environnements, comme les eaux usées (Doolette et al., 2013), les sols (Rick VandeVoort et al., 2014) ou encore les poumons (Smulders et al., 2015). Dans cette dernière étude, les auteurs ont mis en évidence, après une exposition aux AgNP (4 mg/kg p.c.) par inhalation chez la souris, la présence d'argent sous forme dissoute et lié aux groupements thiols dans une partie des macrophages du tissu pulmonaire (Smulders et al., 2015).

En considérant l'ensemble des informations de la littérature, et en se focalisant sur le Mesosilver™ qui est composé en grande partie d'AgNP, il peut être émis les hypothèses suivantes sur les transformations physico-chimiques subies lors de la digestion. Sous l'hypothèse de l'absence d'une matrice alimentaire, les AgNP sont directement soumises au stress acide du fluide gastrique provoquant une dissolution d'une partie en ions Ag^+ , qui se lient aux ions chlore pour former des complexes AgCl (Rogers et al., 2012; Wu et al., 2018) et/ou aux biomolécules présentes (peptides et protéines) (Wu et al., 2018) par les groupements thiols. Dans l'intestin grêle, la liaison préférentielle de l'argent aux fonctions thiols comparativement au chlore (Liu et al., 2012) induit la transformation de l'argent dissous sous la forme argent-thiol. L'argent présent dans le côlon se retrouve sous forme principalement Ag-biomolécule

(par l'interaction avec les groupements thiols), seulement une faible proportion étant encore sous forme AgNP (Abdelkhalik et al., 2020; Wu et al., 2018). Sous la seconde hypothèse d'une consommation du Mesosilver™ avec une matrice alimentaire, la présence de protéines dès l'entrée du tractus digestif favorise la stabilisation des AgNP mais également l'interaction de l'argent sous sa forme Ag⁺ avec les protéines de la matrice. Le fluide gastrique a un impact plus modéré sur les AgNP (i.e. dissolution plus faible en Ag⁺), une fraction nanoparticulaire potentiellement plus importante pouvant être transférée dans l'intestin grêle puis le côlon.

Il aurait été intéressant dans notre étude d'effectuer les mesures μ XRF et μ XAS sur un échantillonnage de contenus à plusieurs niveaux du tractus digestif après exposition *in vivo* pour localiser précisément l'argent et établir ses transformations physico-chimiques au cours de la digestion. Toutefois, le temps de faisceau au Synchrotron SOLEIL étant limité, le nombre d'échantillons et la surface analysée pour chacun d'entre eux ont dû être réduits, ne permettant pas d'élucider tous les mécanismes mis en jeu. Cette approche serait également très intéressante pour identifier la nature de l'argent et son environnement (i) à l'interface contenu/épithélium intestinal avec l'implication du mucus lui-même riche en groupements thiols ; (ii) lors de son absorption par les tissus digestifs et (iii) lors de son passage dans différents organes comme le foie et la rate, pour lesquels nous avons détecté et quantifié de l'argent par ICP-MS.

D'autres approches pourraient être appliquées *in vivo*, telles que les imageries CytoViva™ et HIM-SIMS, que nous avons utilisées sur nos modèles cellulaires *in vitro* pour mettre en évidence l'internalisation de l'argent dans les cellules Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX après une exposition répétée au Mesosilver™ ou à l'AgC. Reposant sur de l'imagerie hyperspectrale, le dispositif CytoViva™ permettrait d'identifier la signature spécifique des AgNP dans les tissus, tandis que l'instrumentation HIM-SIMS serait dédiée à la détection à haute résolution de l'argent et de sa co-localisation avec d'autres éléments, et plus particulièrement le soufre. Notre travail a enfin donné lieu à des premiers développements autour de la spectroscopie proche infrarouge pour caractériser les modifications globales induites par l'argent sur l'organisme et ce, de manière différente entre les produits Mesosilver™ et AgC comparativement aux conditions contrôles. Cette méthode pourrait avoir des applications en (nano)toxicologie alimentaire en utilisant la signature spectrale, par exemple dans les fèces, comme biomarqueur d'exposition.

Nous venons de voir l'attention particulière qui doit être portée aux caractéristiques physico-chimiques des produits d'argent colloïdal sous leur forme native et au cours de leur « cycle de vie » après une exposition orale. Afin d'évaluer le danger que pourrait représenter

l'ingestion quotidienne de ces produits sur la santé, et plus particulièrement sur la fonction barrière intestinale, le choix de modèles cellulaires et animaux appropriés doit être réalisé, avec des stratégies d'exposition représentatives de la consommation chez l'Homme.

- c) L'utilisation de modèles cellulaires et animaux, avec des stratégies d'exposition pertinentes, liées à la consommation journalière de ces produits

1) Exposition répétée in vitro

L'utilisation de lignées cellulaires présente de nombreux avantages pour les études toxicologiques comme (i) la possibilité d'étudier une population cellulaire précise en conditions contrôlées, assurant à la fois robustesse et reproductibilité des résultats ; (ii) la possibilité d'avoir recours à un nombre d'échantillons élevé permettant l'étude de nombreuses conditions expérimentales ; (iii) une alternative à l'expérimentation animale, permettant de s'aligner sur la politique des 3R (de l'anglais *Replacement, Reduction, Refinement*) ; (iv) des coûts d'expérimentation réduits et le maintien des lignées cellulaires en culture sur une longue durée, pouvant être prolongée sur plusieurs semaines. De nombreuses lignées cellulaires intestinales ont été développées au cours de ces dernières décennies, la lignée cellulaire Caco-2 étant, de loin, la lignée la plus couramment utilisée. Elle présente le grand avantage de se différencier spontanément en entérocytes et de former une monocouche cellulaire avec une bordure en brosse et des jonctions cellulaires fonctionnelles (Hidalgo et al., 1989; Tor, 2015). Ce modèle est d'autant plus intéressant en système de culture Transwell qui permet de cultiver les cellules Caco-2 sur un filtre, en distinguant un compartiment apical (mimant la lumière intestinale) et un compartiment basolatéral (mimant la *lamina propria*). Ainsi, il est possible d'évaluer l'intégrité de l'épithélium, en mesurant notamment la TEER ainsi que le passage de composés traceurs du compartiment apical vers le compartiment basolatéral. De plus, la culture en Transwell de ces cellules permet d'améliorer leur différenciation (Tor, 2015).

Cependant, ce modèle très utilisé en toxicologie présente certaines limites que nous avons cherché à minimiser. D'une part, le tapis cellulaire formé par les cellules Caco-2 est fortement imperméable comparativement aux conditions intestinales physiologiques. Cela s'observe notamment par la mesure de la TEER, de l'ordre de 1000 à 1500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ dans notre étude, valeur également rapportée par Hilgendorf et al. (2000). Or en condition physiologique, l'épithélium intestinal est bien plus perméable, avec une résistance estimée entre 19 et 69 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Béduneau et al., 2014; Rubas et al., 1993). En effet, l'espace para-cellulaire est estimé à

environ 5 Å pour les cellules Caco-2, tandis que celui de l'épithélium intestinal peut atteindre jusqu'à 60 Å (Arrieta et al., 2006; Fihn et al., 2000). D'autre part, le modèle Caco-2 n'est composé que d'entérocytes non représentatifs de la diversité des types cellulaires de l'épithélium intestinal. Ce modèle ne présente notamment pas de cellules caliciformes productrices de mucus, première barrière physique et chimique protectrice de l'épithélium intestinal.

Afin de nous affranchir de ces limites, du moins en partie, nous avons fait le choix de compléter notre étude avec un second modèle *in vitro* : les cellules Caco-2 cultivées en coculture avec des cellules HT29-MTX productrices de mucus. Ce modèle, pour lequel nous avons choisi une répartition de 90 % de cellules Caco-2 et de 10 % de cellules HT29-MTX à l'ensemencement, présente ainsi plusieurs avantages : (i) les cellules HT29-MTX produisent du mucus à la surface de l'épithélium intestinal ; (ii) la répartition cellulaire entre entérocytes et cellules caliciformes est plus représentative de la physiologie intestinale et (iii) la perméabilité de l'épithélium est plus faible que celle pour la monoculture de cellules Caco-2, ce qui est plus représentatif des conditions physiologiques. En effet, l'utilisation d'une coculture Caco-2/HT29-MTX avec le ratio 90:10 a montré, dans plusieurs études, une meilleure représentativité des conditions physiologiques concernant la perméabilité à différents composés (Propranolol, Kétoprofène, Furosémide), qui était associée à une TEER plus faible que celle obtenue avec la monoculture de cellules Caco-2 (Chen et al., 2010; Pan et al., 2015).

La prise en considération du mucus est un élément important en nanotoxicologie, même si comme nous l'avons souligné dans notre revue (Gillois et al., 2018), les travaux à ce sujet restent limités. Le mucus représente à la fois une barrière physique, jouant un rôle de filtre sélectif selon le critère de taille, et une barrière chimique, retenant préférentiellement les particules chargées positivement du fait de sa charge globale négative (Cui et al., 2020). À titre d'exemple, l'étude de Bhattacharjee et al. (2017) a mis en évidence que les nanoparticules de silice (SiNP), chargées négativement, traversent plus facilement le mucus que celles chargées positivement. De plus, pour les SiNP chargées négativement, les SiNP de taille 10 et 50 nm migrent à travers le mucus de manière plus aisée que celles de 100 et 200 nm.

Dans l'objectif de reproduire *in vitro* une consommation chronique d'argent colloïdal, le développement d'un modèle d'exposition répétée de 18 jours a été mis au point. En nous basant sur l'évolution de la TEER mesurée sur les cellules Caco-2 cultivées en système Transwell, nous avons montré que la TEER se stabilise autour du 14^{ème} jour après ensemencement, correspondant au stade de différenciation complète des cellules en entérocytes

fonctionnels (Hidalgo et al., 1989). Nous avons défini une fenêtre d'exposition de 18 jours correspondant à une période où les cellules sont en fin de différenciation (10 au 14^{ème} jour environ) puis totalement différenciées jusqu'au 28^{ème} jour, stade pour lequel les cellules peuvent être maintenues en culture avec une valeur de TEER stable (Da Violante et al., 2004; DiMarco et al., 2017).

Dans notre étude *in vitro*, le choix des concentrations étudiées au cours de l'exposition répétée de 18 jours s'est basé sur un critère principal : la concentration maximale testée (3 µg/mL) est la concentration limite que nous avons déterminée comme non-cytotoxique après une exposition de 24 h sur des cellules différenciées qui sont plus résistantes que des cellules en prolifération. Les tests de cytotoxicité pouvant être sensibles aux interférences avec l'argent (voir Introduction, Partie 3 - section 2.2.1e), p87), nous avons utilisé le test Alamar Blue, identifié comme n'interférant pas avec l'argent (Mello et al., 2020), et nous avons confirmé les résultats obtenus par la mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu cellulaire, indicatrice des lésions de la membrane plasmique des cellules (résultats non montrés). Une concentration intermédiaire (1 µg/mL) et une concentration 10 fois plus faible (0,1 µg/mL) ont été par la suite sélectionnées. En considérant le volume d'exposition de 300 µL sur une surface d'insert de 0,33 cm², l'exposition est de 0,27, 2,7 et 8,1 µg/cm² pour les concentrations 0,1, 1 et 3 µg/mL respectivement.

Afin de comparer nos conditions avec l'exposition humaine, sur la base de l'étude clinique de Munger et al. (2014) ayant évalué l'exposition orale à deux produits d'argent colloïdal chez l'Homme, nous pouvons estimer une dose d'environ 5 µg/kg p.c./jour, soit la valeur de référence fixée par l'EPA (EPA, 1991). Chez un individu de 70 kg et en considérant que l'argent ingéré se distribue sur une surface intestinale de 30 m² (Helander and Fändriks, 2014), la quantité administrée serait de 1,2 ng/cm², soit environ 200 fois moins que notre concentration d'exposition la plus faible (0,1 µg/mL). Il est toutefois à prendre en considération que l'estimation de la surface intestinale doit tenir compte de celle des microvillosités, l'étude de Helander et Fändriks, (2014) ayant montré un facteur d'augmentation de la surface intestinale compris entre 6-7 dans le côlon et 14-15 dans le jéjunum et l'iléon. Si l'on considère une structure des microvillosités comparable entre les cellules intestinales humaines et les cellules Caco-2, cela augmente d'approximativement un facteur 10 la surface exposée sur nos modèles *in vitro* ; dans ce cas, la dose la plus faible représenterait donc une exposition 20 fois supérieure à une condition « réaliste ». Bien que ces calculs puissent nous permettre de comparer les modes d'exposition *in vitro* et *in vivo*, ils supposent que l'argent se répartit

uniformément sur la surface intestinale, ce qui ne reflète probablement pas la réalité ; par ailleurs, ils ne prennent pas en considération la dilution du produit lors de la formation du chyme ni les temps de transit variables dans les différentes régions du tractus digestif, ce qui souligne d'autant plus la nécessité des études intégrées *in vivo*.

Dans notre étude *in vitro*, la concentration de 0,1 µg/mL de Mesosilver™ ou d'AgC n'a induit aucun effet délétère sur la viabilité ou encore la perméabilité des modèles cellulaires Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX. Les premiers effets cytotoxiques ont été observés pour une concentration de 1 µg/mL avec une exposition supérieure à 48 h. Ces observations soulignent l'importance de considérer une stratégie d'exposition répétée, encore peu étudiée dans la littérature, dans le but d'évaluer la toxicité des produits d'argent colloïdal, et à plus large échelle de tout additif ou contaminant alimentaire, sur les modèles cellulaires *in vitro*. En effet, les effets délétères à de telles concentrations n'auraient pas pu être démontrés au cours d'une exposition aiguë de 24 h. La comparaison des deux produits, Mesosilver™ et AgC, nous a permis également de mettre en évidence des effets toxicologiques plus importants pour l'AgC, composé exclusivement d'Ag⁺, comparativement au Mesosilver™. Ces résultats illustrent que la toxicité des produits d'argent colloïdal est très variable et dépendante de leur composition et de leurs caractéristiques physico-chimiques. Une généralisation de la toxicité de l'ensemble des produits d'argent colloïdal reste pour cette raison difficile à proposer.

Au-delà des effets différents entre les produits Mesosilver™ et AgC, des différences de réponse ont été mises en évidence entre les cellules Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX. En effet, le modèle de coculture a conservé son intégrité épithéliale, comme démontré par la mesure de TEER, dans l'ensemble des conditions testées, alors que la TEER a été altérée dans la monoculture à des concentrations de 1 et 3 µg/mL pour l'AgC et de 3 µg/mL pour le Mesosilver™. Nous pourrions supposer que la présence de mucus dans le modèle de coculture joue un rôle protecteur en réponse à l'exposition aux produits d'argent colloïdal. Or la cytotoxicité mesurée est comparable entre les deux modèles, remettant en cause cet effet protecteur du mucus, en raison probablement de sa répartition inégale à la surface épithéliale. En effet, le mucus est produit localement, là où les cellules HT29-MTX sont présentes, formant des îlots et non une couche continue sur l'épithélium. Cette structuration en îlots a également été rapportée dans d'autres études ayant utilisé la coculture Caco-2/HT29-MTX (Dorier et al., 2017; García-Rodríguez et al., 2018). Sur la base de ce constat, il est difficile d'estimer l'apport réel de la composante liée au mucus dans ce modèle. L'effet « protecteur » de la coculture Caco-2/HT29-MTX pourrait ainsi être plutôt dû à la structure en plusieurs couches cellulaires. En

effet, contrairement à la monoculture Caco-2, la coculture présente une structure pluri-couches qui permettrait, malgré l'altération des cellules en extrême surface, de maintenir l'intégrité globale de l'épithélium. Ces deux constats, à savoir une production localisée de mucus et une structure en multicouche cellulaire, représentent deux importantes limites pour une application optimale de ce modèle. D'autres approches pourraient être envisagées à l'avenir pour étudier la toxicité de l'argent colloïdal *in vitro* en considérant le mucus, comme l'utilisation de mucus jéjunal de porc fraîchement isolé et purifié (Bhattacharjee et al., 2017) ou encore de mucines commerciales mais qui présentent une composition appauvrie du fait des différentes phases de purification (De Saiegui and Plonska, 1969; Sardelli et al., 2019).

Par ailleurs, les modèles cultivés en système Transwell, bien que permettant une étude fine de la perméabilité intestinale, sont statiques et ne considèrent pas la clairance du mucus observable *in vivo*. Des phénomènes de sédimentation des nanoparticules, sous forme agglomérée notamment, sont également parfois décrits dans la littérature comme dans le cas du TiO₂ (Faust et al., 2014), ce qui pourrait être accentué par le mode d'exposition répétée. Afin de nous affranchir de tout effet de sédimentation pour des études ultérieures sur d'autres produits d'argent colloïdal ou d'autres formes de nanoparticules alimentaires, nous avons mis au point dernièrement un système de culture inversée sur la base de l'étude de Beloqui et al. (2017) (Figure 43A). La faisabilité de ce système a été démontrée avec des profils (viabilité et TEER) pour le Mesosilver™ relativement similaires pour la monoculture de cellules Caco-2 en système conventionnel (voir partie 1 des résultats expérimentaux) ou inversé. Ici, une tendance à la diminution de la TEER peut être observée pour la concentration de 3 µg/mL après 10 jours d'exposition répétée (Figure 43C), ainsi qu'une diminution de la viabilité pour les concentrations de 1 et 3 µg/mL en fin de procédure d'exposition (Figure 43B). Cela sera à confirmer par des analyses supplémentaires sur les cellules Caco-2 ainsi que sur le modèle de coculture Caco-2/HT29-MTX.

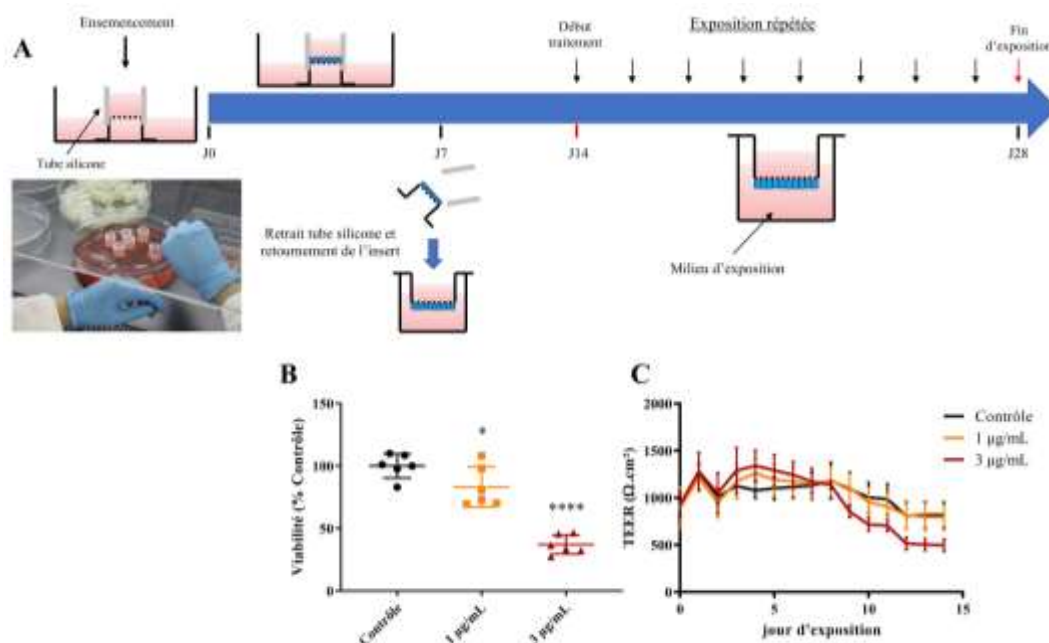


Figure 43 : modèle de monoculture Caco-2 cultivée sur système Transwell inversé et exposée de façon répétée au Mesosilver™. (A) Modèle de culture en système Transwell inversé. (B-C) Viabilité mesurée par le test Alamar Blue en fin d'exposition (B) et suivi de la TEER au cours de l'exposition (C). L'insert Transwell est inversé dans le milieu de culture et un nouveau compartiment est créé par l'ajout d'un tube de silicone. Ce nouveau compartiment estensemencé avec les cellules qui sont cultivées sous cette configuration sur une durée de 7 jours. Au 7^{ème} jour, le tube de silicone est retiré et l'insert repositionné de manière conventionnelle. Les cellules sont ainsi cultivées en système inversé jusqu'au 14^{ème} jour avant stabilisation de la TEER. Au 14^{ème} jour, une première exposition au Mesosilver™ à une concentration de 1 et 3 µg/mL est réalisée, puis renouvelée à chaque changement de milieu jusqu'au 28^{ème} jour. Le milieu d'exposition se trouve en-dessous et permet donc d'éviter tout phénomène de sédimentation. n=6 par groupe ; * p < 0,05 ; **** p < 0,0001 vs contrôle, ANOVA 1 facteur.

Les recherches futures dans le domaine de la nanotoxicologie *in vitro* s'orienteront très certainement vers l'utilisation de technologies « gut-on-a-chip » qui permettent la prise en compte des spécificités mécaniques, hydrodynamiques et/ou microbiennes de l'environnement digestif, à partir de cellules Caco-2 ou plus récemment de cellules non cancéreuses issues d'organoïdes avec notamment la mise en évidence de la formation d'une couche de mucus homogène (Bein et al., 2018; Kasendra et al., 2018; Sontheimer-Phelps et al., 2020). À l'heure actuelle, les études *in vivo* restent l'approche la plus pertinente pour étudier de manière intégrée la toxicité de composés, et plus particulièrement dans le cadre de nos travaux, sur le triptyque épithélium, mucus et microbiote intestinal dans sa fonction de protection de l'hôte.

2) Exposition sub-chronique in vivo

Dans notre étude *in vivo*, nous avons fixé une dose d'exposition de 0,15 mg/kg p.c./jour, correspondant à une exposition environ 20 fois supérieure à l'exposition estimée chez l'Homme (Munger et al., 2014), même s'il est admis que les niveaux peuvent être sous-estimés (Van den Brule et al., 2016; Wijnhoven et al., 2009). Ce facteur est défini afin de pouvoir extrapoler les résultats à l'Homme, le modèle murin présentant un métabolisme plus important que l'humain (Nair and Jacob, 2016). Cette exposition a été réalisée par gavage, approche pertinente pour mimer l'ingestion par bolus, bien qu'elle ait pour limite de ne pas considérer le passage bucco-œsophagien. Enfin, l'exposition orale a été réalisée sur une durée totale de 28 jours correspondant à une étude de toxicité sub-chronique, représentative d'une consommation généralement saisonnière des produits d'argent colloïdal pour leurs vertus santé supposées.

Différents paramètres systémiques, et plus particulièrement de la fonction barrière intestinale, ont été analysés afin d'établir et de comparer les effets du Mesosilver™ et de l'AgC sur l'épithélium, le mucus et le microbiote intestinal. Des paramètres physiologiques, comme le poids et la consommation alimentaire des animaux ainsi que le niveau d'inflammation dans le contenu colique (mesure de LCN-2), ont également été déterminés. L'utilisation conjointe de la qPCR et de la mesure de la perméabilité intestinale *in vivo* nous a permis d'évaluer l'intégrité de l'épithélium intestinal. La caractérisation du mucus a également été menée via la mesure de son épaisseur dans le côlon distal par histologie et la détermination de la nature et de la longueur des chaînes O-glycaniques composant les mucines jéjunales et coliques. Enfin, les populations bactériennes et fongiques fécales ont été caractérisées par séquençage de l'ARNr 16S afin d'obtenir les signatures microbiennes spécifiques des effets du Mesosilver™ et de l'AgC.

De manière globale, l'exposition orale au Mesosilver™ ou à l'AgC à une dose de 0,15 mg/kg p.c./jour sur une durée de 28 jours chez la souris mâle adulte a eu peu d'effet sur l'ensemble des paramètres étudiés. Cependant, il est à noter que le produit AgC a un impact plus marqué que le produit Mesosilver™, corroborant nos observations *in vitro* sur les modèles cellulaires Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX. Cela s'observe particulièrement avec le marqueur pro-inflammatoire LCN-2 dans le contenu colique, significativement augmenté pour l'AgC, mais pas pour le Mesosilver™. La différence d'effet entre les deux produits est retrouvée au niveau des groupes bactériens affectés : d'une part, une diminution de la famille *Ruminococcaceae* (comprenant *Ruminococcus*) et une augmentation des genres *Intestinimonas* et *Lachnospiraceae* A2 sont observées pour le Mesosilver™ ; d'autre part, une augmentation de la famille *Anaerovoracaceae* et du genre *Tyzzereella* est observée pour l'AgC. Ces différences

de composition du microbiote bactérien pourraient être source, ou conséquence, des modifications de la nature des O-glycanes des mucines coliques qui ont également été observées, sans toutefois pouvoir à ce stade statuer sur l'hypothèse la plus probable. Les effets modérés, observés notamment sur l'inflammation intestinale dans le cas du produit AgC, pourraient être accentués au cours d'une durée d'exposition orale chronique de 90 jours, ce qui constitue une perspective à envisager pour nos travaux. Cette question est d'autant plus importante que la consommation d'argent colloïdal peut être quotidienne sur de très longues périodes (plusieurs années) chez certains individus (Jung et al., 2017).

Dans ses recommandations sur l'évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition aux AgNP, l'ANSES a souligné l'importance de « consolider les études de génotoxicité *in vivo* » (ANSES, 2015). L'évaluation de la génotoxicité dans notre modèle d'exposition *in vivo* est d'autant plus pertinente que les résultats obtenus *in vitro* ont montré que le Mesosilver™ et l'AgC, plus particulièrement, sont capables d'induire une génotoxicité dès 1 µg/mL sur des cellules Caco-2 indifférenciées (i.e. au stade de prolifération) après une exposition aiguë de courte durée (de 1 à 6 h). Or l'épithélium intestinal est un tissu à fort renouvellement cellulaire et pourrait être particulièrement sensible aux effets génotoxiques de ces deux produits. L'approche la plus utilisée pour évaluer la génotoxicité dans un organe est le test de comète, permettant de mettre en évidence les cassures des brins d'ADN. Très récemment, l'étude de Narciso et al. (2020) a mis en œuvre ce test sur des cellules préalablement dissociées du foie, du rein, de la rate et du duodénum de souris CD1 exposées oralement à 50, 150, 300 mg/kg p.c./jour d'AgNP (20 nm) sur une durée de 3 jours, sans qu'aucun effet génotoxique n'ait été observé. Dans nos conditions plus « réalistes » vis-à-vis de l'exposition humaine, il serait intéressant d'évaluer et de comparer les effets des deux produits Mesosilver™ et AgC sur la génotoxicité, en particulier lors d'un traitement chronique de 90 jours.

