



HAL
open science

Étude au niveau pulmonaire du profil d'expression de gènes et de protéines chez le rat exposé par inhalation à un aérosol de particules nanostructurées de dioxyde de titane

Laëtitia Chezeau

► To cite this version:

Laëtitia Chezeau. Étude au niveau pulmonaire du profil d'expression de gènes et de protéines chez le rat exposé par inhalation à un aérosol de particules nanostructurées de dioxyde de titane. Toxicologie. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0226 . tel-02078672

HAL Id: tel-02078672

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02078672>

Submitted on 25 Mar 2019

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Laëtitia CHEZEAU**

Etude au niveau pulmonaire du profil d'expression de gènes et de protéines chez le rat exposé par inhalation à un aérosol de particules nanostructurées de dioxyde de titane

Le 15 octobre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Françoise PONS	Professeur, Université de Strasbourg, Strasbourg
	Mme Josiane CILLARD	Professeur Emérite, Université de Rennes 1, Rennes
Examineurs :	Mme Laure SABATIER	Directeur de Recherche, CEA
	Mme Sophie ACHARD	Maître de Conférences, Université Paris Descartes, Paris
	Mr Lionel DOMENJOUR	Maître de Conférences, Université Nancy 1, Nancy
	Mr Bertrand RIHN	Professeur, Université de Lorraine, Nancy Directeur de thèse
	Mr Laurent GATE	Responsable de Laboratoire, INRS, Vandoeuvre, Co-directeur de thèse

EA3452 CITHEFOR, Université de Lorraine - Faculté de Pharmacie
5, rue Albert LEBRUN – 54001 NANCY Cedex 01
Institut National de Recherche et de Sécurité
Département Toxicologie et Biométrie
Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy



Remerciements

A Monsieur Bertrand RIHN, Professeur des Universités,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de co-encadrer ma thèse,
Pour vos précieux conseils, votre expérience,
Pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser une partie de mes travaux à l'Université de Berkeley,
Veuillez accepter ici toute ma considération ainsi que mon profond respect.

A Monsieur Laurent GATE, Responsable de Laboratoire,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de co-encadrer ma thèse,
Pour votre disponibilité, votre implication, votre soutien et vos précieux conseils tout au long de ma thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus profonde estime et ma sincère gratitude.

A Madame Josiane CILLARD, Professeur Emérite

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ma thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

A Madame Françoise PONS, Professeur des Universités

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ma thèse,
Pour vos conseils, votre disponibilité lors des différents comités de thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus profond respect et de ma plus vive reconnaissance.

A Madame Sophie ACHARD, Maître de Conférences

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

A Madame Laure SABATIER, Directeur de Recherche

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,
Veuillez trouver ici l'expression de ma plus respectueuse gratitude.

A Monsieur Lionel DOMENJOUR, Maître de Conférences,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,
Pour vos conseils, votre disponibilité lors des différents comités de thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

Je remercie sincèrement toutes les personnes de l'INRS et plus particulièrement du département Toxicologie et Biométrie, des laboratoires CMR et GCAT qui ont participé de près ou de loin à mes travaux.

Merci à Frédéric pour son aide et ses précieux conseils.

Merci à Carole pour son aide précieuse lors de mes expérimentations, sa disponibilité, sa bonne humeur, les bons moments partagés.

Merci à Sylvie pour sa bonne humeur, sa gentillesse, son aide et ses précieux conseils, ainsi que pour la patience dont elle a fait preuve et qui lui a permis de me supporter durant ces 3 années.

Merci à Cristina pour sa gentillesse, ses précieux conseils, les fous rires et tous les bons moments partagés.

Merci à Olivier, Cécile, Véronique, Anne-Marie et Pierre pour leur aide et leur disponibilité.

Merci à Raphaël pour sa gentillesse, son humour, ses visites quotidiennes de soutien pendant ma rédaction, et pour m'avoir fait découvrir et transmis sa passion pour la salsa.

Merci à Mylène pour sa gentillesse, son aide précieuse, les bons moments passés ensemble, notamment notre remake du lac des cygnes (version étang) ; un grand moment !

Merci à Nadège pour sa bonne humeur et pour avoir partagé sa culture musicale si développée. Le lapin et le chasseur peuvent en témoigner !

Merci à Dieynaba, Sylvie, Hervé, « les » Stéphane, Laurine, Claire, Guillaume, Mathieu, Aurélie, Augier, Karine, François, Alexandre pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Je remercie également les membres de l'EA 3452 CITHEFOR pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe. Merci à Olivier, Ramia pour ses précieux conseils et son aide, Zarah, Sarah, Chloé pour ces bons moments passés et ces discussions enrichissantes. Merci à Nathalie et Pascale pour leur gentillesse, leur écoute et leur aide.

Je remercie chaleureusement le Dr. Lori Kohlstaedt pour m'avoir si bien accueillie au sein de son laboratoire « Proteomics/Mass Spectrometry » de Berkeley et pour avoir partagé son expertise. Un grand merci à Nathalie Quintero pour sa gentillesse et sa disponibilité.

J'exprime ma gratitude à Douleye Dembéle, bioinformaticien à l'IGBMC, pour son aide précieuse dans l'analyse de mes données en début de thèse. Merci pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa pédagogie.

Je remercie également Hélène Dubois-Pot-Schneider pour sa gentillesse, son aide précieuse dans l'analyse de mes résultats ainsi que ses conseils avisés.

Merci à mes parents, mon frère, ma famille et mes amis,

Merci pour tout ce que vous avez fait, faites et ferez pour moi.

Enfin, merci à toutes les personnes que j'aurais oublié par mégarde mais qui se reconnaîtront.

Cette thèse a été associée à un évènement douloureux de ma vie qui en a retardé sa finalisation. Son accomplissement représente pour moi une très grande fierté !

Table des matières

Liste des figures.....	9
Liste des tableaux	11
Liste des annexes.....	12
Liste des abréviations	13
Introduction générale.....	15
Chapitre I : Analyse bibliographique : état de l'art	19
1. Nanoparticules de dioxyde de titane.....	20
1.1. Propriétés physico-chimiques	20
1.2. Utilisation actuelle	22
1.3. Classification et VLEP	23
2. Toxicité du TiO ₂	26
2.1. Facteurs influençant la toxicité du TiO₂	26
2.1.1. Taille	26
2.1.2. Surface spécifique	27
2.1.3. Charge de surface	29
2.1.4. Modification de surface	29
2.1.5. Structure cristalline	30
2.1.6. Forme	31
2.1.7. Etat d'agglomération/agrégation	31
2.2. Voies d'exposition	33
2.2.1. Inhalation	33
2.2.2. Voie orale / Absorption gastro-intestinale	33
2.2.3. Exposition dermique	34
2.2.4. Voie intraveineuse	36
2.3. Toxicité expérimentale	36
2.3.1. Toxicité pulmonaire : inflammation	37
2.3.2. Toxicité extrapulmonaire	43
2.3.2.1. Exposition par voie orale	43
2.3.2.2. Exposition cutanée	45
2.3.3. Génotoxicité	46
2.3.4. Cancérogenèse	50
2.3.5. Reprotoxicité	53

2.3.6.	Neurotoxicité	54
2.3.7.	Toxicité cardio-vasculaire	55
2.4.	Toxicité humaine	55
3.	Etude de la toxicité pulmonaire des nanoparticules de TiO ₂ dans un modèle murin	58
3.1.	Physiologie de l'appareil respiratoire du rat et de l'Homme	58
3.1.1.	Anatomie comparée des voies respiratoires	58
3.1.2.	Histologie des alvéoles pulmonaires	60
3.1.3.	Physiologie des voies respiratoires	61
3.1.4.	Cohérence homme-animal	62
3.2.	Génération et caractérisation de l'aérosol	64
3.2.1.	Génération de l'aérosol	64
3.2.1.1.	Méthodes en voie humide	65
3.2.1.2.	Méthodes en voie sèche	67
3.2.1.3.	Méthodes de synthèse directe	67
3.2.2.	Caractérisation de l'aérosol	68
3.3.	Exposition des animaux	70
3.3.1.	Réglementation en recherche animale	70
3.3.2.	Conditions environnementales	71
3.3.3.	Methodes d'exposition	72
3.3.3.1.	Inhalation oro-nasale	72
3.3.3.2.	Inhalation corps entier	73
3.3.3.3.	Intubation endotrachéale	74
3.4.	Dose déposée	74
3.4.1.	Modèles de deposition	74
3.4.2.	Déposition, rétention et élimination	77
3.5.	Biodistribution	82
4.	Toxicologie mécanistique par approche de type « omiques »	84
4.1.	Concept	84
4.2.	Etat des lieux de la littérature	87
4.3.	Techniques de criblage à haut-contenu	88
4.3.1.	Transcriptomique	88
4.3.2.	Protéomique	93
4.3.3.	Autres techniques	96
4.4.	Traitements des données et bioinformatique	98
	Chapitre 2 : Objectifs de l'étude	101