L'étude ayant été réalisée chez la souris mâle, une exploration de l'impact des produits d'argent colloïdal chez la femelle serait également à envisager, un dimorphisme sexuel ayant été observé dans les études relatives aux AgNP. L'élément le plus récurrent mis en évidence est une bioaccumulation plus importante d'argent chez les femelles, comparativement aux mâles, dans les reins (Boudreau et al., 2016; Kim et al., 2010, 2008), le foie (Boudreau et al., 2016) et l'intestin (jéjunum et côlon ; Boudreau et al., 2016; Shahare et al., 2013). Il a également été mis en évidence un dimorphisme sexuel dans les modifications du microbiote intestinal induites par l'exposition orale aux AgNP (Williams et al., 2015). L'ensemble de ces résultats appuient

l'intérêt de poursuivre nos recherches sur l'impact d'une exposition orale au Mesosilver™ ou à l'AgC chez la femelle, qui pourrait être plus sensible que le mâle à ces produits.

d) L'utilisation de modèles pertinents de fragilisation de la fonction barrière intestinale pour mimer des conditions plus spécifiques de sous-populations sensibles

Dans une société où 25% de la population est estimée sujette à l'hyper-stress (Stimulus, 2017), sa prévalence étant accentuée par le contexte sanitaire actuel (Salari et al., 2020), la prise en considération des effets délétères du stress psychologique chronique sur la fonction barrière intestinale est aujourd'hui des plus pertinentes dans l'évaluation des dangers associés à l'exposition orale à l'argent colloïdal. En effet, le stress psychologique induit une augmentation de la perméabilité intestinale (Vanuytsel et al., 2014), dont le maintien de façon chronique favorise le développement de troubles intestinaux tels que le SII, se traduisant également par une dysbiose du microbiote intestinal (Chong et al., 2019; Collins, 2014).

Concernant les approches *in vitro*, de nombreuses stratégies permettent d'augmenter la perméabilité de l'épithélium intestinal (généralement une monoculture de cellules Caco-2) et ce sont plus de 250 inducteurs d'hyperperméabilité intestinale qui ont été référencés par Maher et al. (2016). Des approches les plus couramment admises, il peut être cité l'utilisation d'EDTA (1 mM pour une augmentation de la perméabilité d'un facteur 6 ; Maher et al., 2016) en tant qu'agent chélatant du calcium (Ca^{2+}) dans le milieu, limitant sa biodisponibilité pour les cellules et induisant une relocalisation de la E-cadhérine et une fragilisation des jonctions cellulaires (Collares-Buzato et al., 1994; Tippin and Thakker, 2008; Tomita et al., 1996, 1994). En outre, l'ajout de cytokines pro-inflammatoires dans le milieu basolatéral, telles que le $TNF\alpha$ et l' $INF\gamma$ (10 ng/mL pour chacun, pour une augmentation de la perméabilité d'un facteur 5; Chen et al., 2015) permet de mimer la fragilisation de l'épithélium intestinal par une inflammation, se traduisant par une augmentation de la perméabilité intestinale dépendante de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (Chen et al., 2015; Ma et al., 2004; Rodriguez et al., 1995).

Il pourrait être intéressant d'appliquer l'une de ces stratégies sur les cellules Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX, en s'assurant que l'inducteur d'hyperperméabilité intestinale soit compatible avec le mode d'exposition répétée sur les deux modèles cellulaires, et sans interférence avec les AgNP et/ou l'Ag⁺. Dans ce projet, nous nous sommes focalisés sur un modèle de stress psychologique chez l'animal permettant une approche intégrée des effets physiopathologiques du stress, qu'il n'est pas possible de reproduire sur un modèle *in vitro*.

L'exposition orale au Mesosilver™ ou à l'AgC en condition de barrière intestinale fragilisée a été réalisée chez la souris mâle C57BL/6N. Le modèle de stress d'évitement passif de l'eau (WAS) avait été préalablement décrit dans l'équipe chez la souris mâle C57BL/6J (Yvon et al., 2019), avec une augmentation significative à la fois du marqueur pro-inflammatoire intestinal LCN-2 et de la perméabilité intestinale *in vivo*. Ces observations n'ont pas été retrouvées dans notre étude, le taux de LCN-2 et la perméabilité intestinale n'ayant été que modérément modifiés. Outre la différence de réponse entre les deux lignées de souris, plusieurs pistes ont été envisagées afin d'expliquer la faible réponse des animaux au WAS, hormis sur le critère de défécation. L'étude de Chassaing et al. (2012) rapporte une augmentation du taux de LCN-2 fécal d'un facteur proche de 100 (contre 3 pour l'étude d'Yvon et al. (2019)) pour des animaux ayant été exposés à du DSS (*Dextran Sulfate Sodium salt*) à 1%, produit utilisé pour induire une inflammation intestinale comparable à celle observée dans les MICI (Eichele and Kharbanda, 2017). Les effets du WAS étant subtils, avec pour objectif d'être plus représentatif d'un stress chronique chez l'Homme, ceux-ci pourraient être plus facilement masqués par l'impact de certaines procédures expérimentales, elles-mêmes susceptibles d'induire un stress chez les animaux contrôles. En effet, le gavage journalier ainsi que la mesure de la perméabilité intestinale sont des opérations invasives et stressantes. À titre d'illustration, le poids des animaux a diminué après la procédure de perméabilité *in vivo*, pouvant s'expliquer par la période de mise à jeun ainsi que par l'étape de prélèvement sanguin. Sur ce dernier point, une amélioration de la procédure a été proposée au cours de notre étude *in vivo*. Initialement, le prélèvement était réalisé au niveau de la veine sous-mandibulaire, pouvant induire un stress chez l'animal et chez le manipulateur ; de ce fait, un prélèvement à la queue a ensuite été mis en place. Cette procédure, avec adaptation du protocole, a eu également pour avantage de ne nécessiter que 10 µL de sang, contre 100 µL initialement. Au-delà de l'optimisation des procédures pour limiter le stress des animaux en condition contrôle, d'autres modèles de stress psychologique chronique seraient intéressants à développer pour la suite de nos travaux.

Ainsi, le stress chronique léger et imprévisible (*Unpredictable Chronic Mild Stress-UCMS*) pourrait être intéressant en tant que modèle de fragilisation de la barrière intestinale. Ce stress consiste à soumettre l'animal chaque jour à un stress différent et aléatoire, pouvant être un stress de contrainte, une inversion jour/nuit, un stress auditif, un stress d'évitement passif de l'eau, un stress lié à l'odeur d'un prédateur, l'humidification de la litière ou encore l'inclinaison de la cage. Cette liste est non exhaustive et chaque étude a son propre protocole,

avec des durées d'exposition très variables et pouvant être étalées jusqu'à 8 semaines (Siopi et al., 2020). La mise en place d'un tel modèle serait d'autant plus pertinente dans le cas d'une exposition chronique de 90 jours comme discuté précédemment. Néanmoins, cette procédure reste traumatisante pour l'animal, induisant une dépression chez celui-ci (Marin et al., 2017; Siopi et al., 2020), ainsi que contraignante pour l'expérimentateur. Un autre modèle pouvant être envisagé est le stress de contrainte répété (*Repeated Restraint Stress - RRS*) qui consiste à réaliser une même procédure de stress aigu de contrainte sur une période de plusieurs jours (généralement entre 5 et 7 jours). Ce stress, dont la durée par jour peut varier entre 2 h (Xu et al., 2014) et plus de 6 h (Galley et al., 2014; Luo et al., 2014), induit une altération de la fonction barrière intestinale, caractérisée par une augmentation de la perméabilité intestinale (Luo et al., 2014; Xu et al., 2014), une diminution de l'épaisseur du mucus (Luo et al., 2014), une dysbiose du microbiote intestinal (Galley et al., 2014; Xu et al., 2014) ainsi qu'une inflammation intestinale (Xu et al., 2014). Que ce soit pour le UCMS ou le RSS, chaque étude a son propre protocole avec une intensité du stress très variable, ce qui rend difficile la définition d'un modèle générique, comparable sur l'ensemble des études existantes.

Un modèle de stress chez la souris reposant sur une exposition orale à la corticostérone (David et al., 2009), hormone médiatrice des effets systémiques du stress psychologique chez le rongeur (Hong et al., 2011; Munckt et al., 1984), pourrait enfin être envisagé, en particulier sur notre modèle de souris mâle C57BL/6N qui est plus sensible aux effets déresseurs générés que la souris C57BL/6J (Sturm et al., 2015). L'exposition peut se faire via l'eau de boisson (David et al., 2009), un implant sous-cutané (Sturm et al., 2015) ou une injection sous cutanée (Demuyser et al., 2016; Zheng et al., 2013) sur une durée pouvant aller de 10 jours (Zheng et al., 2013) à 21 jours (David et al., 2009; Demuyser et al., 2016; Sturm et al., 2015). Dans l'étude de Zheng et al. (2013), une exposition de 3 mg/kg p.c./jour de corticostérone sur une durée de 10 jours chez le rat Wistar a induit une diminution significative de l'expression des protéines de jonctions serrées dans le côlon, associée à une augmentation de la perméabilité intestinale colique (mesurée par perfusion intestinale de PEG-400 Da) et de la sensibilité viscérale. Nous avons très récemment introduit ce modèle au laboratoire et évalué l'effet d'une exposition à la corticostérone (35 µg/mL) via l'eau de boisson, sur une durée de 10 jours chez la souris C57BL/6N, sur la perméabilité intestinale avec le marqueur FITC 4 kDa (Figure 44). Ce traitement a induit une augmentation significative de la perméabilité intestinale de l'ordre de 50 %, et sans conséquence sur la prise de poids des animaux. Ces résultats prometteurs confirment l'intérêt d'étudier maintenant les autres acteurs de la fonction barrière intestinale

(mucus et microbiote), ainsi que le marqueur d'inflammation intestinale LCN-2, afin de valider ce modèle de fragilisation de la barrière chez la souris puis de l'appliquer sur une longue période, compatible avec le traitement chronique de 90 jours avec le Mesosilver™ ou l'AgC.

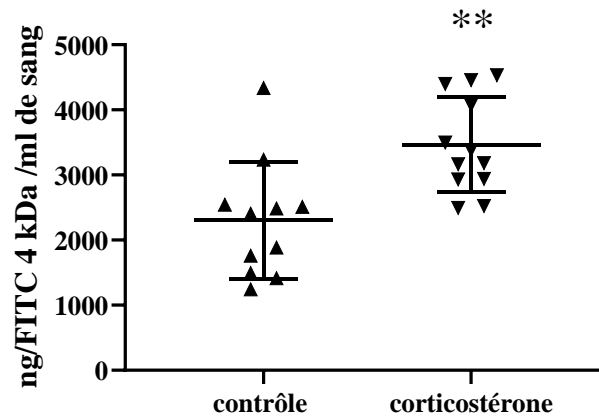


Figure 44 : effet d'une exposition (10 jours) à la corticostérone via l'eau de boisson (35 µg/mL) sur la perméabilité intestinale. La procédure de mesure de la perméabilité intestinale est décrite page 126. n=12 ; test de Student non apparié avec ** p< 0,01 vs contrôle.

Conclusion générale

Au cours de ces trois années de thèse, l'évaluation des dangers associés à la consommation orale de l'argent colloïdal disponible dans le commerce a été le cœur du projet. En considérant deux produits différents, le Mesosilver™ et l'AgC, et des modèles originaux d'exposition répétée, soit sur des modèles cellulaires épithéliaux *in vitro* soit lors d'une exposition sub-chronique de 28 jours chez la souris mâle, nous avons montré des effets spécifiques à chacun des produits, avec une toxicité généralement plus marquée pour l'AgC, composé exclusivement d'argent ionique (Ag^+) que pour le Mesosilver™, constitué lui majoritairement d'AgNP. Les effets observés *in vivo* sur la fonction barrière intestinale via le triptyque épithélium/mucus/microbiote, ainsi que les conséquences physiopathologiques associées à la durée d'exposition relativement courte, restent modérés dans le cadre de conditions « réalistes » vis-à-vis de l'exposition humaine. Toutefois, des perturbations subtiles de la composition du microbiote bactérien, de la nature des O-glycanes des mucines et du niveau d'inflammation intestinale pourraient être des indicateurs prédictifs d'altérations plus profondes lors d'une exposition à plus long terme, soulignant la nécessité d'une étude chronique de 90 jours à réaliser chez le mâle ainsi que chez la femelle afin de prendre en considération le dimorphisme sexuel. Notre travail souligne par ailleurs l'importance de prendre en compte une fonction barrière intestinale fragilisée dans les études toxicologiques afin d'intégrer d'éventuels effets potentialisateurs ou synergiques pour les populations sensibles. Grâce à l'approche multidisciplinaire menée, aux expertises combinées en biologie cellulaire, physiologie digestive, imagerie et techniques analytiques, nous avons pu illustrer l'impact de la composition de deux produits commerciaux d'argent colloïdal sur leur devenir et leur toxicité intestinale à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ceci suggère maintenant l'intérêt d'élargir notre étude car l'appellation « argent colloïdal » désigne une large gamme de produits disponibles dans le commerce, avec une concentration et une forme de l'argent (AgNP/Ag⁺) très variables. De par les approches et les méthodes utilisées, et les développements envisagés, notre travail pourrait enfin être mis à profit pour étudier les AgNP présentes dans l'additif alimentaire E174, en allant de leur caractérisation physico-chimique à leurs effets sur la sphère digestive.

The background of the slide is white with blue geometric shapes on the left and right sides. The shapes are composed of overlapping triangles and polygons in various shades of blue, creating a modern, abstract design.

Références bibliographiques

- Abbott Chalew, T.E., Schwab, K.J., 2013. Toxicity of commercially available engineered nanoparticles to Caco-2 and SW480 human intestinal epithelial cells. *Cell Biol. Toxicol.* 29, 101–116. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9241-6>
- Abdelkhalik, A., van der Zande, M., Undas, A.K., Peters, R.J.B., Bouwmeester, H., 2020. Impact of in vitro digestion on gastrointestinal fate and uptake of silver nanoparticles with different surface modifications. *Nanotoxicology* 14, 111–126. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1675794>
- Addo Ntim, S., Goodwin, D.G., Sung, L., Thomas, T.A., Noonan, G.O., 2019. Long-term wear effects on nanosilver release from commercially available food contact materials. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 36, 1757–1768. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1654138>
- Adlerberth, I., Wold, A.E., 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* 98, 229–238. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x>
- Administration, D., 2011. Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology. *Biotechnol. Law Rep.* 30, 613–616. <https://doi.org/10.1089/blr.2011.9814>
- Aguilera, M., Vergara, P., Martínez, V., 2013. Stress and antibiotics alter luminal and wall-adhered microbiota and enhance the local expression of visceral sensory-related systems in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, 515–529. <https://doi.org/10.1111/nmo.12154>
- Ait-Belgnaoui, A., Bradesi, S., Fioramonti, J., Theodorou, V., Bueno, L., 2005. Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: Role of myosin light chain kinase. *Pain* 113, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.10.002>
- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., Houdeau, E., Theodorou, V., Tompkins, T., 2014. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 510–520. <https://doi.org/10.1111/nmo.12295>
- Ait-Belgnaoui, A., Durand, H., Cartier, C., Chaumaz, G., Eutamène, H., Ferrier, L., Houdeau, E., Fioramonti, J., Bueno, L., Théodorou, V., 2012. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1885–1895. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.03.024>
- Aitken, R.J., Chaudhry, M.Q., Boxall, A.B.A., Hull, M., 2006. Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends. *Occup. Med. (Chic. Ill)*. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql051>
- Alquier-Bacquié, V., 2017. Etude de la fonction barrière de l'intestin : interactions entre l'épithélium, le mucus et le microbiote dans un modèle de souris présentant un défaut de perméabilité intestinale Soutenu.
- ANSES, 2019. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'Exposition au cadmium (Saisine n°2015-SA-0140).
- ANSES, 2017. INCA 3 : Evolution des habitudes et modes de consommation, de nouveaux enjeux en matière de sécurité sanitaire et de nutrition.

- ANSES, 2015. AVIS et rapport de l'Anses relatif à l'expertise concernant la mise à jour des connaissances sur "l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent" (Saisine n° 2011-SA-0224).
- Anuj, S.A., Gajera, H.P., Hirpara, D.G., Golakiya, B.A., 2019. Bacterial membrane destabilization with cationic particles of nano-silver to combat efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Life Sci.* 230, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.072>
- Arnich, N., Sirot, V., Rivière, G., Jean, J., Noël, L., Guérin, T., Leblanc, J.C., 2012. Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French Total Diet Study. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2432–2449. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.016>
- Arrieta, M.C., Bistriz, L., Meddings, J.B., 2006. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 55, 1512–1520. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.085373>
- Artiaga, G., Ramos, K., Ramos, L., Cámara, C., Gómez-Gómez, M., 2015. Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS. *Food Chem.* 166, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.139>
- AshaRani, P. V., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* 10, 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65>
- Ashkarran, A.A., Ghavami, M., Aghaverdi, H., Stroeve, P., Mahmoudi, M., 2012. Bacterial effects and protein corona evaluations: Crucial ignored factors in the prediction of bio-efficacy of various forms of silver nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1231–1242. <https://doi.org/10.1021/tx300083s>
- Asker, N., Axelsson, M.A.B., Olofsson, S.O., Hansson, G.C., 1998. Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 273, 18857–18863. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.30.18857>
- Ataka, K., Kuge, T., Venkova, K., Greenwood-Van Meerveld, B., 2003. Seirogan (wood creosote) inhibits stress-induced ion secretion in rat intestinal epithelium. *Dig. Dis. Sci.* 48, 1303–1309. <https://doi.org/10.1023/A:1024155125366>
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L., 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: Thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 280. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.g922>
- Aueviriyavit, S., Phummiratch, D., Maniratanachote, R., 2014. Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells - Induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 224, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.09.020>
- Augustyniak, J., Bertero, A., Coccini, T., Baderna, D., Buzanska, L., Caloni, F., 2019. Organoids are promising tools for species-specific in vitro toxicological studies. *J. Appl. Toxicol.* <https://doi.org/10.1002/jat.3815>
- Axelsson, M.A.B., Asker, N., Hansson, G.C., 1998. O-glycosylated MUC2 monomer and dimer from LS 174T cells are water-soluble, whereas larger MUC2 species formed early during biosynthesis are insoluble and contain nonreducible intermolecular bonds. *J. Biol. Chem.* 273, 18864–18870. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.30.18864>
- Axson, J.L., Stark, D.I., Bondy, A.L., Capracotta, S.S., Maynard, A.D., Philbert, M.A., Bergin,

- I.L., Ault, A.P., 2015. Rapid Kinetics of Size and pH-Dependent Dissolution and Aggregation of Silver Nanoparticles in Simulated Gastric Fluid. *J. Phys. Chem. C* 119, 20632–20641. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03634>
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bahlouli, W., Breton, J., Lelouard, M., L’Huillier, C., Tirelle, P., Salameh, E., Amamou, A., Atmani, K., Goichon, A., Bôle-Feysot, C., Ducrotté, P., Ribet, D., Déchelotte, P., Coëffier, M., 2020. Stress-induced intestinal barrier dysfunction is exacerbated during diet-induced obesity. *J. Nutr. Biochem.* 81. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108382>
- Ballatori, N., Krance, S.M., Marchan, R., Hammond, C.L., 2009. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol. Aspects Med.* <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.004>
- Bansil, R., Turner, B.S., 2018. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.023>
- Barbalinardo, M., Caicci, F., Cavallini, M., Gentili, D., 2018. Protein Corona Mediated Uptake and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Mouse Embryonic Fibroblast. *Small* 14, 1801219. <https://doi.org/10.1002/sml.201801219>
- Barr, J.J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K.L., Erb, M.L., Pogliano, J., Stotland, A., Wolkowicz, R., Cutting, A.S., Doran, K.S., Salamon, P., Youle, M., Rohwer, F., 2013. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 10771–10776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305923110>
- Baum, B., Georgiou, M., 2011. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J. Cell Biol.* 192, 907–917. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009141>
- Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., Lamprecht, A., 2014. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017>
- Bein, A., Shin, W., Jalili-Firoozinezhad, S., Park, M.H., Sontheimer-Phelps, A., Tovaglieri, A., Chalkiadaki, A., Kim, H.J., Ingber, D.E., 2018. Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. *CMGH.* <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.12.010>
- Beloqui, A., Brayden, D.J., Artursson, P., Prétat, V., Des Rieux, A., 2017. A human intestinal M-cell-like model for investigating particle, antigen and microorganism translocation. *Nat. Protoc.* 12, 1387–1399. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.041>
- Benn, T., Cavanagh, B., Hristovski, K., Posner, J.D., Westerhoff, P., 2010. The release of nanosilver from consumer products used in the home. *J. Environ. Qual.* 39, 1875–1882. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0363>
- Bennett, E.J., Tennant, C.C., Piesse, C., Badcock, C.A., Kellow, J.E., 1998. Level of chronic life stress predicts clinical outcome in irritable bowel syndrome. *Gut* 43, 256–261. <https://doi.org/10.1136/gut.43.2.256>
- Bennett, E.P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T.A., Fritz, T.A., Tabak, L.A., 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase

- gene family. *Glycobiology*. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr182>
- Berg, R.D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4, 430–435. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10057-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0966-842X(96)10057-3)
- Bergin, I.L., Wilding, L.A., Morishita, M., Walacavage, K., Ault, A.P., Axson, J.L., Stark, D.I., Hashway, S.A., Capracotta, S.S., Leroueil, P.R., Maynard, A.D., Philbert, M.A., 2016. Effects of particle size and coating on toxicologic parameters, fecal elimination kinetics and tissue distribution of acutely ingested silver nanoparticles in a mouse model. *Nanotoxicology* 10, 352–360. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1072588>
- Bertrand, D., 2002. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. *Prod. Anim.* 15, 209–219. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2002.15.3.3702>
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J. Control. Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bhattacharjee, S., Mahon, E., Harrison, S.M., McGetrick, J., Muniyappa, M., Carrington, S.D., Brayden, D.J., 2017. Nanoparticle passage through porcine jejunal mucus: Microfluidics and rheology. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 13, 863–873. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.11.017>
- Bi, Y., Marcus, A.K., Robert, H., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., Westerhoff, P., Ropers, M.H., Mercier-Bonin, M., 2020. The complex puzzle of dietary silver nanoparticles, mucus and microbiota in the gut. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* 7404. <https://doi.org/10.1080/10937404.2019.1710914>
- Bianco, C., Kezic, S., Crosera, M., Svetličić, V., Šegota, S., Maina, G., Romano, C., Larese, F., Adami, G., 2015. In vitro percutaneous penetration and characterization of silver from silver-containing textiles. *Int. J. Nanomedicine* 10, 1899–1908. <https://doi.org/10.2147/IJN.S78345>
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P., Canaider, S., 2013. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. Hum. Biol.* 40, 463–471. <https://doi.org/10.3109/03014460.2013.807878>
- Bloch, A., 1904. Des variations de longueur de l'intestin. *Bull. Mem. Soc. Anthropol. Paris* 5, 160–197. <https://doi.org/10.3406/bmsap.1904.7864>
- Böhmert, L., Girod, M., Hansen, U., Maul, R., Knappe, P., Niemann, B., Weidner, S.M., Thünemann, A.F., Lampen, A., 2014. Analytically monitored digestion of silver nanoparticles and their toxicity on human intestinal cells. *Nanotoxicology* 8, 631–642. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.815284>
- Böhmert, L., Niemann, B., Thünemann, A.F., Lampen, A., 2012. Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Arch. Toxicol.* 86, 1107–1115. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0840-4>
- Bonaz, B., Taché, Y., 1994. Water-avoidance stress-induced c-fos expression in the rat brain and stimulation of fecal output: role of corticotropin-releasing factor. *Brain Res.* 641, 21–28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91810-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91810-4)
- Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., Kurvet, I., Kahru, A., 2013. Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *PLoS One* 8.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064060>

- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., Pommier, Y., 2008. γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* <https://doi.org/10.1038/nrc2523>
- Botterel, F., Angebault, C., Bougnoux, M.E., 2015. Human mycobiome: An up-to-date review. *Rev. Francoph. des Lab.* 45, 67–73. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(15\)72823-6](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(15)72823-6)
- Boudreau, M.D., Imam, M.S., Paredes, A.M., Bryant, M.S., Cunningham, C.K., Felton, R.P., Jones, M.Y., Davis, K.J., Olson, G.R., 2016. Differential Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Tissue Accumulation, Distribution, and Toxicity in the Sprague Dawley Rat Following Daily Oral Gavage Administration for 13 Weeks. *Toxicol. Sci.* 150, 131–160. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv318>
- Bouwmeester, H., Poortman, J., Peters, R.J., Wijma, E., Kramer, E., Makama, S., Puspitaningandita, K., Marvin, H.J.P., Peijnenburg, A.A.C.M., Hendriksen, P.J.M., 2011. Characterization of translocation of silver nanoparticles and effects on whole-genome gene expression using an in vitro intestinal epithelium coculture model. *ACS Nano* 5, 4091–4103. <https://doi.org/10.1021/nn2007145>
- Boverhof, D.R., Bramante, C.M., Butala, J.H., Clancy, S.F., Lafranconi, W.M., West, J., Gordon, S.C., Lafranconi, M., West, J., Gordon, S.C., 2015. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.001>
- Bradesi, S., Schwetz, I., Ennes, H.S., Lamy, C.M.R., Ohning, G., Fanselow, M., Pothoulakis, C., McRoberts, J.A., Mayer, E.A., 2005. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: A new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 289. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00500.2004>
- Bry, L., Falk, P.G., Midtvedt, T., Gordon, J.I., 1996. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* (80-.). 273, 1380–1383. <https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1380>
- Bueno, L., 2010. Regulatory mechanisms of tight junctions permeability of gut epithelial cells. *Cah. Nutr. Diet.* 45, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2010.02.003>
- Burcza, A., Gräf, V., Walz, E., Greiner, R., 2015. Impact of surface coating and food-mimicking media on nanosilver-protein interaction. *J. Nanoparticle Res.* 17, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3235-7>
- Buts, J.P., Dekeyser, N., Stilmant, C., Delem, E., Smets, F., Sokal, E., 2006. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatr. Res.* 60, 24–29. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000220322.31940.29>
- Camilleri, M., Gorman, H., 2007. Intestinal permeability and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 545–552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.00925.x>
- Camilleri, M., Lasch, K., Zhou, W., 2012. Irritable bowel syndrome: Methods, mechanisms, and pathophysiology. the confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00155.2012>

- Cannon, W.B., 1915. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement., Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement. D Appleton & Company, New York. <https://doi.org/10.1037/10013-000>
- Cao, Y., Li, J., Liu, F., Li, X., Jiang, Q., Cheng, S., Gu, Y., 2016. Consideration of interaction between nanoparticles and food components for the safety assessment of nanoparticles following oral exposure: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.07.023>
- Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M.C., Pénicaud, L., Casteilla, L., 2006. Les espèces actives de l'oxygène: Le yin et le yang de la mitochondrie. *Medecine/Sciences.* <https://doi.org/10.1051/medsci/200622147>
- Casares, D., Escribá, P. V., Rosselló, C.A., 2019. Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>
- Cascio, C., Geiss, O., Franchini, F., Ojea-Jimenez, I., Rossi, F., Gilliland, D., Calzolari, L., 2015. Detection, quantification and derivation of number size distribution of silver nanoparticles in antimicrobial consumer products. *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 1255–1265. <https://doi.org/10.1039/c4ja00410h>
- Castagliuolo, I., Riegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., Pothoulakis, C., 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 67, 302–307. <https://doi.org/10.1128/iai.67.1.302-307.1999>
- Castaner, O., Goday, A., Park, Y.M., Lee, S.H., Magkos, F., Shiow, S.A.T.E., Schröder, H., 2018. The gut microbiome profile in obesity: A systematic review. *Int. J. Endocrinol.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4095789>
- Cattò, C., Garuglieri, E., Borruso, L., Erba, D., Casiraghi, M.C., Cappitelli, F., Villa, F., Zecchin, S., Zanchi, R., 2019. Impacts of dietary silver nanoparticles and probiotic administration on the microbiota of an in-vitro gut model. *Environ. Pollut.* 245, 754–763. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.019>
- Chang, D.E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., Anderson, A.B., Grissom, J.E., Laux, D.C., Cohen, P.S., Conway, T., 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7427–7432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307888101>
- Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M.A., Young, A.N., Gewirtz, A.T., Vijay-Kumar, M., 2012. Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *PLoS One* 7, e44328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044328>
- Chen, H., Zhao, R., Wang, B., Cai, C., Zheng, L., Wang, H., Wang, M., Ouyang, H., Zhou, X., Chai, Z., Zhao, Y., Feng, W., 2017. The effects of orally administered Ag, TiO₂ and SiO₂ nanoparticles on gut microbiota composition and colitis induction in mice. *NanoImpact* 8, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.07.005>
- Chen, N., Song, Z.-M., Tang, H., Xi, W.-S., Cao, A., Liu, Y., Wang, H., 2016. Toxicological Effects of Caco-2 Cells Following Short-Term and Long-Term Exposure to Ag Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 974. <https://doi.org/10.3390/ijms17060974>

- Chen, S.W., Zhu, J., Zuo, S., Zhang, J.L., Chen, Z.Y., Chen, G.W., Wang, X., Pan, Y.S., Liu, Y.C., Wang, P.Y., 2015. Protective effect of hydrogen sulfide on TNF- α and IFN- γ -induced injury of intestinal epithelial barrier function in Caco-2 monolayers. *Inflamm. Res.* 64, 789–797. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0862-5>
- Chen, X., Mao, S.S., 2007. Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications. *Chem. Rev.* 107, 2891–2959. <https://doi.org/10.1021/cr0500535>
- Chen, X.M., Elisia, I., Kitts, D.D., 2010. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 61, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.004>
- Cheon, J.Y., Kim, S.J., Rhee, Y.H., Kwon, O.H., Park, W.H., 2019. Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 14, 2773–2780. <https://doi.org/10.2147/IJN.S196472>
- Chin, V.K., Yong, V.C., Chong, P.P., Amin Nordin, S., Basir, R., Abdullah, M., 2020. Mycobiome in the Gut: A Multiperspective Review. *Mediators Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2020/9560684>
- Chong, P.P., Chin, V.K., Looi, C.Y., Wong, W.F., Madhavan, P., Yong, V.C., 2019. The microbiome and irritable bowel syndrome - A review on the pathophysiology, current research and future therapy. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01136>
- Chung, H., 2007. Applications of near-infrared spectroscopy in refineries and important issues to address. *Appl. Spectrosc. Rev.* <https://doi.org/10.1080/05704920701293778>
- Chung, I.S., Lee, M.Y., Shin, D.H., Jung, H.R., 2010. Three systemic argyria cases after ingestion of colloidal silver solution. *Int. J. Dermatol.* 49, 1175–1177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04380.x>
- Chwalibog, A., Sawosz, E., Hotowy, A., Szeliga, J., Mitura, S., Mitura, K., Grodzik, M., Orłowski, P., Sokolowska, A., 2010. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *Int. J. Nanomedicine* 5, 1085–1094. <https://doi.org/10.2147/IJN.S13532>
- Claus, S.P., Guillou, H., Ellero-Simatós, S., 2016. The gut microbiota: A major player in the toxicity of environmental pollutants? *npj Biofilms Microbiomes.* <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.3>
- Clemente, G.F., Rossi, L.C., Santaroni, G.P., 1977. Trace element intake and excretion in the Italian population. *J. Radioanal. Chem.* 37, 549–558. <https://doi.org/10.1007/BF02519367>
- Collares-Buzato, C.B., McEwan, G.T.A., Jepson, M.A., Simmons, N.L., Hirst, B.H., 1994. Paracellular barrier and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca²⁺ in cultured epithelia. *BBA - Mol. Cell Res.* 1222, 147–158. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90163-5](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90163-5)
- Collins, S.M., 2014. A role for the gut microbiota in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 497–505. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.40>
- Coméra, C., Cartier, C., Gaultier, E., Catrice, O., Panouille, Q., El Hamdi, S., Tirez, K., Nelissen, I., Théodorou, V., Houdeau, E., 2020. Jejunal villus absorption and paracellular tight junction permeability are major routes for early intestinal uptake of food-grade TiO₂ particles: An in vivo and ex vivo study in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 17.

<https://doi.org/10.1186/s12989-020-00357-z>

- Corfield, A.P., 2018. The Interaction of the Gut Microbiota with the Mucus Barrier in Health and Disease in Human. *Microorganisms* 6, 78. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030078>
- Corvi, R., Madia, F., 2017. In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? *Food Chem. Toxicol.* 106, 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.024>
- Crost, E.H., Tailford, L.E., Le Gall, G., Fons, M., Henrissat, B., Juge, N., 2013. Utilisation of Mucin Glycans by the Human Gut Symbiont *Ruminococcus gnavus* Is Strain-Dependent. *PLoS One* 8, e76341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076341>
- Cueva, C., Gil-Sánchez, I., Tamargo, A., Miralles, B., Crespo, J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., 2019. Gastrointestinal digestion of food-use silver nanoparticles in the dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract (simgi®). Impact on human gut microbiota. *Food Chem. Toxicol.* 132, 110657. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110657>
- Cui, X., Bao, L., Wang, X., Chen, C., 2020. The Nano–Intestine Interaction: Understanding the Location-Oriented Effects of Engineered Nanomaterials in the Intestine. *Small* 16, 1–21. <https://doi.org/10.1002/sml.201907665>
- Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., Rampal, P., 2000. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect. Immun.* 68, 5998–6004. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5998-6004.2000>
- Dałbrowska-Bouta, B., Zięba, M., Orzelska-Górka, J., Skalska, J., Sulkowski, G., Frontczak-Baniewicz, M., Talarek, S., Listos, J., Stru, L., Zyńska, M., Dałbrowska-Bouta, B., Zięba, M., Orzelska-Górka, J., Skalska, J., Sulkowski, G., Frontczak-Baniewicz, M., Talarek, S., Listos, J., Strużyńska, L., Dałbrowska-Bouta, B., Zięba, M., Orzelska-Górka, J., Skalska, J., Sulkowski, G., Frontczak-Baniewicz, M., Talarek, S., Listos, J., Stru, L., Zyńska, M., 2016. Influence of a low dose of silver nanoparticles on cerebral myelin and behavior of adult rats. *Toxicology* 363–364, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.007>
- Da Silva, S., Robbe-Masselot, C., Ait-Belgnaoui, A., Mancuso, A., Mercade-Loubière, M., Salvador-Cartier, C., Gillet, M., Ferrier, L., Loubière, P., Dague, E., Théodorou, V., Mercier-Bonin, M., 2014. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: Prevention by a probiotic treatment. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 307, G420–429. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00290.2013>
- Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Frenco, J.L., Zhiri, A., Li-Khuan, R., Tricottet, V., Provot, G., Chaumeil, J.C., Arnaud, P., 2004. Short term Caco-2/TC7 cell culture: Comparison between of conventional 21-d and a commercially available 3-d system. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1986–1992. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1986>
- Das, P., McDonald, J.A., Petrof, E.O., Allen-Vercoe, E., Walker, V.K., 2014. Nanosilver-Mediated Change in Human Intestinal Microbiota. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 05, 1000235. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000235>
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D., Hen, R., 2009. Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression. *Neuron* 62, 479–493. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.017>

- De Leersnyder, I., Rijckaert, H., De Gelder, L., Driessche, I. Van, Vermeir, P., Van Driessche, I., Vermeir, P., 2020. High variability in silver particle characteristics, silver concentrations, and production batches of commercially available products indicates the need for a more rigorous approach. *Nanomaterials* 10, 1–22. <https://doi.org/10.3390/nano10071394>
- De Lourdes Pinto, M., Robine-Léon, S., Appay, Kédinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B.D.-G., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Robine, S., Appay, M.-D., Assmann, P.F., Assman, P.F., Zweibaum, A., Pinto, L., Zwwibaum, A., Robin, S., Simon, P.M., Robinelocon, S., 1983. Enterocyte like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco 2 in culture.
- De Matteis, V., 2017. Exposure to inorganic nanoparticles: Routes of entry, immune response, biodistribution and in vitro/In vivo toxicity evaluation. *Toxics* 5. <https://doi.org/10.3390/toxics5040029>
- De Salegui, M., Plonska, H., 1969. Preparation and properties of porcine submaxillary mucins. *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 49–56. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(69\)90148-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(69)90148-9)
- Demaude, J., Salvador-Cartier, C., Fioramonti, J., Ferrier, L., Bueno, L., 2006. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: Implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 55, 655–661. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.078675>
- Demuyser, T., Deneyer, L., Bentea, E., Albertini, G., Van Liefferinge, J., Merckx, E., De Prins, A., De Bundel, D., Massie, A., Smolders, I., 2016. In-depth behavioral characterization of the corticosterone mouse model and the critical involvement of housing conditions. *Physiol. Behav.* 156, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.12.018>
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- Derrien, M., Alvarez, A.S., de Vos, W.M., 2019. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol.* 27, 997–1010. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>
- Derrien, M., van Passel, M.W.J., van de Bovenkamp, J.H.B., Schipper, R.G., de Vos, W.M., Dekker, J., 2010. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1, 254–268. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.4.12778>
- Derrien, M., Vaughan, E.E., Plugge, C.M., de Vos, W.M., 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1469–1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>
- DeSesso, J.M., Jacobson, C.F., 2001. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem. Toxicol.* 39, 209–228. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00136-8)
- Devriese, S., Van den Bossche, L., Van Welden, S., Holvoet, T., Pinheiro, I., Hindryckx, P., De Vos, M., Laukens, D., 2017. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochem. Cell Biol.* 148, 85–93. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1539-7>
- DiMarco, R.L., Hunt, D.R., Dewi, R.E., Heilshorn, S.C., 2017. Improvement of paracellular transport in the Caco-2 drug screening model using protein-engineered substrates.

Biomaterials 129, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.023>

- Ding, R., Yang, P., Yang, Y., Yang, Z., Luo, L., Li, H., Wang, Q., 2018. Characterisation of silver release from nanoparticle-treated baby products. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 35, 2052–2061. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1480064>
- Dolgaev, S.I., Simakin, A. V, Voronov, V. V, Shafeev, G.A., Bozon-Verduraz, F., 2002. Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment, in: *Applied Surface Science*. pp. 546–551. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(01\)00634-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-4332(01)00634-1)
- Donaldson, G.P., Melanie Lee, S., Mazmanian, S.K., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., Melanie Lee, S., Mazmanian, S.K., 2015. Gut biogeography of the bacterial microbiota, *Nature Reviews Microbiology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Doolette, C.L., McLaughlin, M.J., Kirby, J.K., Batstone, D.J., Harris, H.H., Ge, H., Cornelis, G., 2013. Transformation of PVP coated silver nanoparticles in a simulated wastewater treatment process and the effect on microbial communities. *Chem. Cent. J.* 7, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-46>
- Dorier, M., Béal, D., Marie-Desvergne, C., Dubosson, M., Barreau, F., Houdeau, E., Herlin-Boime, N., Carriere, M., 2017. Continuous in vitro exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology* 11, 751–761. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1349203>
- Dowsett, D., Wirtz, T., Yedra, L., 2017. HIM-SIMS: Correlative SE/Chemical Imaging at the Limits of Resolution. *Microsc. Microanal.* 23, 278–279. <https://doi.org/10.1017/s1431927617002070>
- Dupont, A., Kaconis, Y., Yang, I., Albers, T., Woltemate, S., Heinbockel, L., Andersson, M., Suerbaum, S., Brandenburg, K., Hornef, M.W., 2015. Intestinal mucus affinity and biological activity of an orally administered antibacterial and anti-inflammatory peptide. *Gut* 64, 222–232. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307150>
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M.B., Seabra, A.B., Fávaro, W.J., Nakazato, G., 2016. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12, 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
- Earley, H., Lennon, G., Balfe, Á., Coffey, J.C., Winter, D.C., O’Connell, P.R., 2019. The abundance of *Akkermansia muciniphila* and its relationship with sulphated colonic mucins in health and ulcerative colitis. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51878-3>
- Ebabe Elle, R., Gaillet, S., Vidé, J., Romain, C., Lauret, C., Rugani, N., Cristol, J.P., Rouanet, J.M., 2013. Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation. *Food Chem. Toxicol.* 60, 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.071>
- Echegoyen, Y., Nerín, C., 2013. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food Chem. Toxicol.* 62, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.014>
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora.

- Science 308, 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- EFSA, 2016. Scientific opinion on the re-evaluation of silver (E 174) as food additive. EFSA J. 14, 4364. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4364>
- Eichele, D.D., Kharbanda, K.K., 2017. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. World J. Gastroenterol. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6016>
- El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M., 2011. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. Environ. Sci. Technol. 45, 283–287. <https://doi.org/10.1021/es1034188>
- Elsharkawy, E.E., Abd El-Nasser, M., Kamaly, H.F., 2019. Silver nanoparticles testicular toxicity in rat. Environ. Toxicol. Pharmacol. 70, 103194. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103194>
- Enck, P., Merlin, V., Erckenbrecht, J.F., Wienbeck, M., 1989. Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. Gut 30, 455–459. <https://doi.org/10.1136/gut.30.4.455>
- Engle, M.J., Goetz, G.S., Alpers, D.H., 1998. Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. J. Cell. Physiol. 174, 362–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199803\)174:3<362::AID-JCP10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199803)174:3<362::AID-JCP10>3.0.CO;2-B)
- Environmental Protection Agency, 1991. Reference Dose for Chronic Oral Exposure of Silver. CASRN 7440-22-4.
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- European Union, 2002. Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the member states relating to food supplements, Official Journal L 183, 12/07/2002. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Farmen, E., Mikkelsen, H.N., Evensen, Einset, J., Heier, L.S., Rosseland, B.O., Salbu, B., Tollefsen, K.E., Oughton, D.H., 2012. Acute and sub-lethal effects in juvenile Atlantic salmon exposed to low µg/L concentrations of Ag nanoparticles. Aquat. Toxicol. 108, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.007>
- Farre, R., De Vos, R., Geboes, K., Verbecke, K., Berghe, P. V., Depoortere, I., Blondeau, K., Tack, J., Sifrim, D., 2007. Critical role of stress in increased oesophageal mucosa permeability and dilated intercellular spaces. Gut 56, 1191–1197. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.113688>
- Faust, J.J., Doudrick, K., Yang, Y., Westerhoff, P., Capco, D.G., 2014. Food grade titanium dioxide disrupts intestinal brush border microvilli in vitro independent of sedimentation. Cell Biol. Toxicol. 30, 169–188. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9278-1>
- FDA, 1999. Over-the-counter drug products containing colloidal silver ingredients or silver salts. Department of Health and Human Services (HHS), Public Health Service (PHS), Food and Drug Administration (FDA). Final rule. Fed. Regist. 64, 44653–44658.
- Fekri, K., Mohajjel, A., Sadigh-Eteghad, S., Kiarash Fekri, Nayebi, A.M., Sadigh-Eteghad, S.,

- Farajdokht, F., Mahmoudi, J., 2020. The Neurochemical Changes Involved in Immobilization Stress-Induced Anxiety and Depression: Roles for Oxidative Stress and Neuroinflammation. *Neurochem. J.* 14, 133–149. <https://doi.org/10.1134/s181971242002004x>
- Ferdous, Z., Nemmar, A., 2020. Health impact of silver nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure, *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21072375>
- Fihn, B., Sjöqvist, A., Jodal, M., 2000. Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: Effects of glucose transport. *Gastroenterology* 119, 1029–1036. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18148>
- Fink, G., 2010. Stress: definition and history. *Stress Sci. Neuroendocrinol.* 3–9.
- Fizeşan, I., Cambier, S., Moschini, E., Chary, A., Nelissen, I., Ziebel, J., Audinot, J.N., Wirtz, T., Kruszewski, M., Pop, A., Kiss, B., Serchi, T., Loghin, F., Gutleb, A.C., 2019. In vitro exposure of a 3D-tetraculture representative for the alveolar barrier at the air-liquid interface to silver particles and nanowires. Part. *Fibre Toxicol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0297-1>
- Fondevila, M., Herrer, R., Casallas, M.C., Abecia, L., Duchá, J.J., 2009. Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.09.003>
- Ford, A.C., Forman, D., Bailey, A.G., Axon, A.T.R., Moayyedi, P., 2008. Irritable bowel syndrome: A 10-yr natural history of symptoms and factors that influence consultation behavior. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1229–1239. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01740.x>
- Fujiwara, K., Sotiriou, G.A., Pratsinis, S.E., 2015. Enhanced Ag⁺ ion release from aqueous nanosilver suspensions by absorption of ambient CO₂. *Langmuir* 31, 5284–5290. <https://doi.org/10.1021/la504946g>
- Galipeau, H.J., Verdu, E.F., 2016. The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science. *Neurogastroenterol. Motil.* 28, 957–965. <https://doi.org/10.1111/nmo.12871>
- Galley, J.D., Yu, Z., Kumar, P., Dowd, S.E., Lyte, M., Bailey, M.T., 2014. The structures of the colonic mucosa-associated and luminal microbial communities are distinct and differentially affected by a prolonged murine stressor. *Gut Microbes* 5, 748–760. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.972241>
- Gan, J., Sun, J., Chang, X., Li, W., Li, J., Niu, S., Kong, L., Zhang, T., Wu, T., Tang, M., Xue, Y., 2020. Biodistribution and organ oxidative damage following 28 days oral administration of nanosilver with/without coating in mice. *J. Appl. Toxicol.* 40, 815–831. <https://doi.org/10.1002/jat.3946>
- García-Rodríguez, A., Vila, L., Cortés, C., Hernández, A., Marcos, R., 2018. Exploring the usefulness of the complex in vitro intestinal epithelial model Caco-2/HT29/Raji-B in nanotoxicology. *Food Chem. Toxicol.* 113, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.042>
- Garcia, T., Lafuente, D., Blanco, J., Sánchez, D.J., Sirvent, J.J., Domingo, J.L., Gómez, M., 2016. Oral subchronic exposure to silver nanoparticles in rats. *Food Chem. Toxicol.* 92,

177–187. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.010>

- Garuglieri, E., Meroni, E., Cattò, C., Villa, F., Cappitelli, F., Erba, D., 2018. Effects of Sub-lethal Concentrations of Silver Nanoparticles on a Simulated Intestinal Prokaryotic–Eukaryotic Interface. *Front. Microbiol.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02698>
- Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., Parent, M., 2018. Glutathione: Antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>
- Geladi, P., Davies, T., 2002. Book Reviews: A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification, An Academic Addition to the NIR Bookshelf A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification Tormod NæsIsakssonTomasFearnTomDaviesTonyNIR Publications, Ch. NIR news 13, 12–13. <https://doi.org/10.1255/nirn.658>
- Georgantzopoulou, A., Serchi, T., Cambier, S., Leclercq, C.C., Renaut, J., Shao, J., Kruszewski, M., Lentzen, E., Grysan, P., Eswara, S., Audinot, J.N., Contal, S., Ziebel, J., Guignard, C., Hoffmann, L., Murk, A.T.J., Gutleb, A.C., 2016. Effects of silver nanoparticles and ions on a co-culture model for the gastrointestinal epithelium. Part. *Fibre Toxicol.* 13, 9. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0117-9>
- Gerbe, F., Legraverend, C., Jay, P., 2012. The intestinal epithelium tuft cells: Specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0984-7>
- Ghaeli, I., Hosseinidoust, Z., Zolfagharnasab, H., Jorge Monteiro, F., 2017. A New Label-Free Technique for Analysing Evaporation Induced Self-Assembly of Viral Nanoparticles Based on Enhanced Dark-Field Optical Imaging. *Nanomaterials* 8, 1. <https://doi.org/10.3390/nano8010001>
- Gibson, R.S., Scythes, C.A., 1984. Chromium, selenium, and other trace element intakes of a selected sample of Canadian premenopausal women. *Biol. Trace Elem. Res.* 6, 105–116. <https://doi.org/10.1007/BF02916928>
- Gill, R.K., Saksena, S., Alrefai, W.A., Sarwar, Z., Goldstein, J.L., Carroll, R.E., Ramaswamy, K., Dudeja, P.K., 2005. Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 289, 846–852. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00112.2005>
- Gillois, K., Lévêque, M., Théodorou, V., Robert, H., Mercier-Bonin, M., 2018. Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives. *Microorganisms* 6, 53. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020053>
- Gillois, K., Stoffels, C., Lévêque, M., Fourquaux, I., Blesson, J., Mils, V., Cambier, S., Vignard, J., Terrisse, H., Mirey, G., Audinot, J.-N.J.-N., Théodorou, V., Ropers, M.-H.M.-H., Robert, H., Mercier-Bonin, M., 2020. Repeated exposure of Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX intestinal cell models to (nano)silver in vitro: Comparison of two commercially available colloidal silver products. *Sci. Total Environ.* 754, 142324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142324>
- Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R., 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2802–2813. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2802-2813.1997>

- Gordon, O., Slenters, T.V., Brunetto, P.S., Villaruz, A.E., Sturdevant, D.E., Otto, M., Landmann, R., Fromm, K.M., 2010. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: Thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4208–4218. <https://doi.org/10.1128/AAC.01830-09>
- Grassart, A., Malardé, V., Gobba, S., Sartori-Rupp, A., Kerns, J., Karalis, K., Marteyn, B., Sansonetti, P., Sauvonnet, N., 2019. Bioengineered Human Organ-on-Chip Reveals Intestinal Microenvironment and Mechanical Forces Impacting Shigella Infection. *Cell Host Microbe* 26, 435–444.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.007>
- Graziani, F., Pujol, A., Nicoletti, C., Dou, S., Maresca, M., Giardina, T., Fons, M., Perrier, J., 2016. Ruminococcus gnavus E1 modulates mucin expression and intestinal glycosylation. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1403–1417. <https://doi.org/10.1111/jam.13095>
- Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M., Köller, M., 2011. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 7, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.003>
- Gribble, F.M., Reimann, F., 2019. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 226–237. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8>
- Group, E.A., 2007. ICP-OES and ICP-MS Detection Limit Guidance Detection limits of various elements in ICP-OES an.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M., 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.* 30, 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>
- Gui, X., Carraway, R.E., Dobner, P.R., 2004. Endogenous neurotensin facilitates visceral nociception and is required for stress-induced antinociception in mice and rats. *Neuroscience* 126, 1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.034>
- Gulbranson, S.H., Hud, J.A., Hansen, R.C., 2000. Argyria following the use of dietary supplements containing colloidal silver protein. *Cutis* 66, 373.
- Hadrup, N., Gao, X., Lam, H.R., Loeschner, K., Vogel, U., Bergström, A., Frandsen, H.L., Mortensen, A., Wilcks, A., Larsen, E.H., 2012. Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 543–551. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0759-1>
- Hagendorfer, H., Kaegi, R., Parlinska, M., Sinnet, B., Ludwig, C., Ulrich, A., 2012. Characterization of silver nanoparticle products using asymmetric flow field flow fractionation with a multidetector approach - A comparison to transmission electron microscopy and batch dynamic light scattering. *Anal. Chem.* 84, 2678–2685. <https://doi.org/10.1021/ac202641d>
- Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I.R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J., Mahmoudi, M., 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 30, 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
- Halder, S.L.S., Locke, G.R., Schleck, C.D., Zinsmeister, A.R., Melton, L.J., Talley, N.J., 2007. Natural History of Functional Gastrointestinal Disorders: A 12-year Longitudinal

- Hall, A.B., Yassour, M., Sauk, J., Garner, A., Jiang, X., Arthur, T., Lagoudas, G.K., Vatanen, T., Fornelos, N., Wilson, R., Bertha, M., Cohen, M., Garber, J., Khalili, H., Gevers, D., Ananthakrishnan, A.N., Kugathasan, S., Lander, E.S., Blainey, P., Vlamakis, H., Xavier, R.J., Huttenhower, C., 2017. A novel *Ruminococcus gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Med.* 9. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0490-5>
- Hallen-Adams, H.E., Suhr, M.J., 2017. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. Virulence. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1247140>
- Hamilton, E.I., Minski, M.J., 1973. Abundance of the chemical elements in man's diet and possible relations with environmental factors. *Sci. Total Environ.* 1, 375–394. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(73\)90025-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(73)90025-9)
- Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., Jeger, M.J., Knutsen, H.K., More, S., Naegeli, H., Noteborn, H., Ockleford, C., Ricci, A., Rychen, G., Schlatter, J.R., Silano, V., Solecki, R., Turck, D., Younes, M., Chaudhry, Q., Cubadda, F., Gott, D., Oomen, A., Weigel, S., Karamitrou, M., Schoonjans, R., Mortensen, A., Scientific Committee, E., Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., John Jeger, M., Katrine Knutsen, H., More, S., Naegeli, H., Noteborn, H., Ockleford, C., Ricci, A., Rychen, G., Schlatter, J.R., Silano, V., Solecki, R., Turck, D., Younes, M., Chaudhry, Q., Cubadda, F., Gott, D., Oomen, A., Weigel, S., Karamitrou, M., Schoonjans, R., Mortensen, A., Franz, R., Powell, J., De Maglie, M., Kardassi, D., Tiramani, E., Vittoria Vettori, M., Eryasa, B., 2018. Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health Scientific Committee members. *EFSA J.* 16, 5327. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5327>
- Haskel, Lord, Warner, Lord, Mitchell, Lord, 2010. and Food Volume I : Report. *Sci. Technol.* I.
- Helander, H.F., Fändriks, L., 2014. Surface area of the digestive tract-revisited. *Scand. J. Gastroenterol.* 49, 681–689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Hemmings, S.M.J., Malan-Müller, S., van den Heuvel, L.L., Demmitt, B.A., Stanislawski, M.A., Smith, D.G., Bohr, A.D., Stamper, C.E., Hyde, E.R., Morton, J.T., Marotz, C.A., Siebler, P.H., Braspenning, M., Van Criekinge, W., Hoisington, A.J., Brenner, L.A., Postolache, T.T., McQueen, M.B., Krauter, K.S., Knight, R., Seedat, S., Lowry, C.A., 2017. The Microbiome in Posttraumatic Stress Disorder and Trauma-Exposed Controls: An Exploratory Study. *Psychosom. Med.* 79.
- Hendrickson, O.D., Klochkov, S.G., Novikova, O. V., Bravova, I.M., Shevtsova, E.F., Safenkova, I. V., Zherdev, A. V., Bachurin, S.O., Dzantiev, B.B., 2016. Toxicity of nanosilver in intragastric studies: Biodistribution and metabolic effects. *Toxicol. Lett.* 241, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.11.018>
- Hershberg, R.M., Mayer, L.F., 2000. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - Polarity and complexity. *Immunol. Today.* [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01575-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01575-3)
- Heyman, M., Grasset, E., Ducroc, R., Desjeux, J.F., 1988. Antigen absorption by the jejunal epithelium of children with cow's milk allergy. *Pediatr. Res.* 24, 197–202.