Chapitre 3 : Matériel et méthodes	107
1. Génération et caractérisation de l'aérosol	108
1.1. Système d'inhalation oro-nasale NanoTIREx	108
1.2. Génération de l'aérosol	110
1.3. Surveillance de l'aérosol pendant l'inhalation	111
1.4. Caractérisation approfondie de l'aérosol	112
2. Exposition des animaux.....	114
3. Collecte des échantillons et histopathologie.....	115
3.1. Mise à mort des animaux	115
3.2. Traitement du poumon et lavage broncho-alvéolaire	115
3.3. Coloration de May-Grunwald Giemsa	116
3.4. Enrobage en paraffine et coloration Hématoxyline-Eosine et Trichrome de Masson 117	
4. Toxicologie moléculaire.....	119
4.1. Transcriptomique	119
4.1.1. Extraction d'ARN total et purification	119
4.1.2. Hybridation sur puces	119
4.1.3. Analyses statistiques, fonctionnelles, et des voies de signalisation sur données de puces 120	
4.2. Protéomique	124
4.2.1. Analyse MudPIT des surnageants de LBA	124
4.2.2. Expression de cytokines dans le LBA	126
5. Analyse statistique des données de cytologie et biochimie du LBA	127
Chapitre 4 : Résultats	128
1. Caractérisation de l'aérosol et mesures diverses	129
1.1. Surveillance de l'aérosol	129
1.1.1. Concentration en masse (mg/m³)	129
1.1.2. Concentration en nombre (particules/cm³)	130
1.2. Caractérisation de l'aérosol	130
1.2.1. Distribution en taille (f(masse))	130
1.2.2. Distribution en taille (f(nombre))	131
1.2.3. Microscopie électronique	132
1.3. Rétention et élimination du titane pulmonaire	132
2. Analyse du LBA.....	134
2.1. Analyse biochimique du lavage broncho-alvéolaire et morphométrie du poumon	134
2.2. Cytologie du lavage broncho-alvéolaire	136

3.	Histopathologie pulmonaire et des ganglions lymphatiques associés aux poumons.....	138
4.	Analyse transcriptomique.....	141
5.	Analyse protéomique.....	147
5.1.	Analyse MudPIT des surnageants de LBA	147
5.2.	Niveaux d'expression de cytokines dans le lavage broncho-alvéolaire	158
Chapitre 5 : Discussion.....		161
1.	Discussion méthodologique.....	162
1.1.	Modèle <i>in vivo</i> utilisé	162
1.2.	Exposition oro-nasale	163
1.3.	Particules et dose utilisées	164
1.4.	Analyses transcriptomique et protéomique	166
2.	Discussion des résultats.....	167
2.1.	Réponse à court terme	167
2.1.1.	Approche conventionnelle	167
2.1.2.	Profil d'expression de gènes et de protéines	168
2.1.2.1.	Inflammation aiguë	168
2.1.2.1.1.	Rôle central des neutrophiles dans l'inflammation	172
2.1.2.1.1.1.	Neutrophiles et inflammation aiguë	172
2.1.2.1.1.2.	Libération d'histones extracellulaires	173
2.1.2.1.2.	Rôle des macrophages dans la réponse inflammatoire	177
2.1.2.2.	Système cardio-vasculaire	183
2.1.2.3.	Stress oxydant	185
2.1.2.4.	Lésions de l'ADN	186
2.1.2.5.	Gènes et protéines associés à la fibrose et au remodelage tissulaire	187
2.1.2.6.	Métabolisme glucidique	190
2.2.	Réponse à long terme	190
2.2.1.	Approche conventionnelle	190
2.2.2.	Profil d'expression de gènes et de protéines	191
2.2.2.1.	Inflammation	192
2.2.2.2.	Stress oxydant	193
2.2.2.3.	Gènes et protéines associés à la fibrose et au remodelage tissulaire	193
2.2.2.4.	Métabolisme lipidique	194
2.3.	Etats d'activation des macrophages	194
2.4.	Comparaison des données de transcriptomique et protéomique	195
Chapitre 6 : Conclusion et perspectives		198

Références bibliographiques	206
Annexes	221

Liste des figures

Figure 1: Classification des nanomatériaux (ISO, 2015).	17
Figure 2: Formes cristallines du TiO ₂ ; (a) anatase, (b) rutile, (c) brookite	20
Figure 3: Pourcentage de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire de rats (A, B) et de souris (C, D), indicateurs d'une inflammation 24 h après instillation intratrachéale de différentes doses de particules de TiO ₂ (20 nm et 250 nm).	28
Figure 4: Réponse inflammatoire pulmonaire	38
Figure 5: Implication des mécanismes de génotoxicité primaire et secondaire dans la cancérogenèse	50
Figure 6. Anatomie des poumons du rat.....	59
Figure 7: Histologie d'une alvéole pulmonaire humaine.	61
Figure 8: Représentation schématique des méthodes de préparation de nanomatériaux aérosolisés. ...	65
Figure 9: Exemples de générateurs d'aérosols.	66
Figure 10: Représentation schématique des modèles d'exposition par inhalation chez le rongeur.	72
Figure 11: Mécanismes de déposition des particules inhalées dans les voies respiratoires.	76
Figure 12: Prédiction du dépôt de particules inhalées de différentes tailles dans les régions nasopharyngées, trachéobronchiques et alvéolaires, au cours de la respiration nasale.	78
Figure 13: Devenir des nanoparticules dans les poumons.....	81
Figure 14: Toxicologie prédictive et évaluation des risques.	86
Figure 15: Techniques de criblage à haut-contenu ou "omiques".	88
Figure 16: Puces à ADN sur lame de verre.	90
Figure 17 : Principe des puces à ADN (technologie une couleur).	91
Figure 18: Séquençage nouvelle génération (NGS).	93
Figure 19. Principe de la spectrométrie de masse (a) et de la spectrométrie de masse en tandem (b). .	95
Figure 20 : Protocole expérimental de l'étude	105
Figure 21: Description du système d'inhalation oro-nasale NanoTIREx.....	109
Figure 22: Tour d'inhalation simple niveau (EMMS, Bordon, UK) (b) tubes de contention réalisés sur mesure (c) une sonde d'échantillonnage.	110
Figure 23 : Diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) de l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ déterminé à l'aide de l'impacteur en cascade SIOUTAS.	131
Figure 24 : Diamètre aérodynamique médian en nombre (DAMN) de l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ déterminé à l'aide de l'impacteur basse pression de détection électrique ELPI.	131
Figure 25 : Images en microscopie électronique à transmission (TEM) d'un échantillon d'aérosol nanostructuré de TiO ₂	132
Figure 26 : Charge pulmonaire et élimination du titane après exposition subaiguë des rats à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂	133
Figure 27 : Mesure de l'activité LDH et du contenu protéique dans le LBA ; ainsi que de la masse pulmonaire chez les rats témoins et exposés.	136
Figure 28 : Cytologie du LBA chez les rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ (n = 6 animaux par groupe).....	137
Figure 29 : Coupes de tissus pulmonaires de rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , colorées à l'hématoxyline-éosine.....	139
Figure 30 : Coupes de tissus ganglionnaires lymphatiques de rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , colorées à l'hématoxyline-éosine.....	140
Figure 31 : Processus biologiques (GO BP) enrichis et communs, modifiés dans les poumons de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , jusqu'à 180 jours post-exposition (déterminés à l'aide de la base de données DAVID version 6.7). Z-score > 1,3 ou p < 0,05.....	143