<https://doi.org/10.1203/00006450-198808000-00012>

- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736–749. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)90897-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)90897-4)
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C.G., Lipka, E., Amidon, G.L., Langguth, P., 2000. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J. Pharm. Sci.* 89, 63–75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200001\)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6)
- Hong, J.S., Kim, S., Lee, S.H., Jo, E., Lee, B., Yoon, J., Eom, I.C., Kim, H.M., Kim, P., Choi, K., Lee, M.Y., Seo, Y.R., Kim, Y., Lee, Y., Choi, J., Park, K., 2014. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology* 8, 349–362. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.780108>
- Hong, S., Zheng, G., Wu, X., Snider, N.T., Owyang, C., Wiley, J.W., 2011. Corticosterone mediates reciprocal changes in CB 1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology* 140, 627–637.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.003>
- Huang, D., Liao, F., Moles, S., Redinger, D., Subramanian, V., 2003. Plastic-Compatible Low Resistance Printable Gold Nanoparticle Conductors for Flexible Electronics. *J. Electrochem. Soc.* 150, G412. <https://doi.org/10.1149/1.1582466>
- Huang, J.Y., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., 2011. The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. *Anaerobe* 17, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.017>
- Huseyin, C.E., O'Toole, P.W., Cotter, P.D., Scanlan, P.D., 2017. Forgotten fungi-the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw047>
- Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., Calabrese, E.J., 2018. Nanoparticle exposure and hormetic dose-responses: An update. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030805>
- Ijssennagger, N., van der Meer, R., van Mil, S.W.C., 2016. Sulfide as a Mucus Barrier-Breaker in Inflammatory Bowel Disease? *Trends Mol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.002>
- Ilchmann-Diounou, H., Menard, S., 2020. Psychological Stress, Intestinal Barrier Dysfunctions, and Autoimmune Disorders: An Overview. *Front. Immunol.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01823>
- Imai, S., Morishita, Y., Hata, T., Kondoh, M., Yagi, K., Gao, J.Q., Nagano, K., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., 2017. Cellular internalization, transcellular transport, and cellular effects of silver nanoparticles in polarized Caco-2 cells following apical or basolateral exposure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 484, 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.114>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V, Zolfaghari, B., 2014. Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. *Res. Pharm. Sci.* 9, 385–406.
- Izak-Nau, E., Huk, A., Reidy, B., Uggerud, H., Vadset, M., Eiden, S., Voetz, M., Himly, M., Duschl, A., Dusinska, M., Lynch, I., 2015. Impact of storage conditions and storage time

- on silver nanoparticles' physicochemical properties and implications for their biological effects. *RSC Adv.* 5, 84172–84185. <https://doi.org/10.1039/c5ra10187e>
- Jakobsson, H.E., Abrahamsson, T.R., Jenmalm, M.C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., Andersson, A.F., 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* 63, 559–566. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303249>
- Jakobsson, H.E., Rodríguez-Piñero, A.M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G.C., Johansson, M.E., 2015. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* 16, 164–177. <https://doi.org/10.15252/embr.201439263>
- Jana, J., Ganguly, M., Pal, T., 2016. Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. *RSC Adv.* 6, 86174–86211. <https://doi.org/10.1039/c6ra14173k>
- Janković, N.Z., Plata, D.L., 2019. Engineered nanomaterials in the context of global element cycles. *Environ. Sci. Nano* 6, 2697–2711. <https://doi.org/10.1039/c9en00322c>
- Janssens, K.A.M., Zijlema, W.L., Joustra, M.L., Rosmalen, J.G.M., 2015. Mood and anxiety disorders in chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and irritable bowel syndrome: Results from the LifeLines cohort study. *Psychosom. Med.* 77, 449–457. <https://doi.org/10.1097/PSY.000000000000161>
- Javurek, A.B., Suresh, D., Spollen, W.G., Hart, M.L., Hansen, S.A., Eilersieck, M.R., Bivens, N.J., Givan, S.A., Upendran, A., Kannan, R., Rosenfeld, C.S., 2017. Gut dysbiosis and neurobehavioral alterations in rats exposed to silver nanoparticles. *Sci. Rep.* 7, 2822. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02880-0>
- Jawhara, S., Thuru, X., Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Mordon, S., Sendid, B., Desreumaux, P., Poulain, D., 2008. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J. Infect. Dis.* 197, 972–980. <https://doi.org/10.1086/528990>
- Jean, J., Sirot, V., Hulin, M., Le Calvez, E., Zinck, J., Noël, L., Vasseur, P., Nessler, F., Gorecki, S., Guérin, T., Rivière, G., 2018. Dietary exposure to cadmium and health risk assessment in children – Results of the French infant total diet study. *Food Chem. Toxicol.* 115, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.031>
- Jeanmonod, D.J., Rebecca, Suzuki, K. et al., Hrabovsky, M., Mariana Furio Franco Bernardes, M.P., Lilian Cristina Pereira and Daniel Junqueira Dorta, 2018. in *Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages*. Intech open 2, 64. <https://doi.org/10.5772/32009>
- Jeong, G.N., Jo, U.B., Ryu, H.Y., Kim, Y.S., Song, K.S., Yu, I.J., 2010. Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Arch. Toxicol.* 84, 63–69. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0469-0>
- Jesmin, R., Chanda, A., 2020. Restricting mycotoxins without killing the producers: a new paradigm in nano-fungal interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10373-w>
- Jimaré Benito, M.T., Bosch Ojeda, C., Sanchez Rojas, F., 2008. *Process Analytical Chemistry: Applications of Near Infrared Spectrometry in Environmental and Food Analysis: An*

- Jin, Y., Wu, S., Zeng, Z., Fu, Z., 2017. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. *Environ. Pollut.* <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.045>
- Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2016. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>
- Johansson, M.E.V., Jakobsson, H.E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F., Hansson, G.C., 2015. Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell Host Microbe* 18, 582–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.007>
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., Hansson, G.C., 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- Johansson, M.E. V, Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C., 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Joly, C., Gay-Quéheillard, J., Léké, A., Chardon, K., Delanaud, S., Bach, V., Khorsi-Cauet, H., 2013. Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) and in the rat. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2726–2734. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1283-4>
- Juge, N., 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.10.001>
- Juling, S., Bachler, G., von Götz, N., Lichtenstein, D., Böhmert, L., Niedzwiecka, A., Selve, S., Braeuning, A., Lampen, A., 2016. In vivo distribution of nanosilver in the rat: The role of ions and de novo-formed secondary particles. *Food Chem. Toxicol.* 97, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.016>
- Juling, S., Niedzwiecka, A., Böhmert, L., Lichtenstein, D., Selve, S., Braeuning, A., Thünemann, A.F., Krause, E., Lampen, A., 2017. Protein Corona Analysis of Silver Nanoparticles Links to Their Cellular Effects. *J. Proteome Res.* 16, 4020–4034. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00412>
- Jung, I., Joo, E.J., Suh, B.S., Ham, C.B., Han, J.M., Kim, Y.G., Yeom, J.S., Choi, J.Y., Park, J.H., 2017. A case of generalized argyria presenting with muscle weakness. *Ann. Occup. Environ. Med.* 29, 45. <https://doi.org/10.1186/s40557-017-0201-0>
- Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H., Park, Y.H., Woo, K.J., Hye, C.K., Ki, W.K., Shin, S., So, H.K., Yong, H.P., 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2171–2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>
- Kabeerdoss, J., Jayakanthan, P., Pugazhendhi, S., Ramakrishna, B.S., 2015. Alterations of mucosal microbiota in the colon of patients with inflammatory bowel disease revealed by real time polymerase chain reaction amplification of 16S ribosomal ribonucleic acid. *Indian J. Med. Res.* 142, 23–32. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.162091>
- Kamphuis, J.B.J., Mercier-Bonin, M., Eutamène, H., Théodorou, V., 2017. Mucus organisation is shaped by colonic content; A new view. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598->

- Kango, S., Kalia, S., Celli, A., Njuguna, J., Habibi, Y., Kumar, R., 2013. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic-inorganic nanocomposites - A review. *Prog. Polym. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.003>
- Kaoutari, A. El, Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B., 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
- Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., Scholl, W., Zhang, C., Rickner, H., Richmond, C.A., Li, H., Breault, D.T., Ingber, D.E., 2018. Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci. Rep.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21201-7>
- Kästner, C., Lichtenstein, D., Lampen, A., Thünemann, A.F., 2017. Monitoring the fate of small silver nanoparticles during artificial digestion. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 526, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.08.013>
- Kędziora, A., Speruda, M., Krzyżewska, E., Rybka, J., Łukowiak, A., Bugla-Płoskońska, G., 2018. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19020444>
- Kim, I., Lee, B.T., Kim, H.A., Kim, K.W., Kim, S.D., Hwang, Y.S., 2016. Citrate coated silver nanoparticles change heavy metal toxicities and bioaccumulation of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 143, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.046>
- Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Yu, I.J., 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 20, 575–583. <https://doi.org/10.1080/08958370701874663>
- Kim, Y.S., Song, M.Y., Park, J.D., Song, K.S., Ryu, H.R., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Oh, K.H., Kelman, B.J., Hwang, I.K., Yu, I.J., 2010. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 7. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-20>
- Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., Epple, M., 2010. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem. Mater.* 22, 4548–4554. <https://doi.org/10.1021/cm100023p>
- Köljalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F.S., Bahram, M., Bates, S.T., Bruns, T.D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T.M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G.W., Hartmann, M., Kirk, P.M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B.D., Lücking, R., Martín, M.P., Matheny, P.B., Nguyen, N.H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K.G., Peintner, U., Peterson, M., Pöldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schübler, A., Scott, J.A., Senés, C., Smith, M.E., Suija, A., Taylor, D.L., Telleria, M.T., Weiss, M., Larsson, K.H., 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/mec.12481>
- Kong, F., Singh, R.P., 2008. Disintegration of solid foods in human stomach. *J. Food Sci.* 73, 67–80. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>
- Koppel, N., Rekdal, V.M., Balskus, E.P., 2017. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science* (80-.). <https://doi.org/10.1126/science.aag2770>

- Krug, H.F., Wick, P., 2011. Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50, 1260–1278. <https://doi.org/10.1002/anie.201001037>
- Kruszewski, M., Gradzka, I., Bartłomiejczyk, T., Chwastowska, J., Sommer, S., Grzelak, A., Zuberek, M., Lankoff, A., Dusinska, M., Wojewódzka, M., 2013. Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 219, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.03.006>
- Lackner, J.M., Brasel, A.M., Quigley, B.M., Keefer, L., Krasner, S.S., Powell, C., Katz, L.A., Sitrin, M.D., 2010. The ties that bind: Perceived social support, stress, and IBS in severely affected patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 893–900. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01516.x>
- Laloux, L., Kastrati, D., Cambier, S., Gutleb, A.C., Schneider, Y.J., 2020. The Food Matrix and the Gastrointestinal Fluids Alter the Features of Silver Nanoparticles. *Small* 16, 1–11. <https://doi.org/10.1002/sml.201907687>
- Larese Filon, F., Mauro, M., Adami, G., Bovenzi, M., Crosera, M., 2015. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.05.005>
- Larhed, A.W., Artursson, P., Björk, E., 1998. The influence of intestinal mucus components on the diffusion of drugs. *Pharm. Res.* 15, 66–71. <https://doi.org/10.1023/A:1011948703571>
- Laukoetter, M.G., Bruwer, M., Nusrat, A., 2006. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22, 85–89. <https://doi.org/10.1097/01.mog.0000203864.48255.4f>
- Lee, A.R., Lee, S.J., Lee, M., Nam, M., Lee, S., Choi, J., Lee, H.J., Kim, D.U., Hoe, K.L., 2018. A genome-wide screening of target genes against silver nanoparticles in fission yeast. *Toxicol. Sci.* 161, 171–185. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx208>
- Lee, J.H., Mun, J., Park, J.D., Yu, I.J., 2012. A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials. *Nanotoxicology* 6, 667–669. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.600840>
- Lee, J.Y., Kim, N., Kim, Y.S., Nam, R.H., Ham, M.H., Lee, H.S., Jo, W., Shim, Y., Choi, Y.J., Yoon, H., Shin, C.M., Lee, D.H., 2016. Repeated water avoidance stress alters mucosal mast cell counts, interleukin-1 β levels with sex differences in the distal colon of wistar rats. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 22, 694–704. <https://doi.org/10.5056/jnm16007>
- Lem, K.W., Choudhury, A., A. Lakhani, A., Kuyate, P., R. Haw, J., S. Lee, D., Iqbal, Z., J. Brumlik, C., 2011. Use of Nanosilver in Consumer Products. *Recent Pat. Nanotechnol.* 6, 60–72. <https://doi.org/10.2174/187221012798109318>
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A., 1990. Growth Adaptation to Methotrexate of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells Is Associated with Their Ability to Differentiate into Columnar Absorptive and Mucus-secreting Cells. *Cancer Res.* 50, 6334–6343.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D., Gum, J.R., Kim, Y.S., Real, F.X., Zweibaum, A., 1993. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J. Cell Sci.* 106, 771–783.
- Leteurtre, E., Gouyer, V., Rousseau, K., Moreau, O., Barbat, A., Swallow, D., Huet, G.,

- Lesuffleur, T., 2004. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biol. Cell* 96, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2003.12.005>
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>
- Li, H., Gao, Y., Li, C., Ma, G., Shang, Y., Sun, Y., 2016. A comparative study of the antibacterial mechanisms of silver ion and silver nanoparticles by Fourier transform infrared spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 85, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.04.007>
- Li, X., Zhang, L., Zhang, Y., Wang, D., Wang, X., Yu, L., Zhang, W., Li, P., 2020. Review of NIR spectroscopy methods for nondestructive quality analysis of oilseeds and edible oils. *Trends Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.002>
- Liao, X., Yang, F., Li, H., So, P.-K., Yao, Z., Xia, W., Sun, H., 2017. Targeting the Thioredoxin Reductase–Thioredoxin System from *Staphylococcus aureus* by Silver Ions. *Inorg. Chem.* 56, 14823–14830. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01904>
- Lichtenstein, D., Ebmeyer, J., Knappe, P., Juling, S., Böhmert, L., Selve, S., Niemann, B., Braeuning, A., Thünemann, A.F., Lampen, A., 2015. Impact of food components during in vitro digestion of silver nanoparticles on cellular uptake and cytotoxicity in intestinal cells. *Biol. Chem.* 396, 1255–1264. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0145>
- Liu, J., Wang, Z., Liu, F.D., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2012. Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Environments. *ACS Nano* 6, 9887–9899. <https://doi.org/10.1021/nn303449n>
- Liu, W., Worms, I.A.M., Herlin-Boime, N., Truffier-Boutry, D., Michaud-Soret, I., Mintz, E., Vidaud, C., Rollin-Genetet, F., 2017. Interaction of silver nanoparticles with metallothionein and ceruloplasmin: Impact on metal substitution by Ag(i), corona formation and enzymatic activity. *Nanoscale* 9, 6581–6594. <https://doi.org/10.1039/c7nr01075c>
- Loeschner, K., Hadrup, N., Qvortrup, K., Larsen, A., Gao, X., Vogel, U., Mortensen, A., Lam, H.R., Larsen, E.H., 2011. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part. Fibre Toxicol.* 8, 18. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-18>
- Lok, C.N., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H., Tam, P.K.H., Chiu, J.F., Che, C.M., 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* 5, 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
- Lopez-Siles, M., Enrich-Capó, N., Aldeguer, X., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Garcia-Gil, L.J., Martinez-Medina, M., 2018. Alterations in the Abundance and Co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 281. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00281>
- Lovell, R.M., Ford, A.C., 2012. Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 712–721.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.02.029>

- Lozoya-Agullo, I., Araújo, F., González-Álvarez, I., Merino-Sanjuán, M., González-Álvarez, M., Bermejo, M., Sarmiento, B., 2017. Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B coculture models to predict intestinal and colonic permeability compared to Caco-2 monoculture. *Mol. Pharm.* 14, 1264–1270. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lu, K., Mahbub, R., Fox, J.G., 2015. Xenobiotics: Interaction with the intestinal microflora. *ILAR J.* 56, 218–227. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv018>
- Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., Chen, R., 2013. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 1465–1471. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4894-5>
- Luo, B., Xiang, D., Nieman, D.C., Chen, P., 2014. The effects of moderate exercise on chronic stress-induced intestinal barrier dysfunction and antimicrobial defense. *Brain. Behav. Immun., Exercise {Immunology} in {Health} and {Disease}* 39, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.013>
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Ma, T.Y., Iwamoto, G.K., Hoa, N.T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M.A., Said, H.M., 2004. TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 286. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00173.2003>
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., Mahajan, A., 2013. Microfold (M) cells: Important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* <https://doi.org/10.1038/mi.2013.30>
- MacKenzie, D.A., Jeffers, F., Parker, M.L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R.J., Roos, S., Walter, J., Juge, N., 2010. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* 156, 3368–3378. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043265-0>
- Mafuné, F., Kohno, J.Y., Takeda, Y., Kondow, T., Sawabe, H., Mafuné Fumitaka, Kohno, J.Y., Takeda, Y., Kondow, T., Sawabe, H., 2000. Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation. *J. Phys. Chem. B* 104, 8333–8337. <https://doi.org/10.1021/jp001803b>
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., Dusinska, M., 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology.* <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464>
- Maher, S., Mrsny, R.J., Brayden, D.J., 2016. Intestinal permeation enhancers for oral peptide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 106, 277–319. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.005>
- Mainard, M., Jacob, D., 2016. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques* 1827, 40–44. <https://doi.org/10.1051/photon/20168340>
- Maneewattanapinyo, P., Banlunara, W., Thammacharoen, C., Ekgasit, S., Kaewamatawong, T.,

2011. An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1417–1423. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0038>
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., Dore, J., 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
- Mao, B.H., Tsai, J.C., Chen, C.W., Yan, S.J., Wang, Y.J., 2016. Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology* 10, 1021–1040. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1189614>
- Marin, I.A., Goertz, J.E., Ren, T., Rich, S.S., Onengut-Gumuscu, S., Farber, E., Wu, M., Overall, C.C., Kipnis, J., Gaultier, A., 2017. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep43859>
- Marín, S., Pardo, O., Báguena, R., Font, G., Yusà, V., 2017. Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the region of Valencia, Spain: a total diet study. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 34, 228–240. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1268273>
- Markov, A.G., Veshnyakova, A., Fromm, M., Amasheh, M., Amasheh, S., 2010. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 180, 591–598. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0440-7>
- Martirosyan, A., Bazes, A., Schneider, Y.J., 2014. In vitro toxicity assessment of silver nanoparticles in the presence of phenolic compounds-preventive agents against the harmful effect? *Nanotoxicology* 8, 573–582. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.812258>
- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H., 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 265–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>
- Meddings, J.B., Swain, M.G., 2000. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 119, 1019–1028. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18152>
- Medici, S., Peana, M., Nurchi, V.M., Zoroddu, M.A., 2019. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *J. Med. Chem.* 62, 5923–5943. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01439>
- Mehennaoui, K., Cambier, S., Serchi, T., Ziebel, J., Lentzen, E., Valle, N., Guérold, F., Thomann, J.S., Giamberini, L., Gutleb, A.C., 2018. Do the pristine physico-chemical properties of silver and gold nanoparticles influence uptake and molecular effects on *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda)? *Sci. Total Environ.* 643, 1200–1215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.208>
- Mello, D.F., Trevisan, R., Rivera, N., Geitner, N.K., Di Giulio, R.T., Wiesner, M.R., Hsu-Kim, H., Meyer, J.N., 2020. Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 315. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108868>
- Ménard, O., Dupont, D., 2014. Atouts et limites des modèles de digestion gastro-intestinale :

de l'in vitro à l'in vivo. *Innov. Agron.* 36, 27–41.

- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2010. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* <https://doi.org/10.1038/mi.2010.5>
- Mendonça, M.C.P., Ferreira, L.B., Rizoli, C., Batista, Â.G., Maróstica Júnior, M.R., da Silva, E. do N., Cadore, S., Durán, N., Cruz-Höfling, M.A. da, de Jesus, M.B., 2019. N-Acetylcysteine reverses silver nanoparticle intoxication in rats. *Nanotoxicology* 13, 326–338. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1544302>
- Mercier-Bonin, M., Despax, B., Raynaud, P., Houdeau, E., Thomas, M., 2018. Mucus and microbiota as emerging players in gut nanotoxicology: The example of dietary silver and titanium dioxide nanoparticles. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1243088>
- Mercier-Bonin, M., Despax, B., Raynaud, P., Houdeau, E., Thomas, M., 2016. Exposition orale et devenir dans l'intestin des nanoparticules alimentaires : exemple de l'argent et du dioxyde de titane. *Cah. Nutr. Diet.* 51, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2016.03.001>
- Mermet, J.-M., 1999. Couplage plasma induit par haute fréquence-spectrométrie de masse.
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.G., Midtvedt, T., Pütsep, K., Andersson, M., 2008. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 57, 764–771. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.141481>
- Michielan, A., D'Inca, R., 2015. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm.* 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/628157>
- Mönnikes, H., Schmidt, B.G., Taché, Y., 1993. Psychological stress-induced accelerated colonic transit in rats involves hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology* 104, 716–723. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)91006-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)91006-4)
- Moussaoui, N., Braniste, V., Ait-Belgnaoui, A., Gabanou, M., Sekkal, S., Olier, M., Théodorou, V., Martin, P.G.P., Houdeau, E., 2014. Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial barrier defect in maternal-deprived rats. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088382>
- Mudie, D.M., Amidon, G.L., Amidon, G.E., 2010. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. *Mol. Pharm.* <https://doi.org/10.1021/mp100149j>
- Munckt, A., Guyre, P.M., Holbrooke, N.J., 1984. Physiological Functions of Glucocorticoids in Stress and Their Relation to Pharmacological Actions: *Endocrine Reviews: Vol 5, No 1* 5, 25–44.
- Munger, M.A., Radwanski, P., Hadlock, G.C., Stoddard, G., Shaaban, A., Falconer, J., Grainger, D.W., Deering-Rice, C.E., 2014. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.06.010>
- Murty, V.L.N., Sarosiek, J., Slomiany, A., Slomiany, B.L., 1984. Effect of lipids and proteins on the viscosity of gastric mucus glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 521–529. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90213-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90213-4)
- Nair, A., Jacob, S., 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and

- human. *J. Basic Clin. Pharm.* 7, 27. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Narciso, L., Coppola, L., Lori, G., Andreoli, C., Zjino, A., Bocca, B., Petrucci, F., Di Virgilio, A., Martinelli, A., Tinari, A., Maranghi, F., Tassinari, R., 2020. Genotoxicity, biodistribution and toxic effects of silver nanoparticles after in vivo acute oral administration. *NanoImpact* 18. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100221>
- Nash, A.K., Auchtung, T.A., Wong, M.C., Smith, D.P., Gesell, J.R., Ross, M.C., Stewart, C.J., Metcalf, G.A., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Ajami, N.J., Petrosino, J.F., 2017. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 5, 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
- Nguyen, K.C., Richards, L., Massarsky, A., Moon, T.W., Tayabali, A.F., 2016. Toxicological evaluation of representative silver nanoparticles in macrophages and epithelial cells. *Toxicol. Vitro* 33, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.03.004>
- Nguyen, K.C., Seligy, V.L., Massarsky, A., Moon, T.W., Rippstein, P., Tan, J., Tayabali, A.F., 2013. Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles, in: *Journal of Physics: Conference Series*. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/429/1/012025>
- Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J., 2015. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *DMM Dis. Model. Mech.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>
- Niess, J.H., Reinecker, H.C., 2006. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cell. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00694.x>
- Nishino, K., Nishida, A., Inoue, R., Kawada, Y., Ohno, M., Sakai, S., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M., Kawahara, M., Naito, Y., Andoh, A., 2018. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 53, 95–106. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1384-4>
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A., 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Ong, B.Y., Palahniuk, R.J., Cumming, M., 1978. Gastric volume and pH in out-patients. *Can. Anaesth. Soc. J.* 25, 36–39. <https://doi.org/10.1007/BF03006781>
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U.R., Timmis, K.N., Schreiber, S., 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685–693. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.025403>
- Owen, C.D., Tailford, L.E., Monaco, S., Šuligoj, T., Vaux, L., Lallement, R., Khedri, Z., Yu, H., Lecointe, K., Walshaw, J., Tribolo, S., Horrex, M., Bell, A., Chen, X., Taylor, G.L., Varki, A., Angulo, J., Juge, N., 2017. Unravelling the specificity and mechanism of sialic acid recognition by the gut symbiont *Ruminococcus gnavus*. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02109-8>
- Pan, F., Han, L., Zhang, Y., Yu, Y., Liu, J., 2015. Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66, 680–685.