Figure 32 : Processus biologiques (GO BP) enrichis, modifiés dans les poumons de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , uniquement à court ou long terme (déterminés à l'aide de la base de données DAVID version 6.7). Z-score > 1,3 ou p < 0,05.	145
Figure 33 : Processus biologiques (GO BP) enrichis et communs, modifiés dans les surnageants de LBA de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition (déterminés à l'aide de la base de données DAVID version 6.7). Z-score > 1,3 ou p < 0,05.	149
Figure 34 : Processus biologiques (GO BP) enrichis, modifiés dans les surnageants de LBA de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , uniquement à court ou long terme (déterminés à l'aide de la base de données DAVID version 6.7). Z-score > 1,3 ou p < 0,05.....	151
Figure 35 : Réseau STRING d'interactions protéine-protéine observées suite à l'analyse des protéines différentiellement exprimées dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition.....	155
Figure 36 : Réseau STRING d'interactions protéine-protéine observées suite à l'analyse des protéines différentiellement exprimées dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , 3 jours suivant la fin de l'exposition.	156
Figure 37 : Réseau STRING d'interactions protéine-protéine observées suite à l'analyse des protéines différentiellement exprimées dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , 180 jours suivant la fin de l'exposition.	157
Figure 38 : Cytokines différentiellement exprimées, de manière significative, dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , immédiatement (A), 3 jours (B) et 180 jours (C) post-exposition (pool de 5 animaux par groupe témoin et exposé pour chacun des 3 temps d'analyse).	160
Figure 39: Vue d'ensemble de l'interdépendance entre inflammation et stress oxydant. Lorsque l'inflammation est le 1 ^{er} processus physiopathologique à se mettre en place, elle peut induire secondairement un stress oxydant, ce dernier amplifiant d'avantage l'inflammation.....	171
Figure 40: NETose.	176
Figure 41: Représentation schématique des différents états d'activation et fonctions des macrophages pendant la quiescence, l'inflammation et la résolution de l'inflammation.....	180
Figure 42: Biomarqueurs potentiels de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).	189
Figure 43 : Réponse pulmonaire inflammatoire à court terme	202
Figure 44 : Réponse pulmonaire inflammatoire à long terme.	204

Liste des tableaux

Tableau I : Quantités produites et importées déclarées entre 2014 et 2017 (Rapport R-nano).	15
Tableau II : Propriétés physiques des 3 formes cristallines du TiO ₂ (INRS, 2013).	21
Tableau III : Principales constantes biologiques et respiratoires chez l'Homme et le rat (Bernstein, 2007, Detaille, 2008).	62
Tableau IV : Caractérisation minimale d'un aérosol.	70
Tableau V: Exemples de différents logiciels pour l'analyse et l'interprétation biologique de données de « omiques ».	99
Tableau VI : Stratégie de mesurage et instruments de mesure utilisés.	113
Tableau VII : Principales caractéristiques de l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ généré.	129
Tableau VIII : Résultats de transcriptomique.	141
Tableau IX : Voies métaboliques KEGG significativement enrichies dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , immédiatement, 3 et 180 jours suivant la fin de l'exposition (p-value < 0,05).	153
Tableau X : Données statistiques principales calculées à partir des réseaux d'interactions protéine-protéine observées dans les surnageants de LBA des calculées à J0, J3 et J180 (String db v10.5). ...	158
Tableau XI : Marqueurs d'activation des macrophages (phénotypes M1, M2) dérégulés dans les poumons ou le LBA de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ à court et long terme (Aggarwal et al., 2014a, Murray et al., 2014, Murray and Wynn, 2011). NA : non applicable.	182
Tableau XII : Gènes et protéines communs différentiellement exprimés dans les poumons et le LBA de rats exposés respectivement, immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition.	197

Liste des annexes

ANNEXE 1 : Récapitulatif des études concernant la toxicité pulmonaire suite à l'inhalation/institution de NPs de TiO ₂ chez l'animal.	222
ANNEXE 2 : Morphologie, cytologie, histologie, fonction et structure de l'appareil respiratoire et régions utilisées dans le modèle dosimétrique de la Commission internationale de protection radiologique (CIPR, 1994).	226
ANNEXE 3 : Justification de l'exposition des rats à un aérosol nanostructuré de 10 mg/m ³	227
ANNEXE 4 : Aspect cytologique du LBA (microscopie optique) : A) chez des rats témoins, chez des rats exposés à un aérosol nanostructuré de TiO ₂ B) immédiatement et C) 180 jours post-exposition. Les flèches rouges indiquent la présence de granulocytes neutrophiles, les flèches bleues celle de macrophages et enfin les flèches vertes, celle de macrophages chargés en particules.....	228
ANNEXE 5 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les poumons de rats suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , qui sont impliqués dans le processus biologique « inflammatory response » (GO:0006954).....	229
ANNEXE 6 : Voies biologiques KEGG significativement enrichies dans les poumons de rats exposés à un aérosol nanostructuré de TiO ₂ , immédiatement, 3, 28, 90 et 180 jours post-exposition (p < 0,05).....	230
ANNEXE 7 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les poumons de rats suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , qui sont impliqués dans le processus biologique « blood circulation » (GO:0008015).	231
ANNEXE 8 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les poumons de rats suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO ₂ , qui sont impliqués dans le processus biologique « oxidation reduction » (GO:0055114).	232
ANNEXE 9 : Publication en tant que premier auteur acceptée dans la revue « Toxicology and Applied Pharmacology ».	233
ANNEXE 10 : Publication en tant que premier auteur en soumission.....	234

Liste des abréviations

8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ADNc	ADN complémentaire
AOP	Séquences d'évènements conduisant à la toxicité (Adverse Outcome Pathways)
ARNm	ARN messenger
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BP	Biological Process
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CC	Cellular Component
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CPC	Compteur à noyaux de condensation
CSSC	Comité scientifique de sécurité des consommateurs
DAMM	Diamètre aérodynamique médian en masse
DAMN	Diamètre aérodynamique médian en nombre
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DNMT	ADN méthyl-transférase
ECHA	Agence européenne des produits chimiques
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
ENSRNOP	Ensembl Protein identifiers
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FC	Fold change
FP	Fines particules
FPI	Fibrose pulmonaire idiopathique
GGT	Gamma glutamyl-transférase
GO	Gene ontology
GSD	Geometric standard deviation (écart-type moyen)
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
H2AX	Famille des histones H2A, membre X
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
IPA [®]	Ingenuity [®] pathway analysis
iTRAQ	Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification
J0, J3, J28, J90, J180	Immédiatement, 3, 28, 90, 180 jours après la fin de l'exposition
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LDH	Lactate déshydrogénase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1

MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microscopie électronique à transmission
MF	Molecular Function
MPPD	Multiple-Path Particle Dosimetry Model
MS	Spectrométrie de masse
MSP	PCR spécifique de la méthylation
MudPIT	Tecnologie d'identification multidimensionnelles des protéines
NAG	N-acétyl- β -D-glucosaminidase
NET	Neutrophil Extracellular Traps (Piège extracellulaire des neutrophiles)
NGS	Séquençage de nouvelle génération
NIH	National Institute of Health
NP	Nanoparticule
PAL	Phosphatase alcaline
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PAR	Région proximale alvéolaire
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PPIN	Protein-Protein Interaction Networks
RAC	Comité d'évaluation des risques
REACH	Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SNC	Système nerveux central
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TiO ₂	Dioxyde de titane
UE	Union européenne
Uniprot KB	Uniprot Knowledge Base
VLEP	Valeur limite d'exposition professionnelle

Introduction générale

Au cours des dernières décennies, les nanotechnologies ont connu un essor considérable. L'utilisation de nanomatériaux dans des produits de consommation courante n'a cessé d'augmenter de telle sorte que selon « The Project on Emerging Nanotechnologies » (Inventory, 2013), plus de 1600 produits contenant des nanomatériaux ont déjà été identifiés. D'autre part, grâce à l'obligation de déclarations des substances importées, fabriquées ou distribuées en France, environ 424 000 tonnes de substances à l'état particulaire ont été déclarées produites ou utilisées en France en 2017 (Tableau I, Rapport R-nano 2017, (R-Nano, 2017)).

Tableau I : Quantités produites et importées déclarées entre 2014 et 2017 (Rapport R-nano).

Quantités de substances à l'état nanoparticulaire	2014	2015	2016	2017
Volume total - quantités produites et importées en France (t)	397 131	415 774	475 766	424 323
Volume produit total en France (t)	274 667	300 822	350 487	304 282
Volume importé total en France (t)	122 464	114 951	125 279	120 041

L'utilisation de nanomatériaux dans de nombreux procédés industriels, provient du fait que ces matériaux présentent des propriétés physico-chimiques nouvelles ou spécifiques. Cependant ces nouvelles propriétés physico-chimiques nous questionnent sur les propriétés toxicologiques de ces nano-objets manufacturés, leurs agrégats et agglomérats (NOAA) ; ainsi que sur leur éventuel impact sur la santé des salariés qui les manipulent, et de la population générale qui utilisent des produits manufacturés en contenant.

Les nanomatériaux sont des matériaux dont la taille ou la structure comporte au moins une dimension comprise entre 1 et 100 nm. Ils possèdent des propriétés physiques, chimiques ou biologiques particulières, en lien avec leur taille nanométrique (ANSES, 2016).

Cependant, de nombreuses définitions existent. En effet, l'établissement d'une définition précise, basée sur des données scientifiques est complexe ; cette dernière ne devant être ni trop globale (empêchant d'appréhender les propriétés spécifiques à chaque nanomatériau), ni trop restrictive. Le 18 octobre 2011, la Commission Européenne a publié ses recommandations relatives à la définition des nanomatériaux (2011/696/UE). Ce document spécifie qu'on entend par "nanomatériau" un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. Cependant cette définition basée sur la taille présente des limites. En effet, en fonction du type de nanomatériau considéré, les valeurs seuils en termes de toxicité diffèrent. De plus, la valeur seuil fixe de 100 nm ne fait pas l'unanimité chez les scientifiques qui la jugent arbitraire. D'autre part, la majorité des nanomatériaux sont constitués de particules de différentes tailles. Il serait donc pertinent de se baser sur une courbe de distribution de taille des particules. De plus, les nanomatériaux peuvent se retrouver sous forme d'agglomérats ou agrégats de taille supérieure à l'échelle nanométrique, mais posséder des propriétés en lien avec cette dernière. Ces agrégats/agglomérats peuvent également se décomposer en particules nanométriques primaires sous certaines conditions (CIEL, 2014, Lacour, 2011).

D'autre part, la taille n'est pas le seul paramètre à prendre en compte, notamment la forme, la surface spécifique, la chimie de surface des particules, interviennent dans la toxicité des nanomatériaux.

Les nanomatériaux sont classés en deux grandes familles : les nano-objets dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique. Cette famille comprend les nanoparticules (nano-objets dont les trois dimensions externes sont à l'échelle nanométrique notamment le dioxyde de titane), les nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nanobâtonnets (nano-objets dont deux dimensions externes sont à l'échelle nanométrique tel que les nanotubes de carbone), et enfin les nanofeuillets, nanoplats ou nanoplaquettes (nano-objets dont une dimension externe est à l'échelle nanométrique notamment les nanofeuillets d'argile) (Figure 1). La seconde famille concerne les matériaux nanostructurés, possédant une structure interne ou de surface, à l'échelle nanométrique. Cette famille regroupe les agrégats et agglomérats de nano-objets, les nanocomposites et enfin les matériaux nanoporeux (ISO, 2015).

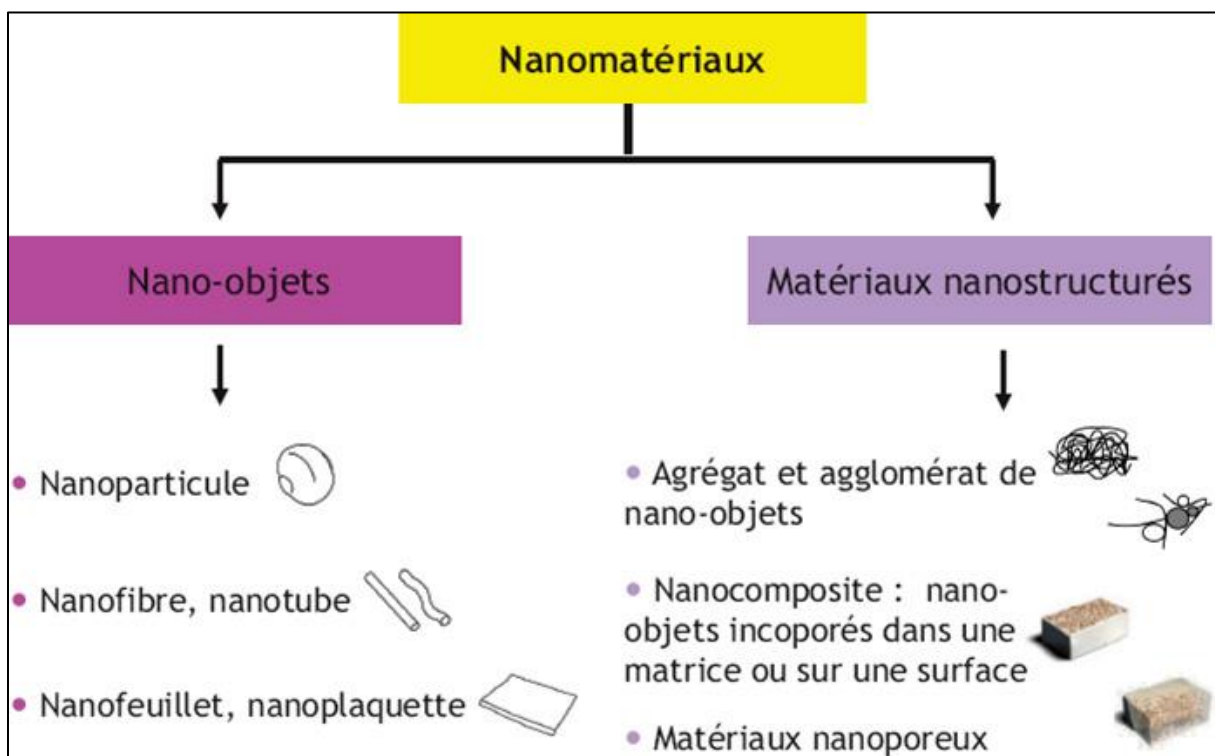


Figure 1: Classification des nanomatériaux (ISO, 2015).

Le terme de « nanomatériaux manufacturés » désigne des nanomatériaux produits intentionnellement par l'homme à des fins d'applications précises, et possédant des propriétés spécifiques (Ricaud and Witschger, 2012).

Actuellement l'utilisation des nanomatériaux est en pleine expansion. Les domaines d'applications sont multiples ; notamment le secteur industriel (bâtiment, automobile, emballage), la santé, la cosmétologie et l'alimentation (ANSES, 2014).

Dans ce contexte, le nombre de salariés pouvant être exposés augmente sans que pour autant les propriétés toxicologiques de ces substances soient parfaitement connues. L'inhalation représente la voie majeure d'exposition professionnelle, et les premiers tissus exposés sont ceux de l'appareil respiratoire. Ainsi, les études de toxicologie expérimentale menées par inhalation chez les animaux, semblent être les plus pertinentes pour l'évaluation précoce du danger associé à l'exposition aux nanoaérosols.

Ce travail de thèse s'intègre dans une étude menée conjointement entre l'EA3452 et l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles, organisme de référence dans les domaines de la santé au travail et de la prévention des risques professionnels (accidents du travail, maladies professionnelles). Cette étude consiste à évaluer chez le rat de laboratoire, les propriétés toxicologiques pulmonaires à court terme et à long terme d'un échantillon de dioxyde de titane (TiO_2) inhalé, un des nanomatériaux les plus utilisés actuellement, par des approches de toxicologie conventionnelles et moléculaires.

Chapitre I : Analyse bibliographique : état de l'art

1. Nanoparticules de dioxyde de titane

1.1. Propriétés physico-chimiques

Un matériau de taille nanométrique peut posséder des propriétés physico-chimiques différentes du même matériau à l'échelle micro- ou macroscopiques, notamment dû à l'augmentation de sa surface spécifique.

Le dioxyde de titane ou oxyde de titane (IV) est un oxyde métallique, composé de titane et d'oxygène, de formule chimique TiO_2 . A l'état naturel, le TiO_2 est présent sous 3 formes cristallines; anatase, rutile (plus dense et plus stable thermodynamiquement que la forme anatase) ; ou brookite (Figure 2). Il peut également se combiner à l'oxyde de fer pour former l'ilménite.

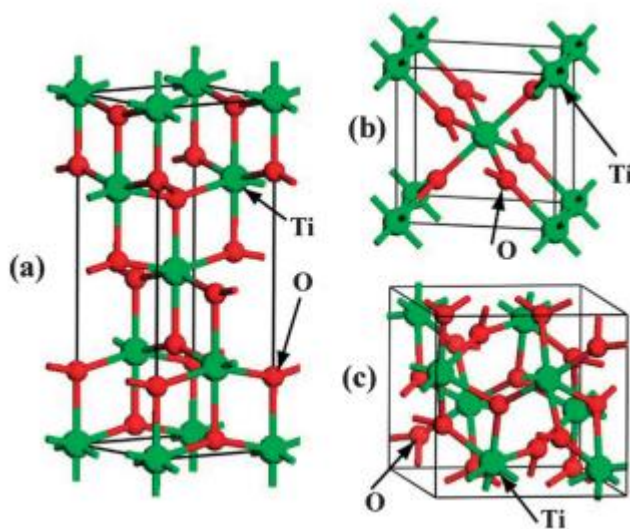


Figure 2: Formes cristallines du TiO_2 ; (a) anatase, (b) rutile, (c) brookite

Les atomes de titane sont représentés par les sphères vertes et les atomes d'oxygènes par les sphères rouges (Zhang et al., 2014).