<https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077792>

- Pardha-Saradhi, P., Yamal, G., Peddisetty, T., Sharmila, P., Nagar, S., Singh, J., Nagarajan, R., Rao, K.S., 2014. Reducing strength prevailing at root surface of plants promotes reduction of Ag⁺ and generation of Ag⁰/Ag₂O nanoparticles exogenously in aqueous phase. *PLoS One* 9, 106715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106715>
- Park, E.J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Lee, S.H., Yoon, J., Lee, B.C., Park, K., 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.05.004>
- Park, J., Kwak, B.K., Bae, E., Lee, J., Kim, Y., Choi, K., Yi, J., 2009. Characterization of exposure to silver nanoparticles in a manufacturing facility. *J. Nanoparticle Res.* 11, 1705–1712. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9725-8>
- Park, K., Park, E.J., Chun, I.K., Choi, K., Lee, S.H., Yoon, J., Lee, B.C., 2011. Bioavailability and Toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Arch. Pharm. Res.* 34, 153–158. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0118-z>
- Pate, K., Safier, P., 2016. Chemical metrology methods for CMP quality. *Adv. Chem. Mech. Planarization* 1–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100165-3.00012-7>
- Peters, R., Brandhoff, P., Weigel, S., Marvin, H., Bouwmeester, H., Aschberger, K., Rauscher, H., Amenta, V., Arena, M., Botelho Moniz, F., Gottardo, S., Mech, A., 2014. Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. *EFSA Support. Publ.* 11. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.EN-621>
- Peters, R., Dam, G. ten, Bouwmeester, H., Helsper, H., Allmaier, G., Kammer, F. vd, Ramsch, R., Solans, C., Tomaniová, M., Hajslova, J., Weigel, S., 2011. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. *TrAC - Trends Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.10.004>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanoparticle Res.* <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Pindřáková, L., Kašpárková, V., Kejlová, K., Dvořáková, M., Krsek, D., Jírová, D., Kašparová, L., 2017. Behaviour of silver nanoparticles in simulated saliva and gastrointestinal fluids. *Int. J. Pharm.* 527, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.026>
- Pineda, L., Chwalibog, A., Sawosz, E., Lauridsen, C., Engberg, R., Elnif, J., Hotowy, A., Sawosz, F., Gao, Y., Ali, A., Moghaddam, H.S., 2012. Effect of silver nanoparticles on growth performance, metabolism and microbial profile of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 66, 416–429. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2012.710081>
- Png, C.W., Lindén, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., McGuckin, M.A., Florin, T.H.J., 2010. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2420–2428. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.281>
- Polet, M., Laloux, L., Cambier, S., Ziebel, J., Gutleb, A.C., Schneider, Y.J., 2020. Soluble silver ions from silver nanoparticles induce a polarised secretion of interleukin-8 in differentiated Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.* 325, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.02.004>
- Potočník, J., 2011. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of

- nanomaterial (2011/696/EU). Off. J. Eur. Union L275, 38–40. <https://doi.org/10.2777/13162>
- Pulit-Prociak, J., Banach, M., 2016. Silver nanoparticles - A material of the future...? *Open Chem.* 14, 76–91. <https://doi.org/10.1515/chem-2016-0005>
- Pultz, N.J., Hoskins, L.C., Donskey, C.J., 2006. Vancomycin-resistant enterococci may obtain nutritional support by scavenging carbohydrate fragments generated during mucin degradation by the anaerobic microbiota of the colon. *Microb. Drug Resist.* 12, 63–67. <https://doi.org/10.1089/mdr.2006.12.63>
- Qin, G., Tang, S., Li, S., Lu, H., Wang, Y., Zhao, P., Li, B., Zhang, J., Peng, L., 2017. Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure. *Environ. Toxicol.* 32, 609–618. <https://doi.org/10.1002/tox.22263>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S.S.S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S.S.S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S.S.S., Qin, N., Yang, H., Wang, J.J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, J.J., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H., Borruel, N., Bruls, T., Casellas, F., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Forte, M., Friss, C., Van De Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Kleerebezem, M., Knol, J., Kristensen, M., Layec, S., Le Roux, K., Leclerc, M., Maguin, E., Melo Minardi, R., Oozeer, R., Rescigno, M., Sanchez, N., Tims, S., Torrejon, T., Varela, E., De Vos, W., Winogradsky, Y., Zoetendal, E., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Radwan, I.M., Gitipour, A., Potter, P.M., Dionysiou, D.D., Al-Abed, S.R., 2019. Dissolution of silver nanoparticles in colloidal consumer products: effects of particle size and capping agent. *J. Nanoparticle Res.* 21. <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4597-z>
- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M.S., Tahir, M.B., 2017. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 45, 1272–1291. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>
- Ravel, B., Newville, M., 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: Data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.* 12, 537–541. <https://doi.org/10.1107/S0909049505012719>
- Razuc, M., Grafia, A., Gallo, L., Ramírez-Rigo, M. V., Romañach, R.J., 2019. Near-infrared spectroscopic applications in pharmaceutical particle technology. *Drug Dev. Ind. Pharm.* <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1641510>
- Reed, R.B., Faust, J.J., Yang, Y., Doudrick, K., Capco, D.G., Hristovski, K., Westerhoff, P., 2014. Characterization of nanomaterials in metal colloid-containing dietary supplement drinks and assessment of their potential interactions after ingestion. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2, 1616–1624. <https://doi.org/10.1021/sc500108m>
- Règlement (CE) N°1333/2008 du parlement européen et du conseil sur les additifs alimentaires, 2008.

- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K.A., Lynch, I., 2013. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials (Basel)*. 6, 2295–2350. <https://doi.org/10.3390/ma6062295>
- Rick VandeVoort, A., Tappero, R., Arai, Y., 2014. Residence time effects on phase transformation of nanosilver in reduced soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 7828–7837. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2743-9>
- Robert, H., Payros, D., Pinton, P., Théodorou, V., Mercier-Bonin, M., Oswald, I.P., 2017. Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1326071>
- Robertson, R.C., Manges, A.R., Finlay, B.B., Prendergast, A.J., 2019. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. *Trends Microbiol.* 27, 131–147. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.008>
- Rodriguez, P., Heyman, M., Candalh, C., Blaton, M.A., Bouchaud, C., 1995. Tumour necrosis factor- α induces morphological and functional alterations of intestinal ht29 cl.19a cell monolayers. *Cytokine* 7, 441–448. <https://doi.org/10.1006/cyto.1995.0060>
- Rogakou, E.P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., Bonner, W.M., 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* 275, 9390–9395. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9390>
- Rogers, K.R., Bradham, K., Tolaymat, T., Thomas, D.J., Hartmann, T., Ma, L., Williams, A., 2012. Alterations in physical state of silver nanoparticles exposed to synthetic human stomach fluid. *Sci. Total Environ.* 420, 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.044>
- Rogers, K.R., Henson, T.E., Navratilova, J., Surette, M., Hughes, M.F., Bradham, K.D., Stefaniak, A.B., Knepp, A.K., Bowers, L., 2020. In vitro intestinal toxicity of commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. *Sci. Total Environ.* 728, 138611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138611>
- Rogers, K.R., Navratilova, J., Stefaniak, A., Bowers, L., Knepp, A.K., Al-Abed, S.R., Potter, P., Gitipour, A., Radwan, I., Nelson, C., Bradham, K.D., 2018. Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. *Sci. Total Environ.* 619–620, 1375–1384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.195>
- Rong, H., Garg, S., Westerhoff, P., Waite, T.D., 2018. In vitro characterization of reactive oxygen species (ROS) generation by the commercially available Mesosilver™ dietary supplement. *Environ. Sci. Nano* 5, 2686–2698. <https://doi.org/10.1039/c8en00701b>
- Rooks, M.G., Garrett, W.S., 2016. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/nri.2016.42>
- Rosenfeld, C.S., 2017. Gut dysbiosis in animals due to environmental chemical exposures. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00396>
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., Tuohy, K., 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- Rubas, W., Jezyk, N., Grass, G.M., 1993. Comparison of the Permeability Characteristics of a

- Human Colonic Epithelial (Caco-2) Cell Line to Colon of Rabbit, Monkey, and Dog Intestine and Human Drug Absorption. *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 10, 113–118. <https://doi.org/10.1023/A:1018937416447>
- Saez-Tenorio, M., Domenech, J., García-Rodríguez, A., Velázquez, A., Hernández, A., Marcos, R., Cortés, C., 2019. Assessing the relevance of exposure time in differentiated Caco-2/HT29 cocultures. Effects of silver nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.* 123, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.009>
- Sahu, S.C., Njoroge, J., Bryce, S.M., Zheng, J., Ihrie, J., Roy, S., Zheng, J., Ihrie, J., 2016. Contribution of ionic silver to genotoxic potential of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells evaluated by the cytokinesis-block micronucleus assay. *J. Appl. Toxicol.* 36, 532–542. <https://doi.org/10.1002/jat.3279>
- Sahu, S.C., Roy, S., Zheng, J., Yourick, J.J., Sprando, R.L., 2014. Comparative genotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells evaluated by fluorescent microscopy of cytochalasin B-blocked micronucleus formation. *J. Appl. Toxicol.* 34, 1200–1208. <https://doi.org/10.1002/jat.3028>
- Salari, N., Hosseinian-Far, A., Jalali, R., Vaisi-Raygani, A., Rasoulpoor, Shna, Mohammadi, M., Rasoulpoor, Shabnam, Khaledi-Paveh, B., 2020. Prevalence of stress, anxiety, depression among the general population during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. *Global. Health.* <https://doi.org/10.1186/s12992-020-00589-w>
- Samadi, N., Klems, M., Untersmayr, E., 2018. The role of gastrointestinal permeability in food allergy. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.05.010>
- Samberg, M.E., Oldenburg, S.J., Monteiro-Riviere, N.A., 2010. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. *Environ. Health Perspect.* 118, 407–413. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901398>
- Sardelli, L., Pacheco, D.P., Ziccarelli, A., Tunesi, M., Caspani, O., Fusari, A., Briatico Vangosa, F., Giordano, C., Petrini, P., 2019. Towards bioinspired: In vitro models of intestinal mucus. *RSC Adv.* <https://doi.org/10.1039/c9ra02368b>
- Saunders, P.R., Kosecka, U., McKay, D.M., Perdue, M.H., 1994. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 267, G794–G799. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1994.267.5.G794>
- Saunders, P.R., Santos, J., Hanssen, N.P.M.M., Yates, D., Groot, J.A., Perdue, M.H., 2002. Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral {CRH}. *Dig. Dis. Sci.* 47, 208–215. <https://doi.org/10.1023/a:1013204612762>
- Savolainen, H., 1995. Cadmium-associated renal disease. *Ren. Fail.* <https://doi.org/10.3109/08860229509037613>
- Schaubeck, M., Clavel, T., Calasan, J., Lagkouvardos, I., Haange, S.B., Jehmlich, N., Basic, M., Dupont, A., Hornef, M., Von Bergen, M., Bleich, A., Haller, D., 2016. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* 65, 225–237. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309333>
- Scheppach, W., 1994. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 35. https://doi.org/10.1136/gut.35.1_Suppl.S35
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V.,

- Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schroeder, B.O., 2019. Fight them or feed them: How the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol. Rep.* <https://doi.org/10.1093/gastro/goy052>
- Schubert, J., Chanana, M., 2018. Coating Matters: Review on Colloidal Stability of Nanoparticles with Biocompatible Coatings in Biological Media, Living Cells and Organisms. *Curr. Med. Chem.* 25, 4553–4586. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180601101859>
- Sekine, R., Moore, K.L., Matzke, M., Vallotton, P., Jiang, H., Hughes, G.M., Kirby, J.K., Donner, E., Grovenor, C.R.M.M., Svendsen, C., Lombi, E., 2017. Complementary Imaging of Silver Nanoparticle Interactions with Green Algae: Dark-Field Microscopy, Electron Microscopy, and Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry. *ACS Nano* 11, 10894–10902. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04556>
- Selye, H., 1936. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138, 32–32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164, 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 405–440. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>
- Shahare, B., Yashpal, M., Singh, G., 2013. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicol. Mech. Methods* 23, 161–167. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.764950>
- Shannahan, J.H., Lai, X., Ke, P.C., Podila, R., Brown, J.M., Witzmann, F.A., 2013. Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. *PLoS One* 8, 74001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074001>
- Shannahan, J.H., Podila, R., Aldossari, A.A., Emerson, H., Powell, B.A., Ke, P.C., Rao, A.M., Brown, J.M., 2015. Formation of a protein corona on silver nanoparticles mediates cellular toxicity via scavenger receptors. *Toxicol. Sci.* 143, 136–146. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu217>
- Shin, N.R., Whon, T.W., Bae, J.W., 2015. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 33, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Sim, W., Barnard, R.T., Blaskovich, M.A.T., Ziora, Z.M., 2018. Antimicrobial silver in medicinal and consumer applications: A patent review of the past decade (2007–2017). *Antibiotics* 7, 1–15. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040093>
- Simon, M., Buchanan, J.A., 2020. Argyria, an Unexpected Case of Skin Discoloration From Colloidal Silver Salt Ingestion. *J. Emerg. Med.* 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2020.05.011>

- Siopi, E., Chevalier, G., Katsimpardi, L., Saha, S., Bigot, M., Moigneu, C., Eberl, G., Lledo, P.M., 2020. Changes in Gut Microbiota by Chronic Stress Impair the Efficacy of Fluoxetine. *Cell Rep.* 30, 3682–3690.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.099>
- Sirof, V., Traore, T., Guérin, T., Noël, L., Bachelot, M., Cravedi, J.P., Mazur, A., Glorennec, P., Vasseur, P., Jean, J., Carne, G., Gorecki, S., Rivière, G., Hulin, M., 2018. French infant total diet study: Exposure to selected trace elements and associated health risks. *Food Chem. Toxicol.* 120, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.062>
- Sivignon, A., De Vallée, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignède, G., Vandekerckove, P., Darfeuille-Michaud, A., 2015. *Saccharomyces cerevisiae* CNCMI-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 276–286. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000280>
- Skalska, J., Dąbrowska-Bouta, B., Frontczak-Baniewicz, M., Sulkowski, G., Strużyńska, L., 2020. A Low Dose of Nanoparticulate Silver Induces Mitochondrial Dysfunction and Autophagy in Adult Rat Brain. *Neurotox. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00239-4>
- Smirnova, M.G., Guo, L., Birchall, J.P., Pearson, J.P., 2003. LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell. Immunol.* 221, 42–49. [https://doi.org/10.1016/S0008-8749\(03\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0008-8749(03)00059-5)
- Smith, D.J., 2008. Ultimate resolution in the electron microscope? *Mater. Today* 11, 30–38. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(09\)70005-7](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(09)70005-7)
- Smith, S.M., Vale, W.W., 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.*
- Smulders, S., Larue, C., Sarret, G., Castillo-Michel, H., Vanoirbeek, J., Hoet, P.H.M., 2015. Lung distribution, quantification, co-localization and speciation of silver nanoparticles after lung exposure in mice. *Toxicol. Lett.* 238, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.07.001>
- Söderholm, J.D., Yang, P.C., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P.M., Perdue, M.H., 2002. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 123, 1099–1108. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36019>
- Sohal, I.S., DeLoid, G.M., O'Fallon, K.S., Gaines, P., Demokritou, P., Bello, D., 2020. Effects of ingested food-grade titanium dioxide, silicon dioxide, iron (III) oxide and zinc oxide nanoparticles on an in vitro model of intestinal epithelium: Comparison between monoculture vs. a mucus-secreting coculture model. *NanoImpact* 17. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100209>
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M.L., Beaugerie, L., 2017. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 66, 1039–1048. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746>
- Solé, V.A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., Susini, J., 2007. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 62, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.12.002>
- Song, Y., Guan, R., Lyu, F., Kang, T., Wu, Y., Chen, X., 2014. In vitro cytotoxicity of silver

- nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 769, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.08.001>
- Sonnenburg, J.L., Xu, J., Leip, D.D., Chen, C.H., Westover, B.P., Weatherford, J., Buhler, J.D., Gordon, J.I., 2005. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* (80-). 307, 1955–1959. <https://doi.org/10.1126/science.1109051>
- Sontheimer-Phelps, A., Chou, D.B., Tovaglieri, A., Ferrante, T.C., Duckworth, T., Fadel, C., Frismantas, V., Sutherland, A.D., Jalili-Firoozinezhad, S., Kasendra, M., Stas, E., Weaver, J.C., Richmond, C.A., Levy, O., Prantil-Baun, R., Breault, D.T., Ingber, D.E., 2020. Human Colon-on-a-Chip Enables Continuous In Vitro Analysis of Colon Mucus Layer Accumulation and Physiology. *CMGH* 9, 507–526. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.11.008>
- Sovran, B., Planchais, J., Jegou, S., Straube, M., Lamas, B., Natividad, J.M., Agus, A., Dupraz, L., Glodt, J., Da Costa, G., Michel, M.L., Langella, P., Richard, M.L., Sokol, H., 2018. Enterobacteriaceae are essential for the modulation of colitis severity by fungi. *Microbiome* 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0538-9>
- Stimulus, 2017. Evaluation du stress.
- Strugnell, R.A., Wijburg, O.L.C., 2010. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 656–667. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2384>
- Sturm, M., Becker, A., Schroeder, A., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., 2015. Effect of chronic corticosterone application on depression-like behavior in C57BL/6N and C57BL/6J mice. *Genes, Brain Behav.* 14, 292–300. <https://doi.org/10.1111/gbb.12208>
- Sun, Y., Zhang, M., Chen, C.C., Gilliland, M., Sun, X., El-Zaatari, M., Huffnagle, G.B., Young, V.B., Zhang, J., Hong, S.C., Chang, Y.M., Gumucio, D.L., Owyang, C., Kao, J.Y., 2013. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. *Gastroenterology* 144. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.038>
- Sütterlin, S., Tano, E., Bergsten, A., Tallberg, A.B., Melhus, Å., 2012. Effects of silver-based wound dressings on the bacterial flora in chronic leg ulcers and its susceptibility in vitro to silver. *Acta Derm. Venereol.* 92, 34–39. <https://doi.org/10.2340/00015555-1170>
- Suzuki, T., 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., Hale, L.P., 2005. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J. Gastroenterol.* 11, 1131–1140. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i8.1131>
- Szentkuti, L., Riedesel, H., Enss, M.L., Gaertner, K., von Engelhardt, W., 1990. Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem. J.* 22, 491–497. <https://doi.org/10.1007/BF01007234>
- Tailford, L.E., Crost, E.H., Kavanaugh, D., Juge, N., 2015. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00081>
- Takashima, S., Tanaka, F., Kawaguchi, Y., Usui, Y., Fujimoto, K., Nadatani, Y., Otani, K., Hosomi, S., Nagami, Y., Kamata, N., Taira, K., Tanigawa, T., Watanabe, T., Imoto, S., Uematsu, S., Fujiwara, Y., 2020. Proton pump inhibitors enhance intestinal permeability

- via dysbiosis of gut microbiota under stressed conditions in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 32, 1–13. <https://doi.org/10.1111/nmo.13841>
- Talbot, P., Radziwill-Bienkowska, J.M., Kamphuis, J.B.J., Steenkeste, K., Bettini, S., Robert, V., Noordine, M.L., Mayeur, C., Gaultier, E., Langella, P., Robbe-Masselot, C., Houdeau, E., Thomas, M., Mercier-Bonin, M., 2018. Food-grade TiO₂ is trapped by intestinal mucus in vitro but does not impair mucin O-glycosylation and short-chain fatty acid synthesis in vivo: Implications for gut barrier protection. *J. Nanobiotechnology* 16, 53. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0379-5>
- Tardillo Suárez, V., Karepina, E., Chevallet, M., Gallet, B., Cottet-Rousselle, C., Charbonnier, P., Moriscot, C., Michaud-Soret, I., Bal, W., Fuchs, A., Tucoulou, R., Jouneau, P.H., Veronesi, G., Deniaud, A., 2020. Nuclear translocation of silver ions and hepatocyte nuclear receptor impairment upon exposure to silver nanoparticles. *Environ. Sci. Nano* 7, 1374–1387. <https://doi.org/10.1039/c9en01348b>
- Tippin, T.K., Thakker, D.R., 2008. Biorelevant refinement of the Caco-2 cell culture model to assess efficacy of paracellular permeability enhancers. *J. Pharm. Sci.* 97, 1977–1992. <https://doi.org/10.1002/jps.21118>
- Tiwari, R., Singh, R.D., Khan, H., Gangopadhyay, S., Mittal, S., Singh, V., Arjaria, N., Shankar, J., Roy, S.K., Singh, D., Srivastava, V., 2017. Oral subchronic exposure to silver nanoparticles causes renal damage through apoptotic impairment and necrotic cell death. *Nanotoxicology* 11, 671–686. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1343874>
- Tomita, M., Hayashi, M., Awazu, S., 1996. Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate, and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.* 85, 608–611. <https://doi.org/10.1021/js9504604>
- Tomita, M., Hayashi, M., Awazu, S., 1994. Comparison of Absorption-Enhancing Effect between Sodium Caprate and Disodium Ethylenediaminetetraacetate in Caco-2 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 753–755. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.753>
- Tor, L., 2015. Caco-2 Cell Line, in: *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing, Cham, pp. 103–111. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10
- Tossa, P., Roguet, T., Thoren, A.C., Piotrowski, A., 2014. Potentiel génotoxique des nanomatériaux: Où en est la recherche? *Environnement, Risques et Sante*. <https://doi.org/10.1684/ers.2014.0684>
- Trbojevich, R.A., Fernandez, A., Watanabe, F., Mustafa, T., Bryant, M.S., 2016. Comparative study of silver nanoparticle permeation using Side-Bi-Side and Franz diffusion cells. *J. Nanoparticle Res.* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3363-8>
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Underhill, D.M., Iliev, I.D., 2014. The mycobiota: Interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat. Rev. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/nri3684>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem.*

- Vamanu, E., Ene, M., Biță, B., Ionescu, C., Crăciun, L., Sârbu, I., 2018. In vitro human microbiota response to exposure to silver nanoparticles biosynthesized with mushroom extract. *Nutrients* 10. <https://doi.org/10.3390/nu10050607>
- Van den Brule, S., Ambroise, J., Lecloux, H., Levard, C., Soulas, R., De Temmerman, P.J., Palmari-Pallag, M., Marbaix, E., Lison, D., 2016. Dietary silver nanoparticles can disturb the gut microbiota in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 13. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0149-1>
- Van der Zande, M., Undas, A.K., Kramer, E., Monopoli, M.P., Peters, R.J., Garry, D., Antunes Fernandes, E.C., Hendriksen, P.J., Marvin, H.J.P., Peijnenburg, A.A., Bouwmeester, H., 2016. Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action. *Nanotoxicology* 10, 1431–1441. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1225132>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Hull, D.R., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Vantelon, D., Trcera, N., Roy, D., Moreno, T., Maily, D., Guilet, S., Metchalkov, E., Delmotte, F., Lassalle, B., Lagarde, P., Flank, A.M., 2016. The LUCIA beamline at SOLEIL. *J. Synchrotron Radiat.* 23, 635–640. <https://doi.org/10.1107/S1600577516000746>
- Vanuysel, T., van Wanrooy, S., Vanheel, H., Vanormelingen, C., Verschueren, S., Houben, E., Salim Rasoel, S., Tóth, J., Holvoet, L., Farré, R., Van Oudenhove, L., Boeckxstaens, G., Verbeke, K., Tack, J., Rasoel, S.S., Tóth, J., Holvoet, L., Farré, R., Van Oudenhove, L., Boeckxstaens, G., Verbeke, K., Tack, J., 2014. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 63, 1293–1299. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305690>
- Verleysen, E., Van Doren, E., Waegeneers, N., De Temmerman, P.J., Abi Daoud Francisco, M., Mast, J., 2015. TEM and SP-ICP-MS Analysis of the Release of Silver Nanoparticles from Decoration of Pastry. *J. Agric. Food Chem.* 63, 3570–3578. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00578>
- Veronesi, G., Aude-Garcia, C., Kieffer, I., Gallon, T., Delangle, P., Herlin-Boime, N., Rabilloud, T., Carrière, M., 2015. Exposure-dependent Ag⁺ release from silver nanoparticles and its complexation in AgS₂ sites in primary murine macrophages. *Nanoscale* 7, 7323–7330. <https://doi.org/10.1039/c5nr00353a>
- Vidic, J., 2013. Nanoparticules pour des applications antibactériennes , antifongiques et antivirales. *Tech. l'ingénieur* 33.
- Vila, L., García-Rodríguez, A., Cortés, C., Marcos, R., Hernández, A., 2018. Assessing the effects of silver nanoparticles on monolayers of differentiated Caco-2 cells, as a model of intestinal barrier. *Food Chem. Toxicol.* 116, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.008>
- Vila, L., Marcos, R., Hernández, A., 2017. Long-term effects of silver nanoparticles in caco-2 cells. *Nanotoxicology* 11, 771–780. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1355997>
- Vishnupriya, S., Chaudhari, K., Jagannathan, R., Pradeep, T., 2013. Single-cell investigations of silver nanoparticle-bacteria interactions. *Part. Part. Syst. Charact.* 30, 1056–1062.