Le TiO_2 pur (CAS 13463 -67 -7) est une poudre cristalline, blanche, inodore, non combustible, insoluble dans l'eau, l'éthanol et autres solvants organiques ; de masse molaire

de 79,9 g/mol. Les propriétés physiques des 3 formes cristallines sont présentées dans le tableau II. Le TiO₂ est capable d'absorber les rayons ultraviolets, d'où son utilisation dans les crèmes solaires en tant que filtre UV. Le degré d'absorption est fonction de la forme cristalline, ainsi que de la taille des particules et agrégats/agglomérats le constituant. Les NP de TiO₂ possèdent une meilleure activité photocatalytique que les particules fines, de même que la forme anatase comparée à la forme rutile et sont ainsi capables de former des espèces réactives de l'oxygène, (Binet et al., 2017, INRS, 2013, NIOSH, 2011, Ricaud and Witschger, 2012, Shi et al., 2013).

Tableau II : Propriétés physiques des 3 formes cristallines du TiO₂ (INRS, 2013).

Nom Substance	Détails	
Rutile	N° CAS	1317-80-2
	Etat Physique	Solide
	Masse molaire	79,9
	Point de fusion	1 830 - 1 855 °C (avec décomposition à 1 860 °C)
	Point d'ébullition	à partir de 2 500 °C
	Densité	4,13 - 4,24
Anatase	N° CAS	1317-70-0
	Etat Physique	Solide
	Masse molaire	79,9
	Point de fusion	Se transforme en rutile à partir de 915 °C
	Point d'ébullition	à partir de 2 500 °C
	Densité	3,8 - 3,9
Brookite	N° CAS	12188-41-9
	Etat Physique	Solide
	Masse molaire	79,9
	Point de fusion	Se transforme en rutile à partir de 750 °C
	Point d'ébullition	à partir de 2 500 °C
	Densité	4,13

Le TiO₂ existe sous différentes tailles. Le TiO₂ fin (forme micrométrique) se compose de particules primaires dont le diamètre est généralement compris entre 0,1 et 3 µm et possède une surface spécifique BET (Brunauer-Emmet-Teller) d'environ 5 à 15 m²/g (soit 20 à 60 m²/cm³ pour une densité de 4 g/cm³).

Le TiO₂ ultrafin (nanométrique) est constitué de particules primaires possédant un diamètre généralement compris entre 10 et 50 nm et une surface spécifique d'environ 10 à 300 m²/g (soit 40 à 1200 m²/cm³). Ces particules primaires sont rarement sous forme individuelle mais ont plutôt tendance à former des agglomérats ou agrégats de plus grande taille (1 à 20 µm). Le procédé de fabrication ainsi que le milieu dans lequel se trouvent les particules vont influencer l'état d'agglomération/agrégation.

1.2. Utilisation actuelle

Le TiO₂ est un des nanomatériaux les plus utilisés actuellement en France. En 2017, entre 10 000 et 100 000 tonnes de TiO₂ ultrafin ont été produites, importées ou distribuées selon le dispositif de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire ; R-Nano 2017 (R-Nano, 2017).

Le TiO₂ ultrafin est utilisé dans de nombreux domaines notamment en cosmétique ; pour son pouvoir absorbant UV dans les crèmes solaires, son action antibactérienne dans les déodorants, ou comme colorant (CI 77891) dans le maquillage, les crèmes de soins et le dentifrice. Son pouvoir photocatalytique lui conférant des propriétés auto-nettoyantes et/ou dépolluantes, conduit à son utilisation dans le secteur du BTP où il entre notamment dans la composition de vitres, de ciments, de revêtement routier ainsi que dans le secteur automobile (pots catalytiques). Il est également retrouvé dans les peintures pour ses propriétés antibactériennes, autonettoyantes, ou comme filtre UV. D'autre part, il est fréquemment utilisé dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'additif connu sous le nom E171 en Europe,

retrouvé notamment dans les bonbons, chewing-gums, biscuits, compléments alimentaires. Le E171 partiellement nanométrique, n'est pas soumis à l'étiquetage « nano » (les nanoparticules ne représentant pas plus de 50 % de sa composition). Enfin, il est utilisé dans le secteur pharmaceutique comme colorant (CI 77891) entrant dans la composition des médicaments ou comme excipient dans les vaccins (ANSES, 2014, ANSES, 2017a, Binet et al., 2017, INRA, 2017, INRS, 2013).

1.3. Classification et VLEP

La classification du TiO_2 dépend de la voie d'exposition. Concernant l'exposition par inhalation, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé en 2006, le TiO_2 comme cancérigène possible pour l'homme (2B) ; toutes tailles confondues en se basant sur des preuves suffisantes chez l'animal de laboratoire mais insuffisantes provenant d'études épidémiologiques (IARC., 2010). En effet, Lee et coll. ont mis en évidence le développement de tumeurs pulmonaires chez des rats exposés par inhalation pendant 2 ans à de fortes concentrations de particules fines de TiO_2 (250 mg/m^3) (Lee et al., 1985). Ces tumeurs résulteraient d'une surcharge pulmonaire plutôt que d'un pouvoir cancérigène spécifique de ces particules fines (ILSI, 2000). En mai 2016, l'ANSES a demandé à l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) de classer le TiO_2 comme cancérigène 1B par inhalation (substance dont le potentiel cancérigène pour l'être humain est supposé). En juin 2017, le Comité d'évaluation des risques (RAC) de l'ECHA, a proposé une classification en catégorie 2, comme cancérigène suspecté par inhalation pour l'Homme. La Commission européenne statuera sur l'éventuelle inclusion de la classification du TiO_2 dans le cadre de la réglementation CLP (classification, étiquetage et conditionnement). Si cette proposition est acceptée, les industriels devront à l'aide d'un étiquetage approprié, informer les travailleurs des risques encourus lors de la manipulation de produits contenant du TiO_2 . Ils devront

également essayer de substituer la substance afin de mieux protéger la population générale. D'autre part, l'ANSES effectuera en 2018, une évaluation des risques du TiO₂ pour la santé humaine et l'environnement dans le cadre de la réglementation REACH (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques), obligeant les industriels à fournir des informations supplémentaires sur les usages et dangers du TiO₂ (ANSES, 2017a, Binet et al., 2017, INRS, 2013, VeilleNanos). En raison de la toxicité pulmonaire plus importante du TiO₂ sous sa forme nanométrique, aux Etats-Unis, le NIOSH a proposé une valeur recommandée d'exposition professionnelle pondérées sur 10h par jour et 40h par semaine ; de 2,4 mg/m³ concernant le TiO₂ fin (fraction alvéolaire, particules primaires de diamètre supérieur à 100 nm ainsi que leurs agrégats et agglomérats) ; et de 0,3 mg/m³ concernant le TiO₂ ultrafin (fraction alvéolaire, particules primaires de diamètre inférieur à 100 nm ainsi que leurs agrégats et agglomérats). Au Japon, la VLEP pour le TiO₂ ultrafin est de 0,6 mg /m³ (fraction alvéolaire). En Europe, différentes valeurs limites d'exposition au TiO₂ nanométrique existent selon les pays. En France, le TiO₂ quel que soit la taille des particules unitaires, est encore classé parmi les poussières réputées « sans effet spécifique ». Ainsi, une VLEP indicative de 10 mg/m³ a été définie dans l'air des locaux de travail, se basant sur une circulaire du ministère du travail datant de 1987, pondérée sur 8h par jour et 40h par semaine. Cependant, aucune VLEP spécifique au TiO₂ ultrafin n'existe.

Concernant l'exposition orale au TiO₂, l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments), a prolongé en septembre 2016, l'utilisation de l'additif alimentaire E171 (partiellement nanométrique) ; estimant qu'aucun problème de santé n'a été observé. Cependant, une étude récente de l'INRA (NANOGUT) publiée en janvier 2017, a mis en évidence pour la première fois, une apparition de lésions colorectales précancéreuses suite à une exposition chronique de rats à l'additif E171 par voie orale (Bettini et al., 2017). Ces

résultats ne permettent pas de conclure à des effets chez l'homme. Cependant, les ministères chargés de la consommation, de la santé et de l'alimentation ont saisi l'ANSES afin de déterminer si cet additif est dangereux pour les consommateurs. En avril 2017, l'ANSES a publié un avis expliquant que bien que l'étude de Bettini et coll. ne permette pas à ce stade, de remettre en cause l'évaluation de l'additif E171 réalisée par l'EFSA, de nouveaux effets ont été identifiés notamment des effets promoteurs potentiels de la cancérogenèse. Ainsi, de nouvelles études doivent être réalisées afin de caractériser le danger associé à l'ingestion de cet additif. Ces études devront être prises en compte par l'EFSA lors de sa ré-évaluation des additifs alimentaires (ANSES, 2017b).

Concernant l'exposition dermique lors de l'utilisation de cosmétiques, notamment crèmes solaires et produits de beauté, le Comité scientifique européen pour la sécurité des consommateurs (CSSC), un organe consultatif de l'Union européenne ; a approuvé l'utilisation des NP de TiO_2 en tant qu'anti-UV (concentration maximale autorisée de 25 %). Depuis août 2016, les NP de TiO_2 sont inscrites à l'annexe VI du Règlement européen relatif aux cosmétiques (Afssaps, 2011b, Cancer-Environnement, 2018) ; elles sont autorisées sous formes micrométrique et nanométrique (concentration de 25 % du total de la préparation prête à l'emploi, sauf pour les sprays pouvant donner lieu à une exposition des poumons par inhalation). Le plus souvent les produits solaires contiennent entre 2 et 10 % de TiO_2 .

2. Toxicité du TiO₂

2.1. Facteurs influençant la toxicité du TiO₂

Le TiO₂ appartient à la famille des particules faiblement solubles et faiblement toxiques (ECETOC, 2013). Ainsi la forme micrométrique du TiO₂ a souvent été utilisée comme contrôle négatif dans des études de toxicologie des particules (Donaldson et al., 2008). Cependant, en 1985, des effets toxiques de type inflammation ainsi que le développement de tumeurs pulmonaires, ont été mis en évidence suite à des expositions chroniques par inhalation chez le rat à de hautes concentrations de TiO₂ (Lee et al., 1985). Ces effets s'expliqueraient par la présence d'une surcharge pulmonaire, diminuant la clairance ainsi que la mobilité des macrophages alvéolaires (Morrow, 1988). La faible solubilité du TiO₂ est en faveur d'une biopersistance élevée, notamment au niveau pulmonaire (Gate et al., 2017). La biopersistance peut également s'expliquer par le phénomène de surcharge pulmonaire associé à la diminution de l'élimination médiée par les macrophages.

De nombreuses variétés de TiO₂ sont disponibles, comme mentionné précédemment. Ainsi, il est nécessaire de définir et caractériser précisément le TiO₂ utilisé, les effets toxiques pouvant être différents. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer la toxicité, notamment les propriétés physico-chimiques incluant la taille, la forme, la surface spécifique et la composition chimique (Hsiao and Huang, 2011).

2.1.1. Taille

La taille nanométrique confère des propriétés physico-chimiques particulières. Elle est corrélée à une augmentation de la surface spécifique, et donc de la réactivité chimique et biologique (INRS, 2014). Ceci se traduit souvent par une plus grande toxicité. En effet, plus les particules sont petites et plus elles peuvent pénétrer profondément dans l'organisme,

traverser certaines barrières biologiques, se retrouver dans la circulation sanguine, ou à l'intérieur des cellules et agir facilement sur les composants biologiques. Ainsi, les NP de TiO₂ sont plus toxiques que les particules de TiO₂ fines. A la même « dose retenue en masse », elles entraînant notamment une réponse inflammatoire pulmonaire plus forte (Oberdorster, 2001, Oberdorster et al., 1994, Oberdorster et al., 2005, Sager et al., 2008). Malgré cette différence de toxicité, les échantillons de TiO₂ fin et ultrafin sont tous deux considérés comme faiblement toxiques et peu solubles (ECETOC, 2013, NIOSH, 2011). Ainsi, il est nécessaire de réévaluer la classification du TiO₂ en fonction de sa taille ; comme évoqué précédemment.

2.1.2. Surface spécifique

La surface spécifique représente la surface totale des particules normalisée par la masse. Elle est souvent corrélée à la taille des particules. La méthode la plus utilisée pour la déterminer est celle qui utilise la théorie Brunauer, Emmett et Teller (BET, (Brunauer et al., 1938). Elle est basée sur l'adsorption à basse température d'azote ou de krypton radioactifs à la surface de l'échantillon.

De nombreuses études ont montré qu'il est plus pertinent de prendre en compte le paramètre « surface » plutôt que celui de « masse », afin de déterminer l'activité biologique des NP et leur toxicité. (Donaldson et al., 1998, Ferin et al., 1992, Monteiller et al., 2007, Oberdorster, 1996, Oberdorster et al., 1992, Oberdorster et al., 1994, Sager and Castranova, 2009, Sager et al., 2008). Oberdorster et coll. ont mis en évidence une corrélation entre la surface totale des particules de TiO₂ et les effets inflammatoires pulmonaires observés. En exposant des rats par inhalation à la même dose ($\approx 20 \text{ mg/m}^3$) de particules ultrafines (20 nm de diamètre) et fines (250 nm de diamètre) de TiO₂ (anatase) pendant 12 semaines, les auteurs ont observé que les particules ultrafines entraînaient une réponse inflammatoire plus

importante avec un afflux de neutrophiles. Ces observations ont confirmé des résultats précédent par instillation intratrachéale de particules ultrafines de TiO₂ (20 nm, anatase) chez le rat et la souris (Ferin et al., 1991, Oberdorster et al., 1992). En exprimant cette fois-ci, la dose administrée en terme de surface totale de particules, les particules ultrafines et fines induisent une réponse inflammatoire identique, à surface équivalente (Figure 3) (Oberdorster et al., 1994, Oberdorster et al., 2005).

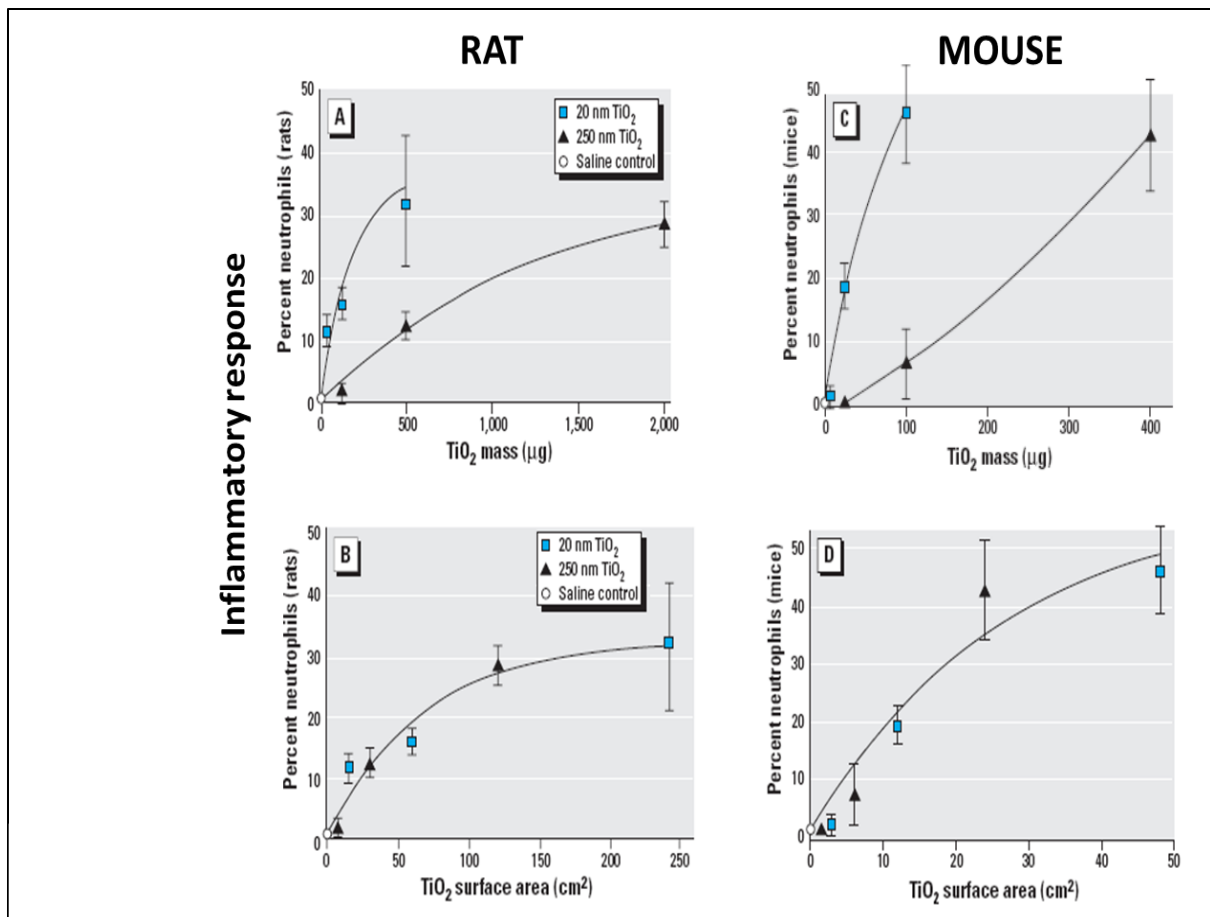


Figure 3: Pourcentage de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire de rats (A, B) et de souris (C, D), indicateurs d'une inflammation 24 h après instillation intratrachéale de différentes doses de particules de TiO₂ (20 nm et 250 nm).