<https://doi.org/10.1002/ppsc.201300165>

- Von Ossowski, I., Reunanen, J., Satokari, R., Vesterlund, S., Kankainen, M., Huhtinen, H., Tynkkynen, S., Salminen, S., De Vos, W.M., Palva, A., 2010. Mucosal adhesion properties of the probiotic lactobacillus rhamnosus GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2049–2057. <https://doi.org/10.1128/AEM.01958-09>
- Walczak, A.P., Fokkink, R., Peters, R., Tromp, P., Herrera Rivera, Z.E., Rietjens, I.M.C.M.C.M., Hendriksen, P.J.M.M., Bouwmeester, H., 2012. Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. *Nanotoxicology* 7, 1198–1210. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.726382>
- Wang, J., Hu, W., Yang, H., Chen, F., Shu, Y., Zhang, G., Liu, J., Liu, Y., Li, H., Guo, L., 2020. Arsenic concentrations, diversity and co-occurrence patterns of bacterial and fungal communities in the feces of mice under sub-chronic arsenic exposure through food. *Environ. Int.* 138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105600>
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Warshaw, A.L., Walker, W.A., Cornell, R., Isselbacher, K.J., 1971. Small intestinal permeability to macromolecules. Transmission of horseradish peroxidase into mesenteric lymph and portal blood. *Lab. Investig.* 25, 675–684.
- White, J.M.L., Powell, A.M., Brady, K., Russell-Jones, R., 2003. Severe generalized argyria secondary to ingestion of colloidal silver protein. *Clin. Exp. Dermatol.* 28, 254–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2003.01214.x>
- Wigginton, N.S., De Titta, A., Piccapietra, F., Dobias, J.A.N., Nesatyy, V.J., Suter, M.J.F., Bernier-Latmani, R., 2010. Binding of silver nanoparticles to bacterial proteins depends on surface modifications and inhibits enzymatic activity. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2163–2168. <https://doi.org/10.1021/es903187s>
- Wijnhoven, S.W.P., Peijnenburg, W.J.G.M., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H.W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van De Meent, D., Dekkers, S., De Jong, W.H., Van Zijverden, M., Sips, A.J.A.M., Geertsma, R.E., 2009. Nano-silver - A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*. <https://doi.org/10.1080/17435390902725914>
- Wilding, L.A., Bassis, C.M., Walacavage, K., Hashway, S., Leroueil, P.R., Morishita, M., Maynard, A.D., Philbert, M.A., Bergin, I.L., 2016. Repeated dose (28-day) administration of silver nanoparticles of varied size and coating does not significantly alter the indigenous murine gut microbiome. *Nanotoxicology* 10, 513–520. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1078854>
- Williams, K., Milner, J., Boudreau, M.D., Gokulan, K., Cerniglia, C.E., Khare, S., 2015. Effects of subchronic exposure of silver nanoparticles on intestinal microbiota and gut-associated immune responses in the ileum of Sprague-Dawley rats. *Nanotoxicology* 9, 279–289. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.921346>
- Williams, K.M., Gokulan, K., Cerniglia, C.E., Khare, S., 2016. Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium. *J. Nanobiotechnology* 14. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0214-9>

- Woting, A., Blaut, M., 2018. Small intestinal permeability and gut-transit time determined with low and high molecular weight fluorescein isothiocyanate-dextrans in C3H mice. *Nutrients* 10, 4–10. <https://doi.org/10.3390/nu10060685>
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
- Wu, H., Rebello, O., Crost, E.H., Owen, C.D., Walpole, S., Bennati-Granier, C., Ndeh, D., Monaco, S., Hicks, T., Colville, A., Urbanowicz, P.A., Walsh, M.A., Angulo, J., Spencer, D.I.R., Juge, N., 2020. Fucosidases from the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus*. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03514-x>
- Wu, M., Guo, H., Liu, L., Liu, Y., Xie, L., 2019. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine Volume 14*, 4247–4259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S201107>
- Wu, W., Zhang, R., McClements, D.J., Chefetz, B., Polubesova, T., Xing, B., 2018. Transformation and Speciation Analysis of Silver Nanoparticles of Dietary Supplement in Simulated Human Gastrointestinal Tract. *Environ. Sci. Technol.* 52, 8792–8800. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01393>
- Xu, D., Gao, J., Gilliland, M., Wu, X., Song, I., Kao, J.Y., Owyang, C., 2014. Rifaximin Alters Intestinal Bacteria and Prevents Stress-Induced Gut Inflammation and Visceral Hyperalgesia in Rats. *Gastroenterology* 146, 484-496.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.026>
- Xu, Hengyi, Qu, F., Xu, Hong, Lai, W., Wang, Y.A., Aguilar, Z.P., Wei, H., 2012. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *BioMetals* 25, 45–53. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9482-x>
- Yang, X., Xie, L., Li, Y., Wei, C., 2009. More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: estimating gene numbers inside a human body. *PLoS One* 4, e6074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006074>
- Yatsunenکو, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipič, M., Frutos, M.J., Galtier, P., Gundert-Remy, U., Kuhnle, G.G., Lambré, C., Leblanc, J., Lillegaard, I.T., Moldeus, P., Mortensen, A., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R.A., Wright, M., Tobbäck, P., Rincon, A.M., Smeraldi, C., Gott, D., 2018. Safety and bioavailability of silver hydrosol as a source of silver added for nutritional purposes to food supplements. *EFSA J.* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5237>
- Yun, J.W., Kim, S.H., You, J.R., Kim, W.H., Jang, J.J., Min, S.K., Kim, H.C., Chung, D.H., Jeong, J., Kang, B.C., Che, J.H., 2015. Comparative toxicity of silicon dioxide, silver and iron oxide nanoparticles after repeated oral administration to rats. *J. Appl. Toxicol.* 35, 681–693. <https://doi.org/10.1002/jat.3125>
- Yvon, S., Schwebel, L., Belahcen, L., Tormo, H., Peter, M., Haimoud-Lekhal, D.A., Eutamène, H., Jard, G., 2019. Effects of thermized donkey milk with lysozyme activity on altered gut

- barrier in mice exposed to water-avoidance stress. *J. Dairy Sci.* 102, 7697–7706. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16642>
- Zamora-Perez, P., Tsoutsis, D., Xu, R., Rivera-Gil, P., 2018. Hyperspectral-enhanced dark field microscopy for single and collective nanoparticle characterization in biological environments. *Materials (Basel)*. 11. <https://doi.org/10.3390/ma11020243>
- Zareie, M., Johnson-Henry, K., Jury, J., Yang, P.C., Ngan, B.Y., McKay, D.M., Soderholm, J.D., Perdue, M.H., Sherman, P.M., 2006. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 55, 1553–1560. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.080739>
- Zheng, G., Wu, S.-P.P., Hu, Y., Smith, D.E., Wiley, J.W., Hong, S., 2013. Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, e127–139. <https://doi.org/10.1111/nmo.12066>
- Zhou, Q.Q., Zhang, B., Nicholas Verne, G., 2009. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 146, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.06.017>

Annexe



Review

Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives

Kévin Gillois, Mathilde Lévêque, Vassilia Théodorou, Hervé Robert and Muriel Mercier-Bonin *

Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France; kevin.gillois@inra.fr (K.G.); mathilde.leveque@inra.fr (M.L.); vassilia.theodorou@inra.fr (V.T.); herve.robert@iut-tlse3.fr (H.R.)

* Correspondence: muriel.mercier-bonin@inra.fr; Tel.: +33-582-066-458

Received: 26 May 2018; Accepted: 14 June 2018; Published: 15 June 2018



Abstract: Synthetic chemicals (environmental pollutants, food additives) are widely used for many industrial purposes and consumer-related applications, which implies, through manufactured products, diet, and environment, a repeated exposure of the general population with growing concern regarding health disorders. The gastrointestinal tract is the first physical and biological barrier against these compounds, and thus their first target. Mounting evidence indicates that the gut microbiota represents a major player in the toxicity of environmental pollutants and food additives; however, little is known on the toxicological relevance of the mucus/pollutant interplay, even though mucus is increasingly recognized as essential in gut homeostasis. Here, we aimed at describing how environmental pollutants (heavy metals, pesticides, and other persistent organic pollutants) and food additives (emulsifiers, nanomaterials) might interact with mucus and mucus-related microbial species; that is, “mucophilic” bacteria such as mucus degraders. This review highlights that intestinal mucus, either directly or through its crosstalk with the gut microbiota, is a key, yet underestimated gut player that must be considered for better risk assessment and management of environmental pollution.

Keywords: environmental pollutants; food additives; gut barrier; mucus; mucophilic bacteria

1. Introduction

Synthetic chemicals, including environmental pollutants (heavy metals, pesticides, and persistent organic pollutants) and food additives (emulsifiers, nanomaterials), are widely used for many industrial purposes and consumer-related applications, and there is every indication that such chemicals will become even more abundant in coming decades [1–6]. This implies, through manufactured products, diet, and environment, a repeated and growing exposure of the general population to synthetic chemicals.

The gastrointestinal (GI) tract is the first physical and biological barrier against these chemicals, and thus their first target. Their effects on the structure and function of GI compartments through direct and/or indirect exposure, for example, swallowed following mucociliary clearance after inhalation [7], have not been fully investigated. As recently pointed out by Groh et al. [8], an intact intestinal epithelial layer, together with the genera-rich and balanced gut microbiota, is crucial when facing chemical exposure to guarantee a properly functioning gut barrier and the subsequent maintenance of host homeostasis. Indeed, disruption of the gut barrier has been suggested to play a prominent role in the etiology of various noncommunicable diseases, including GI-related irritable bowel syndrome [9], inflammatory bowel disease [10,11], and various other food intolerances and food allergies [12,13], as well as nonalcoholic fatty liver disease [14,15] and autoimmune diseases [16–18]. Interestingly,

Lerner and Matthias [19] pointed out that the rise in autoimmune diseases throughout Westernized societies has co-occurred with the increasing consumption of food additives in the last decades.

Mounting evidence indicates that various chemicals, including food contaminants and additives, may disrupt the epithelial barrier and/or interfere with the gut microbiota. For a detailed survey of the gut health effects of mycotoxins through the triad of the epithelium/mucus/microbiota, see the review of Robert et al. [20]. In a study in rats, Joly Condette et al. [21] determined the impact of in utero and postnatal chronic daily ingestion of the organophosphate chlorpyrifos (CPF) pesticide on gut maturation. In exposed rats, some alterations in paracellular intestinal permeability, together with changes in tight junction (TJ) gene expression and bacterial translocation, were depicted, depending on the developmental time point: day 21 (weaning) or day 60 (adulthood). The CPF-mediated loss in epithelial barrier integrity was also shown in vitro using differentiated Caco-2/TC7 cells [22]. In another study, Chen et al. [23] investigated in mice the consequences of oral exposure to acrolein, an environmental and dietary pollutant. A loss of barrier integrity and function was depicted with increased permeability and subsequent translocation of bacterial endotoxin-lipopolysaccharide into the blood. Similar results were seen in vitro using Caco-2 cells. Acrolein also caused the downregulation and/or redistribution of three representative TJ proteins (zonula occludens-1, occludin, claudin-1). Interestingly, gut epithelium-targeted alterations have also been described for micron-sized airborne pollutants. In particular, particulate matter (PM, made up of both coarse (PM₁₀: diameter < 10 µm) and fine particles (PM_{2.5}: diameter < 2 µm), a key pollutant in ambient air, was found to increase gut permeability in mice [24]. In parallel, consequences on epithelial barrier dysfunction have been depicted for nano-sized particles (NPs, <100 nm), mainly in vitro using enterocyte-like cell models for titanium dioxide [25,26], silver [27], or copper oxide [28]. The deleterious impact of single-walled carbon nanotubes has also been demonstrated in vitro [29] and in vivo [30].

As introduced before, the bacteria–xenobiotic crosstalk is increasingly recognized as a key player in gut health. The gut microbiota has the capacity to metabolize different xenobiotics introduced with the diet and to modulate their toxicity to the host [31]; concurrently, these compounds may change the gut microbiota composition and/or metabolic functions, as reviewed for diverse pollutant families, including heavy metals, pesticides, persistent organic pollutants, artificial sweeteners, nanomaterials, and other food additives [32–34]. However, the intestinal barrier on its luminal side also involves the mucus layer, which, together with epithelium and microbiota, provides a physical, chemical, and biological line of defense for the host, probably in an orchestrated manner [35–39]. Mucus is a viscoelastic gel that lines and protects the intestinal epithelium, separating it from the lumen contents. It functions as a dynamic barrier that is permeable to gases, water, and nutrients, but impermeable to most microorganisms. The main constituents of mucus are mucins, which are produced, stored, and released by goblet cells. Based on their location and function, several types of goblet cell have been described to date [40]. Interestingly, Birchenough et al. [41] identified “sentinel” goblet cells, which are in charge of protecting colonic crypts from bacterial intruders via mucin secretion from upper crypt goblet cells.

For a long time considered as a “simple” physical barrier, mucus is now recognized to exert other key physiological functions essential for maintaining intestinal homeostasis. In particular, it provides a habitat for the gut microbiota, since the wide diversity of mucin-bound carbohydrates can be utilized by “mucophilic” bacteria as an energy source [42–44] or preferential binding sites through bacterial adhesins [45]. Mucus-degrading bacteria possess a large variety of enzymes (glycosidases, sulphatases, sialidases, etc.) to degrade mucus glycans and subsequently harvest oligosaccharides for their own metabolism, and therefore exhibit a colonization advantage competing for the mucosal niche. Numerous mucolytic bacteria have been described to date [46], including *Akkermansia muciniphila* [47], *Bacteroides thetaiotaomicron* [42], *Bacteroides fragilis* [48], *Ruminococcus gnavus*, and *Ruminococcus torques* [49,50]. Some of them have been suggested as biomarkers in gut health and disease [50–52]. Another important trait for adaptation of intestinal bacteria to the mucosal environment is their mucus-binding capacity, as shown, for instance, by beneficial lactic acid bacteria.

Specific mediators driving adhesion to mucins include pili, such as those produced by *Lactobacillus rhamnosus* GG [53] and mucus-binding proteins, such as in *Lactobacillus reuteri* [54]. Other bacterial cell surface proteins have been identified for promoting reinforced interaction with the host in the intestinal tract [55]. It was also shown that the gut microbiota shapes the colonic mucus phenotype in mice [56]. Depending on the microbiota composition, the penetrability of mucus to bacteria and micron-sized beads was different. Interestingly, high levels of the genus *Desulfovibrio*, belonging to sulfate-reducing bacteria (SRB), were associated with a penetrable mucus phenotype [56].

Until recently, the colonic mucus barrier was described as a “static” two-layered system [57–59]. In rodents, colonic mucus was depicted as a loose layer inhabited by bacteria and a layer firmly attached to the epithelium and devoid of bacteria. In mice, the firm and loose mucus layers reached a thickness of $\approx 50 \mu\text{m}$ and $\approx 100 \mu\text{m}$, respectively [57] (in rats, thickness of $\approx 100 \mu\text{m}$ and $\approx 700 \mu\text{m}$, respectively [59]). In the human colon, a continuous layer (48–273- μm thickness, partly depending on the site) of adherent mucus gel was obtained for freshly resected tissue, with considerable intrasubject and intersubject variability [60]. Later, a 200- μm mucus thickness was reported in human colonic explants [61]. The recent findings of Kamphuis et al. [62] in rodents offered a new view of the structure and function of the colonic mucus barrier. The authors found that the colonic mucus layer covers the faeces instead of the epithelium in the distal colon. This faecal mucus layer confines the microbiota to the faeces and prevents it from remaining in the empty distal colon. In the proximal colon, the mucus does not form a separating layer between the bacteria and epithelium. The mucus/microbiota crosstalk in this revisited system organization should now be further investigated. Intestinal organoids [63,64] could also provide a powerful ex vivo model for mucus/microbiota/synthetic chemical interaction studies.

Concerning the toxicological relevance of the mucus–xenobiotic interplay for the host, little is known about whether—and how—intestinal mucus may influence and/or be modulated, as for the gut microbiota, by environmental chemicals. Based upon this background, the current review aimed to provide a summary of the available evidence regarding the bidirectional relationship between heavy metals, pesticides, persistent organic pollutants, and food additives (emulsifiers, nanomaterials) and the mucus barrier in the gut, also taking into account the consequences on “mucophilic” bacteria.

2. Effects of Environmental Pollutants and Food Additives on the Gut Mucus Barrier

2.1. Heavy Metals

Inorganic arsenic (iAs) is a ubiquitous environmental contaminant present in its trivalent or pentavalent state in drinking water and some food products [65]. Calatayud et al. [66] studied in vitro the influence of mucus on intracellular accumulation of iAs in the muco-secreting HT29-MTX cells exposed for 24 h to 1 μM As(III) or 10 μM As(V) (Table 1). The percentages of arsenic in mucus were greater ($p < 0.05$) in both cases than those found inside the cells (As(III) $7 \pm 3\%$ in mucus vs $1.1 \pm 0.3\%$ in cells; As(V) $0.6 \pm 0.1\%$ in mucus vs $0.20 \pm 0.01\%$ in cells). The authors concluded that the mucus layer impeded iAs cellular uptake and suggested that this retention was responsible for the absence of detection of iAs metabolism in HT29-MTX cells at any of the differentiation stages tested (5, 15, or 21 days post-seeding) (Table 1).

Mercury (Hg) is another heavy metal present in the environment in various chemical forms: metallic mercury, inorganic mercury, and organic mercury. For most of the population, the diet is the main pathway of exposure to this contaminant. Fish and other seafood products mainly contribute to organic mercury in the form of methylmercury (MeHg), while it is accepted that inorganic mercury is the predominant form in foods other than fish and shellfish [67]. Vázquez et al. [68] evaluated in vitro transport and cellular retention of inorganic mercury (Hg(II)) or methylmercury (MeHg) at 3.5 μM , using Caco-2/HT29-MTX cocultures in two proportions (70:30 and 50:50) versus monocultures of Caco-2 cells (Table 1). After 120 min of exposure, for both species, the apparent permeability decreased significantly in the Caco-2/HT29-MTX cocultures with respect to the values found in the Caco-2 monoculture. The increase in the proportion of HT29-MTX cells in the culture also led to an increase in

the cellular concentrations of mercury, especially for Hg(II). To support these findings, the authors measured the quantity of mercury present in mucus and found a high accumulation, depending on the mercury species assayed (MeHg: 70%; Hg(II): 30%) (Table 1). They concluded on the protective role of mucus and its trapping properties against mercury species, probably due to their lipophilicity and their high affinity for the mucus cysteine residues.

Cadmium (Cd) is a widespread toxic heavy metal, resulting from both natural and anthropic processes, deriving for the latter from batteries, pigments, plastic stabilizers, pesticides and fertilizers, and photovoltaic devices, as well as from rubber processing, galvanization processes, fossil combustion, and waste incineration [69]. Cd can be released into soil, water, and air, and it bioaccumulates in organic matter by entering the food chain. Grain and cereal products, fish, and offal are the major contributors of Cd exposure in food [70]. Öner et al. [71] evaluated the consequences of oral exposure to high Cd (CdCl₂ 15 µg/mL in drinking water) for 30 days in rats (Table 1). The authors showed an impairment of the gastric mucosal barrier through a decrease in the mucin content ($p < 0.01$), as revealed by Alcian blue (AB) staining. A negative correlation was found between mucin and cadmium content in the gastric mucosa (Table 1). Later, Asar et al. [72] confirmed that oral exposure to 15 µg/mL Cd in rats for 30 days caused a significant decrease in the mucin content of the gastric mucosa ($p < 0.01$), which was associated to a lower mucus thickness ($p < 0.01$) compared to untreated animals (Table 1). The effects of cadmium administration on mucus have also been depicted for the distal GI regions, such as the colon [73]. The authors investigated the cadmium stress in mice which were supplied with 20 mg/kg (low-concentration Cd) or 100 mg/kg (high-concentration Cd) CdCl₂ for three weeks (Table 1). For both doses, a significant decrease in the inner mucus layer thickness ($p < 0.05$) was observed in the colon of Cd-treated mice in comparison with controls only treated with water free from CdCl₂. After the three-week exposure, the populations of lactobacilli and bifidobacteria were significantly decreased ($p < 0.05$) (Table 1). Interestingly, bifidobacteria (*B. longum*) were recently found to restore diet-compromised mucus growth in mice [74].

Table 1. Effects of heavy metals on mucus and mucophilic bacteria in the gut.

Heavy Metal	Experimental Model	Experimental Design	Main Effects *	References
Arsenic	in vitro HT29-MTX cells	As(III) 1 µM As(V) 10 µM; 5, 15, and 21 days post-seeding; 24 h	iAs accumulation in mucus ↓ arsenic cellular uptake	[66]
Mercury	in vitro Caco-2/HT29-MTX cells vs Caco-2 cells	inorganic mercury (Hg(II)) 3.5 µM, methylmercury (MeHg) 3.5 µM; 2 h	Hg accumulation in mucus ↓ apparent permeability in Caco-2/HT29-MTX	[68]
Cadmium	in vivo Rats	15 µg/mL in drinking water; 30 days	↓ gastric mucin content Negative correlation mucin/cadmium in gastric mucosa	[71]
Cadmium	in vivo Rats	15 µg/mL in drinking water; 30 days	↓ gastric mucin content ↓ gastric mucus thickness	[72]
Cadmium	in vivo Mice	20 and 100 mg/kg; 21 days	↓ colonic mucus thickness ↓ lactobacilli and bifidobacteria	[73]
Lead	in vivo Zebrafish	10 and 30 µg/L; 7 days	↑ mucus secretion	[75]
Lead	in vivo Mice Perinatal exposure	32 µg/mL in drinking water (gestation and lactation)	↓ <i>A. muciniphila</i> ↑ <i>Desulfovibrio</i> in adult mice	[76]

* ↑ increase and ↓ decrease compared to control conditions.

Lead (Pb) is a highly toxic metal, used in various goods such as tetraethyl lead in gasoline, and highly persistent in the environment over time. Therefore, air, soil, water, and food are all potential exposure routes for Pb uptake. Xia et al. [75] investigated in male adult zebrafish the effects of short-term exposure (seven days) to 10 and 30 µg/L Pb with twice-daily feeding (Table 1). The secretion of mucus, revealed by Alcian blue/periodic acid–Schiff staining (AB-PAS), was increased in the gut of exposed fish (Table 1). The authors concluded that Pb exposure was detrimental to the function of goblet cells and the physical gut barrier. In another study, Wu et al. [76] studied the effects of

perinatal Pb exposure on gut microbiota in adult mice, since Pb transfer from mother to offspring occurs transplacentally and lactationally [77]. The Pb-exposed group was supplied with Pb-acetate water (32 µg/mL) and the control group was provided with Pb-free distilled water (Table 1). No direct mucus-related quantification (e.g., mucus thickness, number of goblet cells) was provided. However, among the changes observed in adult gut microbiota in offspring exposed to lead, some specific mucophilic bacterial signatures were depicted in Pb-exposed mice: that is, nearly undetected *A. muciniphila* and enriched *Desulfovibrio* (Table 1).

2.2. Pesticides

Monocrotophos (dimethyl (E)-1-methyl-2-(methylcarbamoyl)vinyl phosphate: MCP) is a broad-spectrum systemic insecticide. Because of its widespread use, MCP has been detected in ground, surface, and rain water [78]. MCP is one of the highest consumed pesticides in India and high levels have been reported in various vegetables such as brinjal, okra, cauliflower, and pea [79]. Vismaya and Rajini [80] investigated the toxic impact of repeated doses of monocrotophos in adult male rats orally treated at different doses (0.45, 0.9, and 1.8 mg MCP/kg body weight (bw)/day) for 30 days (Table 2). MCP affected both the structure and functions of the small intestine. In particular, MCP exposure caused an increase in the number of goblet cells and a goblet cell hypertrophy with cytoplasm vacuolation in the jejunum of rats treated with the intermediate and highest doses tested (Table 2), as shown by scanning electron microscopy and histology.

Chlorpyrifos (O,O-diethyl-O-[3,5,6-trichloro-2-pyridinyl]phosphorothioate: CPF) is an organophosphate insecticide used worldwide to treat fruit and vegetable crops. Chlorpyrifos residues are often detected in food and drinking water [81]. Joly Condette et al. [82] studied the effects on pups of oral exposure of female rats to low doses of CPF (1 or 5 mg/kg bw/day vs vehicle controls). Exposure lasted from gestation onset up to weaning of the pups that were individually gavaged (CPF or vehicle) thereafter. Two developmental time points were studied: weaning (day 21: D21) and adulthood (day 60: D60) (Table 2). Perinatal exposure to CPF of 5 mg/kg/day affected intestinal development, together with gut microbiota dysbiosis and increased bacterial translocation. These CPF-associated changes in the gut functioning were more substantial in immature animals (D21), but persisted, albeit to a lesser extent, over time (up to D60). Regarding mucus, impaired *Muc2* gene expression was observed (Table 2).

Imazalil (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1H-imidazole: IMZ) is a widely used pre- and post-harvest fungicide, detected in vegetables and fruits as well as in water and sludge [83–86]. Jin et al. [87] investigated the consequences of IMZ exposure on male adult zebrafish exposed for 1, 7, and 21 days at IMZ concentrations of 100 and 1000 µg/L (Table 2). The secretion of mucus in the gut, qualitatively characterized with AB-PAS staining, was decreased when the zebrafish were exposed to 1000 µg/L IMZ for 21 days (Table 2). In another study of the same group [88], male mice were orally exposed to chow-mixed IMZ for 28 days at different doses (25, 50, and 100 mg IMZ/kg bw/day) (Table 2). No mucus-related parameters were measured. However, the authors showed an IMZ-induced gut microbiota dysbiosis, accompanied by colonic inflammation for the highest dose tested. In particular, at the genus level, the abundances of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* decreased, while those of *Deltaproteobacteria* and *Desulfovibrio* increased in response to IMZ exposure (Table 2). In a further study, the same group [89] evaluated the effects of IMZ treatment at more environmentally relevant doses (0.1, 0.5, and 2.5 mg IMZ/kg bw/day) on male adult mice for 2, 5, or 15 weeks (Table 2). Significant decreases in the secretion of mucus ($p < 0.05$) were revealed by AB-PAS staining in the colon of mice exposed to 0.1, 0.5, and 2.5 mg/kg bw IMZ for five or 15 weeks, in comparison with control animals (Table 2). The mRNA levels in the colon of *Muc1/Muc2/Muc3*, *Klf4*, and *Meprin-β*, encoding proteins involved in mucin synthesis, goblet cell terminal differentiation [90], and detachment and release of mucus from goblet cells [91], respectively; and *Retnlb*, encoding RELM-β, a resistin-like molecule specifically expressed by goblet cells, were then examined (Table 2). The relative mRNA levels of *Muc2* and *Meprin-β* decreased significantly ($p < 0.05$) in the colon after two weeks of exposure to 2.5 mg/kg bw IMZ. When the exposure was extended to five weeks, the transcription levels of *Muc1*,

Muc3, *Klf4*, *Meprin-β*, and *Retnlb* all tended to decrease, especially in the 2.5 mg/kg bw IMZ-treated group ($p < 0.05$). However, the mRNA levels of *Muc1*, *Muc2*, *Muc3*, *Meprin-β*, and especially *Retnlb* increased significantly ($p < 0.05$) in the colon of mice chronically exposed to a low dose of IMZ for 15 weeks, probably prompting a compensatory phenomenon for mucus layer damage. Changes in *Lactobacillus reuteri* were pointed out [89].