(A, C) En exprimant la dose en terme de masse, les particules ultrafines entraînent une réponse inflammatoire plus importante. (B, D) En exprimant la dose en termes de surface totale, les particules ultrafines et fines induisent une réponse inflammatoire identique, à surface équivalente. Le paramètre surface semble donc plus pertinent pour comparer les effets de particules de différentes tailles. Moyennes et écart-types sont représentés sur les courbes (Oberdorster et al., 2005).

2.1.3. Charge de surface

La charge de surface des particules (charge électrique présente à une interface et toujours présente quand l'objet est placé dans un fluide) influence leur réactivité, leur absorption, la réponse biologique et la toxicité (Florence, 2005, Geys et al., 2008, Herlin-Boime et al., 2013, Shah et al., 2012, Torrano et al., 2013). Notamment, les particules chargées positivement sont mieux absorbées que les particules neutres ou chargées négativement (Florence, 2005). D'autre part, Geys et coll. ont mis en évidence une implication de la charge de surface sur l'effet prothrombotique et la toxicité aiguë de forte dose de quantum dots, des nanoparticules couramment utilisées en imagerie *in vivo* (Geys et al., 2008).

2.1.4. Modification de surface

La toxicité des NP dépend de leur surface ou revêtement, ainsi que de la présence de composés chimiques adsorbés en surface. Ainsi, les NP de TiO₂ utilisées dans les crèmes solaires, sont généralement recouvertes de matériaux supprimant leurs propriétés photocatalytiques, tel que magnésium, silice, aluminium, alumine ou zirconium, afin d'éviter la formation d'ERO suite à une exposition au soleil (Contado and Pagnoni, 2008, Labille et al., 2010). De plus la présence d'impuretés, notamment métalliques, peut influencer la toxicité des NP. Warheit et coll. ont administré chez le rat par inhalation ou instillation intratrachéale, des échantillons de TiO₂ (rutiles, 290-440 nm) ayant subi différents traitements de surface. Ils ont montré que seules les formulations de particules de TiO₂ traitées en surface avec les plus fortes doses d'alumine ou de silice amorphe, entraînaient des effets indésirables pulmonaires par inhalation (1130–1300 mg/m³ pendant 4 semaines) / instillation (2 et 10 mg/kg) chez le rat (Warheit et al., 2005).

D'autre part, Horh et coll. ont étudié le rôle de la surface et du revêtement de surface (hydrophile ou hydrophobe) dans l'inflammation pulmonaire, suite à l'instillation intratrachéale (1 ou 6 mg) de TiO₂ fin (180 nm) et ultrafin (20-30 nm). La surface hydrophobe semble moins active, même si les écarts observés ne sont pas statistiquement significatifs. Cependant, ils ont conclu que la réponse inflammatoire pulmonaire est d'avantage influencée par la surface totale que la nature du revêtement (Hohr et al., 2002). Dick et coll. ont observé après instillation intratrachéale de particules ultrafines de TiO₂ chez le rat (20 nm; 49.8 m²/g), que la formation de radicaux libres en surface serait impliquée dans la réponse pulmonaire (Dick et al., 2003). Enfin, Rahman et coll. ont effectué une analyse toxicogénomique suite à l'instillation intratrachéale chez la souris de 6 NP de TiO₂ de taille (8, 20, 300 nm), de structure cristalline (anatase, rutile ou anatase/rutile), ou de revêtement de surface (hydrophobe ou hydrophile) différents. Ils ont noté une réactivité plus importante concernant la surface hydrophile. Ainsi, les modifications de surface influencent la sévérité de l'inflammation pulmonaire (Rahman et al., 2017).

2.1.5. Structure cristalline

Le TiO₂ existe sous forme amorphe ainsi que sous 3 formes cristallines : anatase, rutile, la plus présente sur Terre, et brookite. La structure cristalline peut influencer la toxicité du TiO₂. La forme brookite possède une structure cristalline orthorhombique ; tandis que les formes anatase et rutile ont une structure cristalline quadratique. La forme anatase possède une plus grande activité photocatalytique, se traduisant notamment par une plus grande capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) en présence de lumière. Ceci contribue à augmenter sa toxicité. Sayes et coll. ont mis en évidence une cytotoxicité *in vitro* de NP d'anatase 100 fois supérieure à celle de NP de rutile (~ 3–10 nm, 3 µg/mL-3 mg/mL), semblant corrélée avec la formation d'ERO (Sayes et al., 2006). Warheit et coll. ont observé

par instillation intratrachéale (1 ou 5 mg/kg) chez le rat, une augmentation de la réponse inflammatoire pour un mélange anatase/rutile P25 ultrafin (~25 nm) comparé à la forme rutile pure fine (~300 nm) et ultrafine (~100 nm) (Warheit et al., 2007b). Inversement, Rahman et coll. ont observé par instillation intratrachéale unique chez la souris, que les NP de rutile (20 et 21 nm) induisaient une réponse inflammatoire plus forte, un plus grand nombre de gènes différenciellement exprimés, ainsi que des changements histopathologiques de type fibrose, à la plus forte dose soit 486 µg/souris (Rahman et al., 2017).

2.1.6. Forme

La forme des nanoparticules peut influencer leurs propriétés et donc leur toxicité. Ainsi, les nanotubes de TiO₂ sont plus toxiques que les nanosphères de diamètre équivalent. En effet, ils ont tendance à s'accumuler dans les tissus, étant plus difficilement éliminés, induisant inflammation et fibrose (Porter et al., 2013). De plus, ils possèdent une activité photocatalytique augmentée par rapport aux nanosphères de structure cristalline et surface spécifique identiques, entraînant une production accrue d'ERO et donc une toxicité supérieure (Wu et al., 2010). D'autre part, les nanotubes longs sont plus toxiques et provoquent une inflammation plus importante que les nanotubes courts (Hamilton et al., 2009, Porter et al., 2013).

2.1.7. Etat d'agglomération/agrégation

Les particules ont tendance à former des agrégats soit un ensemble de particules comprenant des particules fortement liées ou fusionnées, et/ou des agglomérats soit un amas de particules unitaires ou d'agrégats, reliés par des liaisons faibles. Ces agrégats/agglomérats ont des tailles comprises entre 0,1 et plusieurs dizaines de microns (INRS, 2013). Les propriétés physico-chimiques ainsi que les effets biologiques peuvent être différents de ceux

observés avec les particules idéalement dispersées. Notamment l'activité photocatalytique du TiO₂ diminue avec l'augmentation de son état d'agglomération/agrégation (Li et al., 2010a).

De plus, la taille des agglomérats/agrégats influence la réponse biologique. Okuda-Shimazaki et coll. ont montré que des agrégats/agglomérats de taille moyenne de 596 nm, issus de particules unitaires de TiO₂ P25 d'environ 20 nm, avaient un impact plus important sur l'expression de gènes et la viabilité de la lignée leucémique monocytique humaine THP-1 que des agrégats/agglomérats plus petits, de 166 nm (Okuda-Shimazaki et al., 2010). Dans une autre étude, Noel et coll. ont testé par inhalation chez le rat la toxicité pulmonaire d'aérosols nanostructurés issus de 3 nanopoudres de TiO₂, composés de particules de taille unitaire de 5, 10-30 ou 50 nm, et générés sous forme d'aérosols contenant de gros (> 100nm) ou de petits agglomérats (< 100nm). Les résultats montraient que les aérosols les plus agglomérés induisaient une réponse inflammatoire plus importante alors que les aérosols les moins agglomérés étaient plus cytotoxiques (Noel et al., 2013a).

La taille des agglomérats influence également le dépôt des particules dans le système respiratoire. En effet, ils sont comparables à des particules ayant un diamètre aérodynamique équivalent, et vont donc se déposer de manière différentielle dans les différentes régions de l'appareil respiratoire. En outre, la reconnaissance et la phagocytose des particules par les macrophages alvéolaires dépendent fortement de leur taille. Ainsi, des particules de 20 nm seront moins efficacement phagocytés que des particules ou des agglomérats/agrégats de plusieurs centaines de nanomètres (Oberdorster et al., 2005). Enfin, la dynamique d'agglomération/désagglomération des nanoparticules au contact des fluides biologiques et en particulier du surfactant pulmonaire, n'est pas bien caractérisée.

2.2. Voies d'exposition

La voie principale d'exposition professionnelle aux NP de TiO₂ est l'inhalation. Elles peuvent également pénétrer dans l'organisme par voie orale, lors de l'ingestion d'aliments en contenant. Elles peuvent ainsi passer dans la circulation et s'accumuler ensuite dans le foie, la rate, les poumons et les reins. Cette voie est moins pertinente dans le cadre de l'exposition professionnelle. Le passage percutané pourrait se produire suite à l'application de cosmétique ou crème solaire notamment. Enfin, les NP peuvent pénétrer par voie IV principalement dans le contexte de la nanomédecine (INRS, 2013).