Table 2. Effects of pesticides on mucus and mucophilic bacteria in the gut.

Pesticide	Experimental Model	Experimental Design	Main Effects *	References
Monocrotophos (MCP)	in vivo Mice	0.45, 0.9, and 1.8 mg/kg bw/day; 30 days	↑ number of goblet cells and goblet cell hypertrophy in the jejunum	[80]
Chlorpyrifos (CPF)	in vivo Female rats exposed from gestation to weaning of the pups	1 and 5 mg/kg bw/day; weaning (D21)/adulthood (D60)	↓ <i>Muc2</i> expression	[82]
Imazalil (IMZ)	in vivo Zebrafish	100 and 1000 µg/L; 1, 7, and 21 days	↓ mucus secretion	[87]
Imazalil (IMZ)	in vivo Mice	25, 50, and 100 mg/kg bw/day; 28 days	↓ <i>Bifidobacterium</i> and <i>Lactobacillus</i> ↑ <i>Dehalobacterium</i> and <i>Desulfovibrio</i>	[88]
Imazalil (IMZ)	in vivo Mice	0.1, 0.5, and 2.5 mg/kg bw/day; 2, 5, and 15 weeks	↓ colonic mucus secretion ↓ <i>Muc2</i> expression (2 weeks) ↑ <i>Muc2</i> expression (15 weeks) ↓ <i>Muc1</i> , <i>Muc3</i> expression (5 weeks) ↑ <i>Muc1</i> , <i>Muc3</i> expression (15 weeks)	[89]
Propamocarb (PM)	in vivo Mice	3, 30, and 300 µg/mL in drinking water; 28 days	↓ <i>Oscillospira</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Desulfovibrio</i> , and <i>Ruminococcus</i> ↑ <i>Bacteroides</i> , <i>Dehalobacterium</i> , and <i>Butyrivimonas</i>	[92]

* ↑ increase and ↓ decrease compared to control conditions.

Another example of pesticide-mediated changes in the “mucophilic” population of the gut microbiota has recently been given by Wu et al. [92] in their study on the propamocarb (PM) fungicide, usually used to control a broad spectrum of plant diseases in lettuce, potatoes, and tomatoes [93]. The authors investigated the PM effects on adult mice exposed to 3 (PM 3), 30 (PM 30), and 300 (PM 300) µg/mL PM (corresponding to 0.5, 5, and 50 mg PM/kg bw/day) through drinking water for a duration of 28 days (Table 2). The gut microbiota in the caecum of the PM 300 group deviated from that of the control group. At the genus level, the prevalence of *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Desulfovibrio*, and *Ruminococcus* decreased in the PM 300 group, while the prevalence of *Bacteroides*, *Dehalobacterium*, and *Butyrivimonas* increased (Table 2). Interestingly, *Bacteroides plebeius*, which aids in the degradation of dietary polysaccharides, appeared in the PM 300 group [92].

2.3. Persistent Organic Pollutants

4-Nitrophenol (PNP) is a persistent organic pollutant isolated from diesel exhaust particles [94]. Tang et al. [95] characterized the effects of PNP in male rats subjected to the following daily oral treatment (200 mg PNP/kg): single dose (one day, 1-d), repeated dose (three consecutive days, 3-d), and repeated dose with recovery (three consecutive days and three recovery days, 6-d) (Table 3). The authors observed that in the 1-d and 3-d PNP treatment groups, the amount of mucus, revealed by PAS staining, increased in the small intestine (duodenum and jejunum), then returned to the basal level in the 6-d PNP treatment group (Table 3).

Benzo[a]pyrene (BaP) is the most characterized and toxic member of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) family. Human contamination to BaP occurs through polluted water and soil exposure, as well as through consumption of food, primarily charcoal-broiled, grilled, and smoked meats and fishes or poorly cleaned vegetables [96]. The inhalation of polluted air [97] or tobacco smoke [96] is another source of BaP exposure. Ribière et al. [98] investigated the effects of BaP on the gut microbiota of male mice orally exposed for 28 days to a BaP dose of 50 mg/kg bw/day (Table 3). BaP exposure induced significant shifts in the composition and relative abundance of stool and mucosa-associated bacterial communities. In particular, shifts in faecal mucophilic bacteria at the end of the experiment were depicted. Among dominant taxa, the relative abundance of Lactobacillaceae

(*Lactobacillus*) and Verrucomicrobiaceae (exclusively represented by *A. muciniphila*) decreased. Other bacterial mucus-related taxa, such as *Mucispirillum* and Ruminococcaceae, were also selectively affected (Table 3). Like the dominant members, the rare members of the faecal bacterial communities underwent temporal changes. In particular, an increase in the beneficial genus *Bifidobacterium* was notably observed at the end of BaP oral exposure (Table 3).

Perfluorooctane sulfonate (PFOS) is widely used as surface treatment chemical, polymerization acid, and surfactant in industry, due to its chemical stability, high surface activity, and water- and oil-repelling properties. In 2009, the fourth meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention listed PFOS to the Annex B to limit the use of PFOS [99]. Though the application of PFOS has been stopped since 2002, emission persists in many countries due to the lack of cost-efficient alternatives [100,101]. Furthermore, the half-life for clearance of PFOS in the serum is as long as 4.8 years on average [102], meaning that PFOS is bioaccumulative in water and the ground. Suo et al. [103] evaluated the consequences of PFOS exposure using a mouse model of *Citrobacter rodentium* infection (Table 3). Mice were treated daily by oral gavage with PFOS (2 mg/kg) in water for seven days. Control animals received a DMSO vehicle. Mice were then infected with 10^{10} CFU of *C. rodentium*. PFOS treatment continued on a daily basis throughout the whole time course of observation. The authors analyzed the mRNA expression of mucins in colonic tissues. A significant reduction of mRNA expression of *Muc1* and *Muc2* was observed at a late stage (11 days post-infection: p.i.), but not an early stage (five days p.i.) of *C. rodentium* infection in PFOS-treated mice compared to the control, while expression of *Muc3* was comparable between the two groups (Table 3). The mRNA expression of *RELM-β* decreased in PFOS-treated mice at a late but not early phase of *C. rodentium* infection. Consistently, PFOS-treated mice exhibited reduced PAS⁺ area per crypt, indicating reduced mucin or number of goblet cells, compared to the control group at a late but not early stage of *C. rodentium* infection (Table 3). Interestingly, the authors measured the level of mucins and *RELM-β* under the steady state without infection. Short-term PFOS treatment (11 days) did not affect expression of mucins, but a reduction of *Muc2* was found in mice with longer-term PFOS treatment (17 days) compared to the control, even though no difference was observed in *Muc1*, *Muc3*, or *RELM-β* expression. Furthermore, the authors correlated the combinatorial downregulation of mucins and *RELM-β* to gut microbiota dysbiosis featured by increased *Escherichia coli* and decreased *Lactobacillus* species, including *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus casei*, but not *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* (Table 3).

Table 3. Effects of persistent organic pollutants on mucus and mucophilic bacteria in the gut.

Persistent Organic Pollutant	Experimental Model	Experimental Design	Main Effects *	References
4-Nitrophenol (PNP)	in vivo Rats	200 mg/kg single dose (1-d), repeated dose (3-d), repeated dose with recovery (6-d)	↑ mucus secretion in the duodenum and jejunum; reversible	[95]
Benzo[a]pyrene (BaP)	in vivo Mice	50 mg/kg bw/day; 28 days	↓ <i>Lactobacillaceae</i> and <i>Verrucomicrobiaceae</i> ; changes in <i>Mucispirillum</i> and <i>Ruminococcaceae</i> ; ↑ <i>Bifidobacterium</i>	[98]
Perfluorooctane sulfonate (PFOS)	in vivo Mice	2 mg/kg in drinking water; infection with <i>Citrobacter rodentium</i>	↓ <i>Muc1</i> , <i>Muc2</i> , but not <i>Muc3</i> in the colon 11 days p.i.; ↓ mucin content in the colon 11 days p.i.; ↑ <i>Escherichia coli</i> ; ↓ <i>Lactobacillus</i>	[103]

* ↑ increase and ↓ decrease compared to control conditions.

2.4. Food Additives

Food additives are natural or chemical compounds used by the food industry to increase conservation (antioxidants, preservatives), modify or preserve structural properties (emulsifiers, stabilisers, gelling agents, and thickeners), or improve attractiveness (coloring agents, sweeteners).

2.4.1. Emulsifiers

Emulsifiers are widely used in food products to create interesting textures and taste properties [104]. Oberle et al. [105] investigated the effects of Tween-80, also named Polysorbate-80 (P80, referred as E433), by a single-pass in situ perfusion model in male rats (Table 4). After surgery of jejunum and colon, perfusion with 1% (*w/v*) P80 induced an increase in mucus release, associated with some histological damage, including desquamation of the epithelial surface and necrosis of the mucosal lamina propria. However, after stopping P80 perfusion, mucus release progressively returned to its basal level, showing that the effect of P80 on mucus was reversible (Table 4).

Table 4. Effects of emulsifiers on mucus and mucophilic bacteria in the gut.

Emulsifier	Experimental Model	Experimental Design	Main Effects *	References
Polysorbate-80	in vivo Rats	1% (<i>w/v</i>) single-pass in situ perfusion	↑ mucus secretion; reversible	[105]
Carboxymethylcellulose (CMC)/polysorbate-80	in vivo Mice	1% (<i>v/v</i>) P80/ 1% (<i>w/v</i>) CMC in drinking water or chow; 12 weeks	↓ colonic mucus thickness; no changes in <i>Muc2</i> expression ↑ <i>R. gnavus</i> and <i>A. muciniphila</i>	[106]
Glycerol monolaurate	in vivo Mice	150 mg/kg bw; 8 weeks	↓ <i>A. muciniphila</i>	[107]
Carrageenan	in vivo Mice	20 µg/ml. in drinking water; 6 weeks	↓ <i>A. muciniphila</i>	[108]

* ↑ increase and ↓ decrease compared to control conditions.

Chassaing et al. [106] investigated in mice the effects of oral chronic exposure (12 weeks) to P80 and carboxymethylcellulose (CMC, referred to as E466), another emulsifier widely used in food products (Table 4). Supplementation with 1% (*v/v*) P80 or 1% (*w/v*) CMC in water or chow led to a decrease in mucus thickness in the colon, as shown by immunostaining. *Muc2* expression remained unchanged. This reduced mucus thickness was associated with substantial changes in the gut microbiota, with notably increased levels of *R. gnavus* and *A. muciniphila* (Table 4). Some bacteria were shown as being in direct contact with epithelial cells. Interestingly, mice treated with P80 or CMC developed a low-grade inflammation associated with a weight gain, adiposity increase, and glucose intolerance. In germ-free mice, 1% (*v/v*) P80 or 1% (*w/v*) CMC water supplementation for 12 weeks did not alter thickness and penetrability of the mucus layer and did not induce any intestinal inflammation, suggesting that emulsifiers are not solely involved in such gut function impairment. To support these findings, microbiota transfer experiments from emulsifier-treated mice to germ-free ones were performed. A decrease in mucus thickness, together with intestinal inflammation and metabolic disorder, was observed in recipient mice, demonstrating the key role of the emulsifier-conditioned gut microbiota on the gut barrier alterations, including mucus.

Induction of gut microbiota dysbiosis with metabolic syndrome and low-grade inflammation in male mice has also been shown with a diet supplemented with 150 mg/kg bw glycerol monolaurate, a natural food emulsifier [107] (Table 4). However, in contrast with the previous study, the authors reported that an eight-week oral exposure to glycerol monolaurate induced a decrease in *A. muciniphila* (Table 4). Another example of emulsifier-mediated “muco-dysbiosis” is given by Shang et al. [108], who investigated in mice the consequences of six-week oral exposure to carrageenan, which is a marine-derived polysaccharide. Thanks to its gelling properties, carrageenan has been used as a thickener and emulsifier in a huge variety of food groups, including low-calorie formulations of beverages, low-fat processed meat, yogurt, infant formula, cheese, jelly, and ice cream [109–111]. Mice were given κ-carrageenan, ι-carrageenan, and λ-carrageenan, supplemented in drinking water at a concentration of 20 µg/mL (Table 4). Control animals received normal autoclaved water. Dietary intake of each carrageenan isomer was found to disrupt the epithelial layer and to induce colitis in

both proximal and distal colonic regions. The authors also showed that carrageenan modulated gut microbiota at different taxonomic levels; in particular, at the genus level, all isomers of carrageenan significantly decreased the population of *A. muciniphila* (Table 4). Interestingly, *A. muciniphila* was negatively correlated with histological scores of inflammation.

2.4.2. Nanomaterials

Due to their unique physicochemical properties, nanomaterials, especially NPs, are currently exploited in our everyday environment for a diverse array of products (e.g., textiles, catalysts, detectors, imaging, coatings, packaging, sunscreen, nutraceuticals). Regarding the relationships between NPs and mucus, only therapeutic applications have received sustained attention [112], aimed at designing oral nanomedicines with improved mucopermeability for drug delivery systems. Behrens et al. [113] established in vitro with cells cultured with (HT29-MTX C1.E12) and without (Caco-2) mucus secretion that mucus acted as a barrier to NPs exhibiting different surface physicochemical properties (hydrophobicity, electronegativity). Bhattacharjee et al. [114] evaluated ex vivo the capacity of functionalized fluorescent silica nanoparticles (SiO₂-NPs) of different sizes and surface coatings (anionic/cationic) to permeate porcine jejunal mucus. A size- and physicochemistry-dependence in transport was identified, with subsequent effects on mucus viscoelasticity.

In the food industry, NPs are present in food additives/supplements or incorporated into packaging in contact with food, and their use has been projected to increase in the future [115,116]. The presence of NPs in food additives has notably been quantified for titanium dioxide [117–121], silicon dioxide [122–124], and silver [125].

Titanium dioxide (TiO₂, referred to as E171 in Europe) is a white coloring agent widely used in confectionary, soups, beverages, and pastries. A sizable fraction of NPs is produced during the manufacturing process of the powder, accounting for 17–55% of the particles present, depending on the commercial supplier of E171 [120,121,126,127]. Data on interactions between TiO₂ and mucus are scarce, and until recently, were obtained in vitro with model TiO₂-NPs in contact with Caco-2/HT29-MTX cocultures (vs Caco-2 monocultures); a facilitated translocation of TiO₂-NPs in the presence of mucus was reported [26] or not [127], depending on the conditions under study (Table 5). Dorier et al. [127] analyzed, for the first time, food-grade E171 (vs TiO₂-NPs) in contact with Caco-2/HT29-MTX (70:30) cells, in comparison with Caco-2 cells, during acute (6 h, 24 h, or 48 h, E171 1–200 µg/mL) versus repeated exposure (three weeks, three times a week, E171 1–100 µg/mL) (Table 5). E171 was shown to accumulate more than TiO₂-NPs under both exposure scenarios (Table 5), due to larger E171 agglomerates, which settled more quickly than their TiO₂-NPs counterparts did. This resulted in a higher level of cell exposure and cell response, that is, oxidative stress with intracellular ROS accumulation and oxidation of DNA bases. Based on mucus imaging with AB staining, the authors concluded that E171 can cross the mucus layer, since the two cellular models—with and without mucus secretion—accumulated similar amounts of TiO₂ (Table 5).

Silicon dioxide (SiO₂, referred to as E551 in Europe) is widely used as an anticaking agent in dried food, cheese, beverages, and confectionary; it has been found to contain nano-sized particles (SiO₂-NPs) in a range between 5 and 33% [122,123]. The sole study concerning the SiO₂/mucus interplay has been reported in vitro by Guo et al. [128] for model SiO₂-NPs. The authors used a Caco-2/HT29-MTX (75:25) coculture, previously characterized as producing a 2–10 µm thick, albeit irregular, mucus layer [129]. Cells were exposed for acute (4 h) or repeated (5 days) periods to amorphous SiO₂-NPs at three physiologically realistic doses: 0.0002, 0.02, and 2 µg/mL (Table 5). Concerning the barrier function, no mucus-related endpoints were measured, but a significant decrease in the transepithelial electrical resistance ($p < 0.05$) was reported for chronic exposure to low, medium, and high doses of SiO₂-NPs (Table 5). To date, no study has been reported for the E551 food additive.

Silver (coded as E174 in Europe) is currently used to color the surface of confectionary and pastries. Even though little data is available on the presence of silver NPs (AgNPs) in this food additive [130], a study on silver pearls revealed a subfraction of AgNPs composed of single as

well as aggregated/agglomerated particles [125]. Due to their antimicrobial properties, AgNPs are used in plastic food containers and storage boxes, and their potential to migrate to food has been established [131–133]. AgNPs have also been proposed as homeopathic remedies and dietary supplements (colloidal silver) for humans and as a feed additive for chicken [134,135] and pigs [136]. The sole *in vitro* study in the mucus field has been reported by Georgantzopoulou et al. [137] for model AgNPs (10–100 µg/mL) in contact with a Caco-2/HT29-MTX coculture (90:10) under acute exposure conditions (24 h) (Table 5). The mucus layer was able to trap 200-nm AgNPs, thereby reducing their interaction with the cellular membrane and resulting in lower levels of toxicity, oxidative stress, IL-8 release, and proteomic alterations than for 20-nm AgNPs and silver nitrate used as the control (Table 5). The only study *in vivo* has been performed in male and female rats orally exposed to model AgNPs at a dose of 30, 300, or 1000 mg/kg/day for 28 days [138] (Table 5). Control animals received 0.5% CMC. In the ileum (and also seen in the rectum), a higher number of goblet cells, as revealed by AB-PAS staining, were found to have released their mucus granules, resulting in more mucus in the crypt lumen and ileal lumen (Table 5); in contrast, no significant changes in the goblet cells from the proximal colon were observed for the AgNP-exposed rats. Furthermore, histochemical results showed substantial changes in mucin composition (Table 5), with a decrease in the level of neutral and acidic mucins in goblet cells from the ileum, colon, and rectum mucosa of the AgNPs-treated rats; among the acidic mucin fraction, the proportion of sulfated mucins decreased, while the proportion of sialylated mucins increased. To date, no study has been reported for the E174 food additive.

Table 5. Effects of nanomaterials on mucus and mucophilic bacteria in the gut.

Nanomaterial	Experimental Model	NPs Size	Experimental Design	Main Effects *	References
Titanium dioxide (TiO ₂) TiO ₂ -NPs	<i>in vitro</i> Caco-2/HT29-MTX cells vs Caco-2 cells	12 nm	50 µg/mL; 6, 24, and 48 h	↑ cell uptake in Caco-2/HT29-MTX cells	[26]
TiO ₂ food-grade (E171) and TiO ₂ -NPs	<i>in vitro</i> Caco-2/HT29-MTX cells vs Caco-2 cells	E171: 118 nmTiO ₂ -NPs: 12 and 24 nm	Acute exposure: 1–200 µg/mL; 6, 24, and 48 h Chronic exposure: 1–100 µg/mL; 3 weeks	↑ cell accumulation for E171 vs TiO ₂ -NPs; no mucus-mediated trapping	[127]
Silicon dioxide (SiO ₂ -NPs)	<i>in vitro</i> Caco-2/HT29-MTX cells	20–30 nm	0.0002, 0.02, and 2 µg/mL; 4 h (acute) and 5 days (repeated)	↓ transepithelial electrical resistance	[128]
Silver (AgNPs)	<i>in vitro</i> Caco-2/HT29-MTX cells vs Caco-2 cells	20 and 200 nm	10–100 µg/mL; 24 h	Mucus trapping for 200-nm AgNPs; ↓ cell-NPs interaction, IL-8 release, and ROS production	[137]
Silver (AgNPs)	<i>in vivo</i> Rats	60 nm	30, 300, and 1000 mg/kg/day; 28 days	↑ mucus release in the ileum and rectum; changes in mucin composition	[138]

* ↑ increase and ↓ decrease compared to control conditions.

3. Conclusions

The purpose of this review was to highlight the crucial role played by intestinal mucus in the emerging field of gut toxicology. Dietary exposure of humans to environmental pollutants and food additives is of growing concern due to their frequent prevalence in food commodities. The intestinal mucosa is the first physical, chemical, and biological line of defense for the host and thus plays a pivotal role for maintaining gut homeostasis. Mounting evidence indicates that oral exposure to chemicals may disrupt the epithelial barrier and/or interfere with the gut microbiota, with probable consequences in the initiation of inflammatory reactions and clinical manifestations such as intestinal disorders. Although still poorly documented to date, the impact of/on mucus, a key protagonist of the gut barrier, is substantial both *in vitro* and *in vivo* for heavy metals, pesticides, persistent organic pollutants, emulsifiers, and nanomaterials, as shown here. A schematic representation is given in Figure 1.

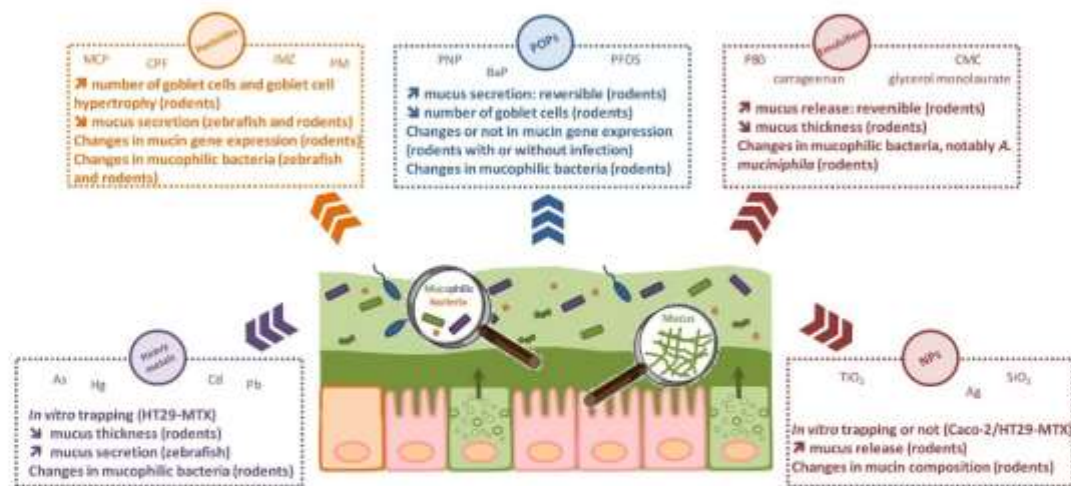


Figure 1. A schematic view of the effects of heavy metals, pesticides, persistent organic pollutants (POPs), emulsifiers, and nanoparticles (NPs) on mucus and mucophilic bacteria in the gut.

We illustrated the existence of bidirectional relationships between mucus and these various chemical families. Due to its size- and charge-exclusion barrier properties, mucus may trap chemicals, thereby decreasing their toxicity to the host. Conversely, toxicants may affect mucus characteristics (number of goblet cells, thickness and penetrability, mucin expression and composition) all along the GI tract, with potential deleterious effects on the health of the host. The mucus/microbiota interplay and the toxicant-induced “muco-dysbiosis” warrant special attention, since specific mucophilic “biomarkers” of the gut microbiota, for example, *A. muciniphila*, may be highly sensitive to the toxicants via direct and/or indirect mechanisms. Evaluation of an early-life exposure, associated to an immature intestinal barrier, including microbiota, is also of paramount importance. Overall, we conclude that mucus represents a major gut player that must be considered for better risk assessment and management of environmental pollution.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Jurewicz, J.; Polanska, K.; Hanke, W. Chemical exposure early in life and the neurodevelopment of children—an overview of current epidemiological evidence. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2013**, *20*, 465–486. [PubMed]
- Yuswir, N.S.; Praveena, S.M.; Aris, A.Z.; Hashim, Z. Bioavailability of heavy metals using *in vitro* digestion model: A state of present knowledge. *Rev. Environ. Health* **2013**, *28*, 181–187. [CrossRef] [PubMed]
- Caravanos, J.; Dowling, R.; Tellez-Rojo, M.M.; Cantoral, A.; Kobrosly, R.; Estrada, D.; Orjuela, M.; Gualtero, S.; Ericson, B.; Rivera, A.; et al. Blood lead levels in Mexico and pediatric burden of disease implications. *Ann. Glob. Health* **2014**, *80*, 269–277. [CrossRef] [PubMed]
- Hadrup, N.; Lam, H.R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver—A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *68*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
- Theodorou, I.G.; Ryan, M.P.; Tetley, T.D.; Porter, A.E. Inhalation of silver nanomaterials—Seeing the risks. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 23936–23974. [CrossRef] [PubMed]
- Chowdhury, S.; Mazumder, M.A.; Al-Attas, O.; Husain, T. Heavy metals in drinking water: Occurrences, implications, and future needs in developing countries. *Sci. Total Environ.* **2016**, *569–570*, 476–488. [CrossRef] [PubMed]

7. Moller, W.; Haussinger, K.; Winkler-Heil, R.; Stahlhofen, W.; Meyer, T.; Hofmann, W.; Heyder, J. Mucociliary and long-term particle clearance in the airways of healthy nonsmoker subjects. *J. Appl. Physiol.* **2004**, *97*, 2200–2206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Groh, K.J.; Geueke, B.; Muncke, J. Food contact materials and gut health: Implications for toxicity assessment and relevance of high molecular weight migrants. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *109*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kerckhoffs, A.P.; Akkermans, L.M.; de Smet, M.B.; Besselink, M.G.; Hietbrink, F.; Bartelink, I.H.; Busschers, W.B.; Samsom, M.W.R. Intestinal permeability in irritable bowel syndrome patients: Effects of NSAIDs. *Dig. Dis. Sci.* **2010**, *55*, 716–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Arrieta, M.C.; Bistritz, L.; Meddings, J.B. Alterations in intestinal permeability. *Gut* **2006**, *55*, 1512–1520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Mankertz, J.; Schulzke, J.D. Altered permeability in inflammatory bowel disease: Pathophysiology and clinical implications. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2007**, *23*, 379–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chen, T.; Liu, X.; Ma, L.; He, W.; Li, W.; Cao, Y.; Liu, Z. Food allergens affect the intestinal tight junction permeability in inducing intestinal food allergy in rats. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **2014**, *32*, 345–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Price, D.; Ackland, L.; Suphioglu, C. Nuts ‘n’ guts: Transport of food allergens across the intestinal epithelium. *Asia Pac. Allergy* **2013**, *3*, 257–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dai, X.; Wang, B. Role of gut barrier function in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2015**, *2015*, 287348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Miele, L.; Valenza, V.; La Torre, G.; Montalto, M.; Cammarota, G.; Ricci, R.; Masciana, R.; Forgione, A.; Gabrieli, M.L.; Perotti, G.; et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2009**, *49*, 1877–1887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. De Kort, S.; Keszthelyi, D.; Masclee, A.A. Leaky gut and diabetes mellitus: What is the link? *Obes. Rev.* **2011**, *12*, 449–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Li, X.; Atkinson, M.A. The role for gut permeability in the pathogenesis of type 1 diabetes—A solid or leaky concept? *Pediatr. Diabetes* **2015**, *16*, 485–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Vaarala, O.; Atkinson, M.A.; Neu, J. The “perfect storm” for type 1 diabetes: The complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* **2008**, *57*, 2555–2562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Lerner, A.; Matthias, T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 479–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Robert, H.; Payros, D.; Pinton, P.; Théodorou, V.; Mercier-Bonin, M.; Oswald, I. Impact of mycotoxins on the intestine: Are mucus and microbiota new targets? *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **2017**, *21*, 1–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Joly Condette, C.; Khorsi-Cauet, H.; Morlière, P.; Zabijak, L.; Reygnier, J.; Bach, V.; Gay-Quéheillard, J. Increased gut permeability and bacterial translocation after chronic chlorpyrifos exposure in rats. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tirelli, V.; Catone, T.; Turco, L.; Di Consiglio, E.; Testai, E.; De Angelis, I. Effects of the pesticide chlorpyrifos on an in vitro model of intestinal barrier. *Toxicol. In Vitro* **2007**, *21*, 308–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chen, W.Y.; Wang, M.; Zhang, J.; Barve, S.S.; McClain, C.J.; Joshi-Barve, S. Acrolein disrupts tight junction proteins and causes endoplasmic reticulum stress-mediated epithelial cell death leading to intestinal barrier dysfunction and permeability. *Am. J. Pathol.* **2017**, *187*, 2686–2697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kish, L.; Hotte, N.; Kaplan, G.G.; Vincent, R.; Tso, R.; Gänzle, M.; Rioux, K.P.; Thiesen, A.; Barkema, H.W.; Wine, E.; Madsen, K.L. Environmental particulate matter induces murine intestinal inflammatory responses and alters the gut microbiome. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Koeneman, B.A.; Zhang, Y.; Westerhoff, P.; Chen, Y.; Crittenden, J.C.; Capco, D.G. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol. Toxicol.* **2010**, *26*, 225–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Brun, E.; Barreau, F.; Veronesi, G.; Fayard, B.; Sorieul, S.; Chanéac, C.; Carapito, C.; Rabilloud, T.; Mabondzo, A.; Herlin-Boime, N.; Carrière, M. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Williams, K.M.; Gokulan, K.; Cerniglia, C.E.; Khare, S. Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium. *J. Nanobiotechnol.* **2016**, *14*, 62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ude, V.C.; Brown, D.M.; Viale, L.; Kanase, N.; Stone, V.; Johnston, H.J. Impact of copper oxide nanomaterials on differentiated and undifferentiated Caco-2 intestinal epithelial cells; assessment of cytotoxicity, barrier integrity, cytokine production and nanomaterial penetration. *Part. Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Coyuco, J.C.; Liu, Y.; Tan, B.J.; Ghiu, G.N. Functionalized carbon nanomaterials: Exploring the interactions with Caco-2 cells for potential oral drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 2253–2263.
30. Chen, H.; Zhao, R.; Wang, B.; Zheng, L.; Ouyang, H.; Wang, H.; Zhou, X.; Zhang, D.; Chai, Z.; Zhao, Y.; et al. Acute oral administration of single-walled carbon nanotubes increases intestinal permeability and inflammatory responses: Association with the changes in gut microbiota in mice. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Lu, K.; Mahbub, R.; Fox, J.G. Xenobiotics: Interaction with the intestinal microflora. *ILAR J.* **2015**, *56*, 218–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Claus, S.P.; Guillou, H.; Ellero-Simatos, S. The gut microbiota: A major player in the toxicity of environmental pollutants? *Biofilms Microbiomes* **2016**, *2*, 16003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jin, Y.; Wu, S.; Zeng, Z.; Fu, Z. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. *Environ. Pollut.* **2017**, *222*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rosenfeld, C.S. Gut dysbiosis in animals due to environmental chemical exposures. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Burger-van Paassen, N.; Vincent, A.; Puiman, P.J.; van der Sluis, M.; Bouma, J.; Boehm, G.; van Goudoever, J.B.; van Seuningen, I.; Renes, I.B. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: Implications for epithelial protection. *Biochem. J.* **2009**, *420*, 211–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lu, P.; Burger-van Paassen, N.; van der Sluis, M.; Witte-Bouma, J.; Kerckaert, J.P.; van Goudoever, J.B.; Van Seuningen, I.; Renes, I.B. Colonic gene expression patterns of mucin Muc2 knockout mice reveal various phases in colitis development. *Inflamm. Bowel Dis.* **2011**, *17*, 2047–2057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tomas, J.; Wrzosek, L.; Bouznad, N.; Bouet, S.; Mayeur, C.; Noordine, M.L.; Honvo-Houeto, E.; Langella, P.; Thomas, M.; Cherbuy, C. Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization. *FASEB J.* **2013**, *27*, 645–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Wrzosek, L.; Miquel, S.; Noordine, M.L.; Bouet, S.; Joncquel Chevalier-Curt, M.; Robert, V.; Philippe, C.; Bridonneau, C.; Cherbuy, C.; Robbe-Masselot, C.; et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* **2013**, *11*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Da Silva, S.; Robbe-Masselot, C.; Ait-Belgnaoui, A.; Mancuso, A.; Mercade-Loubière, M.; Salvador-Cartier, C.; Gillet, M.; Ferrier, L.; Loubière, P.; Dague, E.; et al. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: Prevention by a probiotic treatment. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2014**, *307*, G420–G429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Birchenough, G.M.; Johansson, M.E.; Gustafsson, J.K.; Bergström, J.H.; Hansson, G.C. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8*, 712–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Birchenough, G.M.; Nystrom, E.E.; Johansson, M.E.; Hansson, G.C. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* **2016**, *352*, 1535–1542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bäckhed, F.; Ley, R.E.; Sonnenburg, J.L.; Peterson, D.A.; Gordon, J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **2005**, *307*, 1915–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sonnenburg, J.L.; Xu, J.; Leip, D.D.; Chen, C.H.; Westover, B.P.; Weatherford, J.; Buhler, J.D.; Gordon, J.I. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* **2005**, *307*, 1955–1959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. El Kaoutari, A.; Armougom, F.; Gordon, J.I.; Raoult, D.; Henrissat, B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 497–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Juge, N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 30–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tailford, L.E.; Crost, E.H.; Kavanaugh, D.; Juge, N. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Derrien, M.; Vaughan, E.E.; Plugge, C.M.; de Vos, W.M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, 1469–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Huang, J.Y.; Lee, S.M.; Mazmanian, S.K. The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. *Anaerobe* **2011**, *17*, 137–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Crost, E.H.; Tailford, L.E.; Le Gall, G.; Fons, M.; Henrissat, B.; Juge, N. Utilisation of mucin glycans by the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus* is strain-dependent. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Png, C.W.; Linden, S.K.; Gilshenan, K.S.; Zoetendal, E.G.; McSweeney, C.S.; Sly, L.I.; McGuckin, M.A.; Florin, T.H. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* **2010**, *105*, 2420–2428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Malinen, E.; Krogius-Kurikka, L.; Lyra, A.; Nikkilä, J.; Jääskeläinen, A.; Rinttilä, T.; Vilpponen-Salmela, T.; von Wright, A.J.; Palva, A. Association of symptoms with gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 4532–4540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Everard, A.; Belzer, C.; Geurts, L.; Geurts, L.; Ouwerkerk, J.P.; Druart, C.; Bindels, L.B.; Guiot, Y.; Derrien, M.; Muccioli, G.G.; et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9066–9071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Von Ossowski, I.; Reunanen, J.; Satokari, R.; Vesterlund, S.; Kankainen, M.; Huhtinen, H.; Tynkkynen, S.; Salminen, S.; de Vos, W.M.; Palva, A. Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2049–2057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. MacKenzie, D.A.; Jeffers, F.; Parker, M.L.; Vibert-Vallet, A.; Bongaerts, R.J.; Roos, S.; Walter, J.; Juge, N. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* **2010**, *156*, 3368–3378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pretzer, G.; Snel, J.; Molenaar, D.; Wiersma, A.; Bron, P.A.; Lambert, J.; de Vos, W.M.; van der Meer, R.; Smits, M.A.; Kleerebezem, M. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 6128–6136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Jakobsson, H.E.; Rodriguez-Piñero, A.M.; Schütte, A.; Ermund, A.; Boysen, P.; Bemark, M.; Sommer, F.; Bäckhed, F.; Hansson, G.C.; Johansson, M.E. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 164–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Johansson, M.E.V.; Phillipson, M.; Petersson, J.; Holm, L.; Velcich, A.; Hansson, G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15064–15069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Johansson, M.E.; Larsson, J.M.; Hansson, G.C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4659–4665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Atuma, C.; Strugala, V.; Allen, A.; Holm, L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: Thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**, *280*, G922–G929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Gustafsson, J.K.; Ermund, A.; Johansson, M.E.; Schutte, A.; Hansson, G.C.; Sjövall, H. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2012**, *302*, G430–G438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Pullan, R.D.; Thomas, G.A.; Rhodes, M.; Newcombe, R.G.; Williams, G.T.; Allen, A.; Rhodes, J. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* **1994**, *35*, 353–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kamphuis, J.B.J.; Mercier-Bonin, M.; Eutamène, H.; Théodorou, V. Mucus organisation is shaped by colonic content: A new view. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Lukovac, S.; Belzer, C.; Pellis, L.; Keijser, B.J.; de Vos, W.M.; Montijn, R.C.; Roeselers, G. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids. *mBio* **2014**, *5*, e01438-14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kober, O.I.; Ahl, D.; Pin, C.; Holm, L.; Carding, S.R.; Juge, N. $\gamma\delta$ T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2014**, *306*, G582–G593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA J.* **2009**, *7*, 1351.

66. Calatayud, M.; Vélez, D.; Devesa, V. Metabolism of inorganic arsenic in intestinal epithelial cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2402–2411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2985.
68. Vázquez, M.; Calatayud, M.; Vélez, D.; Devesa, V. Intestinal transport of methylmercury and inorganic mercury in various models of Caco-2 and HT29-MTX cells. *Toxicology* **2013**, *311*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological Profile for Cadmium. 2012. Available online: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf> (accessed on 1 May 2018).
70. International Agency for Research on Cancer. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **2012**, *100*, 11–465.
71. Öner, G.; Izgüt-Uysal, V.N.; Sentürk, U.K. Role of lipid peroxidation in cadmium-induced impairment of the gastric mucosal barrier. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 799–804. [[CrossRef](#)]
72. Asar, M.; Kayışli, U.A.; Izgüt-Uysal, V.N.; Oner, G.; Kaya, M.; Polat, S. Cadmium-induced changes in epithelial cells of the rat stomach. *Biol. Trace Elem. Res.* **2000**, *77*, 65–81. [[CrossRef](#)]
73. Liu, Y.; Li, Y.; Liu, K.; Shen, J. Exposing to cadmium stress cause profound toxic effect on microbiota of the mice intestinal tract. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Schroeder, B.O.; Birchenough, G.M.H.; Ståhlman, M.; Arike, L.; Johansson, M.E.V.; Hansson, G.C.; Bäckhed, F. Bifidobacteria or fiber protects against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration. *Cell Host Microbe* **2018**, *23*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Xia, J.; Lu, L.; Jin, C.; Wang, S.; Zhou, J.; Ni, Y.; Fu, Z.; Jin, Y. Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *209*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wu, J.; Wen, X.W.; Faulk, C.; Boehnke, K.; Zhang, H.; Dolinoy, D.C.; Xi, C. Perinatal lead exposure alters gut microbiota composition and results in sex-specific bodyweight increases in adult mice. *Toxicol. Sci.* **2016**, *151*, 324–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Snyder, J.E.; Filipov, N.M.; Parsons, P.J.; Lawrence, D.A. The efficiency of maternal transfer of lead and its influence on plasma IgE and splenic cellularity of mice. *Toxicol. Sci.* **2000**, *57*, 87–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Waite, D.T.; Grover, R.; Westcott, N.D.; Sommerstad, H.; Kerr, L. Pesticides in ground, water surface water and spring runoff in a small Saskatchewan watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* **1992**, *11*, 741–748. [[CrossRef](#)]
79. Kumari, B.; Madan, V.K.; Singh, J.; Singh, S.; Kathpal, T.S. Monitoring of pesticidal contamination of farmgate vegetables from Hisar. *Environ. Monit. Assess.* **2004**, *90*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Rajini, P.S. Oral exposure to the organophosphorus insecticide, Monocrotophos induces intestinal dysfunction in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *71*, 236–243.
81. Bolles, H.G.; Dixon-White, H.E.; Peterson, R.K.; Tomerlin, J.R.; Day, E.W., Jr.; Oliver, G.R. U.S. market basket study to determine residues of the insecticide chlorpyrifos. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1817–1822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Joly Condet, C.; Bach, V.; Mayeur, C.; Gay-Quéheillard, J.; Khorsi-Cauet, H. Chlorpyrifos exposure during perinatal period affects intestinal microbiota associated with delay of maturation of digestive tract in rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2015**, *61*, 30–40. [[PubMed](#)]
83. Ortelli, D.; Edder, P.; Corvi, C. Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 423–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Belenguer, V.; Martínez-Capel, F.; Masiá, A.; Picó, Y. Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain). *J. Hazard. Mater.* **2014**, *265*, 271–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Masiá, A.; Vázquez, K.; Campo, J.; Picó, Y. Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túrria River Basin. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1378*, 19–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Ccancapa, A.; Masiá, A.; Navarroortega, A.; Picó, Y.; Barceló, D. Pesticides in the Ebro river basin: Occurrence and risk assessment. *Environ. Pollut.* **2016**, *211*, 414–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Jin, C.; Luo, T.; Zhu, Z.; Pan, Z.; Yang, J.; Wang, W.; Fu, Z.; Jin, Y. Imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and hepatic metabolism disorder in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *202*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

88. Jin, C.; Zeng, Z.; Fu, Z.; Jin, Y. Oral imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in mice. *Chemosphere* **2016**, *160*, 349–358. [CrossRef] [PubMed]
89. Jin, C.; Xia, J.; Wu, S.; Tu, W.; Pan, Z.; Fu, Z.; Wang, Y.; Jin, Y. Insights into a possible influence on gut microbiota and intestinal barrier function during chronic exposure of mice to imazalil. *Toxicol. Sci.* **2018**, *162*, 113–123. [CrossRef] [PubMed]
90. Katz, J.P.; Perreault, N.; Goldstein, B.G.; Lee, C.S.; Labosky, P.A.; Yang, V.W.; Kaestner, K.H. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* **2002**, *129*, 2619–2628. [PubMed]
91. Schütte, A.; Ermund, A.; Becker-Pauly, C.; Johansson, M.E.; Rodriguez-Pineiro, A.M.; Bäckhed, F.; Müller, S.; Lottaz, D.; Bond, J.S.; Hansson, G.C. Microbial-induced meprin β cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 12396–12401. [CrossRef] [PubMed]
92. Wu, S.; Jin, C.; Wang, Y.; Fu, Z.; Jin, Y. Exposure to the fungicide propamocarb causes gut microbiota dysbiosis and metabolic disorder in mice. *Environ. Pollut.* **2018**, *237*, 775–783. [CrossRef] [PubMed]
93. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance propamocarb. *EFSA Sci. Rep.* **2006**, *78*, 1–80.
94. Noya, Y.; Mikami, Y.; Taneda, S.; Mori, Y.; Suzuki, A.K.; Ohkura, K.; Yamaki, K.; Yoshino, S.; Seki, K.I. Improvement of an efficient separation method for chemicals in diesel exhaust particles: Analysis for nitrophenols. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2008**, *15*, 318–321. [CrossRef] [PubMed]
95. Tang, J.; Song, M.; Watanabe, G.; Nagaoka, K.; Rui, X.; Li, C. Effects of 4-nitrophenol on expression of the ER- α and AhR signaling pathway-associated genes in the small intestine of rats. *Environ. Pollut.* **2016**, *216*, 27–37. [CrossRef] [PubMed]
96. Phillips, D.H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.* **1999**, *443*, 139–147. [CrossRef]
97. Lewtas, J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat. Res.* **2007**, *636*, 95–133. [CrossRef] [PubMed]
98. Ribière, C.; Peyret, P.; Pariso, T.N.; Darcha, C.; Déchelotte, P.; Barnich, N.; Peyretaillade, E.; Boucher, D. Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31027. [CrossRef] [PubMed]
99. United Nations Environment Programme. Secretariat of the Stockholm Convention: The New POPs under the Stockholm Convention, 2011. Available online: http://www.pops-gmp.org/res/file/UNEP-POPS-COP_5-INF-27.pdf (accessed on 1 May 2018).
100. Eriksen, K.T.; Raaschou-Nielsen, O.; McLaughlin, J.K.; Lipworth, L.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Sørensen, M. Association between plasma PFOA and PFOS levels and total cholesterol in a middle-aged Danish population. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56969. [CrossRef] [PubMed]
101. Xie, S.; Wang, T.; Liu, S.; Jones, K.C.; Sweetman, A.J.; Lu, Y. Industrial source identification and emission estimation of perfluorooctane sulfonate in China. *Environ. Int.* **2013**, *52*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
102. Olsen, G.W.; Burris, J.M.; Ehresman, D.J.; Froehlich, J.W.; Seacat, A.M.; Butenhoff, J.L.; Zobel, L.R. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 1298–1305. [CrossRef] [PubMed]
103. Suo, C.; Fan, Z.; Zhou, L.; Qiu, J. Perfluorooctane sulfonate affects intestinal immunity against bacterial infection. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5166. [CrossRef] [PubMed]
104. Engelen, L.; Van Der Bilt, A. Oral physiology and texture perception of semisolids. *J. Texture Stud.* **2008**, *39*, 83–113. [CrossRef]
105. Oberle, R.L.; Moore, T.J.; Krummel, D.A.P. Evaluation of mucosal damage of surfactants in rat jejunum and colon. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **1995**, *33*, 75–81. [CrossRef]
106. Chassaing, B.; Koren, O.; Goodrich, J.K.; Poole, A.C.; Srinivasan, S.; Ley, R.E.; Gewirtz, A.T. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* **2015**, *519*, 92–96. [CrossRef] [PubMed]
107. Jiang, Z.; Zhao, M.; Zhang, H.; Li, Y.; Liu, M.; Feng, F. Antimicrobial emulsifier-glycerol monolaurate induces metabolic syndrome, gut microbiota dysbiosis, and systemic low-grade inflammation in low-fat diet fed mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*. [CrossRef] [PubMed]

108. Shang, Q.; Sun, W.; Shan, X.; Jiang, H.; Cai, C.; Hao, J.; Li, G.; Yu, G. Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6 mice. *Toxicol. Lett.* **2017**, *279*, 87–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Necas, J.; Bartosikova, L. Carrageenan: A review. *Vet. Med.* **2013**, *58*, 187–205. [[CrossRef](#)]
110. Tobacman, J.K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 983–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Watson, D.B. Public health and carrageenan regulation: A review and analysis. *J. Appl. Phycol.* **2008**, *20*, 505–513. [[CrossRef](#)]
112. Ensign, L.M.; Cone, R.; Hanes, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 557–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Behrens, I.; Pena, A.L.; Alonso, M.J.; Kissel, T. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: The effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1185–1193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Bhattacharjee, S.; Mahon, E.; Harrison, S.M.; McGettrick, J.; Muniyappa, M.; Carrington, S.D.; Brayden, D.J. Nanoparticle passage through porcine jejunal mucus: Microfluidics and rheology. *Nanomedicine* **2017**, *13*, 863–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Peters, R.J.B.; Bouwmeester, H.; Gottardo, S.; Amenta, V.; Arena, M.; Brandhoff, P.; Marvin, H.J.P.; Mech, A.; Moniz, F.B.; Pesudo, L.Q.; et al. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *54*, 155–164. [[CrossRef](#)]
116. Piperigkou, Z.; Karamanou, K.; Engin, A.B.; Gialeli, C.; Docea, A.O.; Vynios, D.H.; Pavao, M.S.; Golokhvast, K.S.; Shtilman, M.I.; Argiris, A.; et al. Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: From agriculture and food sector to cancer therapeutics. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *91*, 42–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Dudefoi, W.; Terrisse, H.; Popa, A.F.; Gautron, E.; Humbert, B.; Ropers, M.H. Evaluation of the content of TiO₂ nanoparticles in the coatings of chewing gums. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2018**, *35*, 211–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Periasamy, V.S.; Athinarayanan, J.; Al-Hadi, A.M.; Juhaimi, F.A.; Mahmoud, M.H.; Alshatwi, A.A. Identification of titanium dioxide nanoparticles in food products: Induce intracellular oxidative stress mediated by TNF and CYP1A genes in human lung fibroblast cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *39*, 176–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Peters, R.J.; van Bommel, G.; Herrera-Rivera, Z.; Helsper, H.P.; Marvin, H.J.; Weigel, S.; Tromp, P.C.; Oomen, A.G.; Rietveld, A.G.; Bouwmeester, H. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6285–6293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Weir, A.; Westerhoff, P.; Fabricius, L.; Hristovski, K.; von Goetz, N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 2242–2250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Yang, Y.; Doudrick, K.; Bi, X.; Hristovski, K.; Herckes, P.; Westerhoff, P.; Kaegi, R. Characterization of food-grade titanium dioxide: The presence of nanosized particles. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 6391–6400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Dekkers, S.; Krystek, P.; Peters, R.J.; Lankveld, D.P.; Bokkers, B.G.; van Hoeven-Arentzen, P.H.; Bouwmeester, H.; Oomen, A.G. Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 393–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Heroult, J.; Nischwitz, V.; Bartczak, D.; Goenaga-Infante, H. The potential of asymmetric flow field-flow fractionation hyphenated to multiple detectors for the quantification and size estimation. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 3919–3927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Peters, R.; Kramer, E.; Oomen, A.G.; Rivera, Z.E.; Oegema, G.; Tromp, P.C.; Fokkink, R.; Rietveld, A.; Marvin, H.J.; Weigel, S.; et al. Presence of nano-sized silica during *in vitro* digestion of foods containing silica as a food additive. *ACS Nano* **2012**, *6*, 2441–2451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Verleysen, E.; Van Doren, E.; Waegeneers, N.; De Temmerman, P.J.; Abi Daoud Francisco, M.; Mast, J. TEM and SP-ICP-MS analysis of the release of silver nanoparticles from decoration of pastry. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 3570–3578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Bettini, S.; Boutet-Robinet, E.; Cartier, C.; Comera, C.; Gaultier, E.; Dupuy, J.; Naud, N.; Taché, S.; Grysan, P.; Reguer, S.; et al. Oral exposure to food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis and initiates colon carcinogenesis in rats. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

127. Dorier, M.; Béal, D.; Marie-Desvergne, C.; Dubosson, M.; Barreau, F.; Houdeau, E.; Herlin-Boime, N.; Carrière, M. Continuous *in vitro* exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology* **2017**, *11*, 751–761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Guo, Z.; Martucci, N.J.; Liu, Y.; Yoo, E.; Tako, E.; Mahler, G.J. Silicon dioxide nanoparticle exposure affects small intestine function in an *in vitro* model. *Nanotoxicology* **2018**, *18*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Mahler, G.J.; Shuler, M.L.; Glahn, R.P. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an *in vitro* digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, *20*, 494–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. EFSA. Scientific Opinion on the Re-Evaluation of Silver (E 174) as Food Additive. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4364.
131. Benn, T.; Cavanagh, B.; Hristovski, K.; Posner, J.D.; Westerhoff, P. The release of nanosilver from consumer products used in the home. *J. Environ. Qual.* **2010**, *39*, 1875–1882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Echegoyen, Y.; Nerin, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *62*, 16–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Hannon, J.C.; Kerry, J.P.; Cruz-Romero, M.; Azlin-Hasim, S.; Morris, M.; Cummins, E. Assessment of the migration potential of nanosilver from nanoparticle-coated low-density polyethylene food packaging into food simulants. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2016**, *33*, 167–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Ahmadi, F.; Kurdestany, A.H. The impact of silver nano particles on growth performance, lymphoid organs and oxidative stress indicators in broiler chicks. *Glob. Vet.* **2010**, *5*, 366–370.
135. Pineda, L.; Chwalibog, A.; Sawosz, E.; Lauridsen, C.; Engberg, R.; Elnif, J.; Hotowy, A.; Sawosz, F.; Gao, Y.; Ali, A.; et al. Effect of silver nanoparticles on growth performance, metabolism and microbial profile of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* **2012**, *66*, 416–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Fondevila, M.; Herrero, R.; Casallasa, M.C.; Abecia, L.; Duchá, J.J. Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2009**, *150*, 259–269. [[CrossRef](#)]
137. Georgantzopoulou, A.; Serchi, T.; Cambier, S.; Leclercq, C.C.; Renaut, J.; Shao, J.; Kruszewski, M.; Lentzen, E.; Grysan, P.; Eswara, S.; et al. Effects of silver nanoparticles and ions on a co-culture model for the gastrointestinal epithelium. *Part. Fibre Toxicol.* **2016**, *13*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Jeong, G.N.; Jo, U.B.; Ryu, H.Y.; Kim, Y.S.; Song, K.S.; Yu, I.J. Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Arch. Toxicol.* **2010**, *84*, 63–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