2.2.1. Inhalation

L'inhalation est la voie principale d'exposition aux NP de TiO₂. Cette voie sera détaillée en partie 3.3.

2.2.2. Voie orale / Absorption gastro-intestinale

La principale source d'ingestion de particules de TiO₂ est la nourriture. En effet, l'additif E171 est fréquemment utilisé dans l'industrie agroalimentaire. Il est également utilisé comme colorant (CI 77891) entrant dans la composition des médicaments, ou comme excipient dans les vaccins. En outre, une partie de nanoparticules inhalées est transportée, lors de son élimination, par l'ascenseur mucociliaire vers les voies digestives.

L'absorption est influencée par la taille ; en effet, elle est d'autant plus importante que le diamètre des NP diminue (Florence, 2005). Wang et coll. ont administré une forte dose (5 g/kg) de NP de TiO₂ (25 et 80 nm, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co.Ltd.) chez la souris par gavage (Wang et al., 2007a). Ils ont observé une absorption des NP par le tractus gastro-intestinal et un transport via la circulation sanguine, vers d'autres tissus ou organes tel que le foie, la rate, les reins et les poumons. Une autre étude a montré un faible taux

d'absorption gastro-intestinale de NP de TiO₂ (75 ± 15 nm ; anatase) administrées chez le rat, par voie orale à différentes doses de 0, 10, 50, 200 mg/kg, pendant 30 jours, et une absence de migration dans la circulation sanguine (Wang et al., 2013). La faible perméabilité de la barrière intestinale ainsi que la formation d'agglomérats de grande taille, environ 2 µm, dans le tractus gastro-intestinal, peuvent expliquer ces taux d'absorption et de translocation limités. La plupart des études menées chez le Rat et l'Homme, ont également montré une faible absorption intestinale de TiO₂ (Cho et al., 2013, Geraets et al., 2014, Jones et al., 2015). Cependant, une publication de l'INRA a récemment montré que le TiO₂ E171 (118 ± 53 nm), est capable de traverser la barrière intestinale via les plaques de Peyer, et d'atteindre le foie, suite à une administration orale de 10 mg/kg pendant 7 jours. Aucune altération de la perméabilité intestinale n'a toutefois été observée (Bettini et al., 2017).

En milieu professionnel, l'absorption de nanoparticules par voie orale provient le plus souvent d'une contamination manuportée pouvant être la conséquence d'une mauvaise hygiène.

2.2.3. Exposition dermique

L'exposition dermique aux NP de TiO₂ se produit principalement lors de l'utilisation de cosmétiques et de crèmes solaires (filtre UV). Les travailleurs peuvent être exposés dans une moindre mesure lors de la fabrication ou de l'emballage de produits contenant des nano-objets. De nombreux auteurs se sont intéressés à la toxicité des NP de TiO₂ par voie cutanée sur des peaux saines et lésées, simulant une insolation cutanée. La plupart des études réalisées ont mis en évidence une absence de pénétration et d'absorption percutanée de ces NP *in vitro* (Senzui et al., 2010) ou *in vivo* (Adachi et al., 2010, NanoDerm, 2007, Sadrieh et al., 2010). Des auteurs ont observé que l'application de NP de TiO₂ sur la peau n'induisait pas d'effet promoteur de la cancérogenèse, dû probablement à leur absence de pénétration à travers

l'épiderme (Sagawa et al., 2012, Xu et al., 2011). En 2011, un rapport de l'Afssaps a précisé que « la pénétration cutanée du TiO₂ et du ZnO sous forme nanoparticulaire, semble limitée aux couches supérieures de la peau saine. Sur peau lésée, il n'est pas possible de conclure sur l'absence de pénétration cutanée bien qu'aucune étude ne montre le contraire non plus » (Afssaps, 2011a). En 2013, Jansen et coll. ont observé que les NP de TiO₂ peuvent pénétrer dans les couches externes de la couche cornée (cellules non viables), mais avec le renouvellement régulier de cette dernière, les NP ne s'accumulent pas (Jansen et al., 2013). Quelques études ont suggéré que les NP de TiO₂ pourraient pénétrer au-delà de la couche cornée. Cependant, elles présentent d'importantes limites méthodologiques mettant en question la validité de ces résultats et leur extrapolation aux humains : Tan et coll., effet non statistiquement significatif, Wu et coll., effet observé uniquement chez les souris sans poils, Sadrieh et coll., probable contamination des tissus (Sadrieh et al., 2010, Tan et al., 1996, Wu et al., 2009).

En 2015, le CSSC a publié une révision d'un avis sur la sécurité de l'utilisation du dioxyde de titane, de forme nanométrique, dans les produits cosmétiques (SCCS/1516/13). Ce rapport précise qu'il n'y a pas de preuve concluante d'une pénétration de NP de TiO₂ à travers la peau, vers les cellules viables de l'épiderme et souligne l'absence d'exposition systémique. Sur la base des preuves disponibles, le CSSC a conclu que l'utilisation de nanomatériaux de TiO₂ (caractéristiques précises, détaillées dans l'avis), à une concentration allant jusqu'à 25 % comme filtre UV dans les écrans solaires, peut être considérée comme ne présentant aucun risque d'effet indésirable chez les humains après application sur peau saine, intacte ou brûlée par le soleil. Toutefois, cela ne s'applique pas à l'utilisation de poudres ou produits pulvérisables, pouvant entraîner une exposition par inhalation à des nanoparticules de TiO₂ (Chaudhry, 2015).

En 2016, le TGA, l'organisme de réglementation des produits thérapeutiques en Australie, a publié un rapport présentant des conclusions similaires. En effet, ce rapport explique que la majorité des études ne montre pas de pénétration cutanée des NP de TiO₂ et ZnO. Ces NP resteraient en surface de la peau et dans la couche externe de la couche cornée, constituées de cellules kératinisées non-viables, mais n'atteindraient ni les cellules cutanées viables (y compris dans les peaux fragilisées), ni la circulation générale. Ainsi, en respectant les conditions d'applications des écrans solaires, il semblerait que les NP ne se retrouvent pas en concentration significative dans la circulation générale (TGA, 2016).

Cependant, une étude datant de 2015, a montré que la pénétration cutanée du TiO₂ semble dépendre de la taille des particules : les NP ≤ 4 nm peuvent pénétrer à travers la peau intacte, les NP de 4 à 20 nm peuvent potentiellement pénétrer les peaux intacte et lésée, les NP de 21 à 45 nm peuvent uniquement pénétrer une peau lésée, enfin les NP > 45 nm ne peuvent pas pénétrer à travers la peau (Larese Filon et al., 2015).

2.2.4. Voie intraveineuse

L'exposition par voie intraveineuse ne semblerait se produire que dans le cadre de la nanomédecine. A titre d'exemple, des nanocomposites coeur-coquille de TiO₂ noir, revêtus de silice mésoporeuse (mSiO₂), sont utilisés comme nanotransporteurs pour délivrer des principes actifs de manière ciblée, notamment de la doxorubicine dans des thérapies anticancéreuses (Ren et al., 2017).

2.3. Toxicité expérimentale

De nombreux auteurs se sont intéressés à la toxicité des NP de TiO₂ chez la souris ou le rat, à travers de multiples voies d'exposition. La voie d'exposition pulmonaire est la plus étudiée.

2.3.1. Toxicité pulmonaire : inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense physiologique se traduisant par la réponse d'un hôte contre des substances exogènes, notamment des particules ou microorganismes. Ce mécanisme doit permettre d'éliminer la/les causes de lésion cellulaires et enclencher le processus de réparation (Wong et al., 2016). L'inflammation induite par les particules est caractérisée par un afflux de granulocytes neutrophiles au niveau alvéolaire, résultant de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les macrophages alvéolaires ainsi que les cellules épithéliales. Ainsi, $\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$ sont deux cytokines majeures impliquées dans l'initiation de la réponse inflammatoire, en stimulant leur propre production d'une part, ainsi que celle d'autres chimiokines notamment IL-6 , IL-8 (CXCL8), CXCL1 et CCL2 (MCP-1). Ceci résulte en un recrutement et une activation de granulocytes neutrophiles au site de la lésion, qui vont ainsi libérer des chimiokines amplifiant le recrutement de leukocytes et la réponse inflammatoire. L'inflammation entraîne également la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), la dégranulation des granulocytes neutrophiles ainsi qu'un phénomène de « NETose » ; correspondant à un processus de mort cellulaire programmée, impliquant la formation de « pièges extracellulaires de neutrophiles » ou NET (Folkerts et al., 2001, Williams and Chambers, 2014). Ainsi, ces processus sont responsables d'effets délétères, pouvant conduire à terme, à des pathologies respiratoires, notamment bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et fibrose (Figure 4).

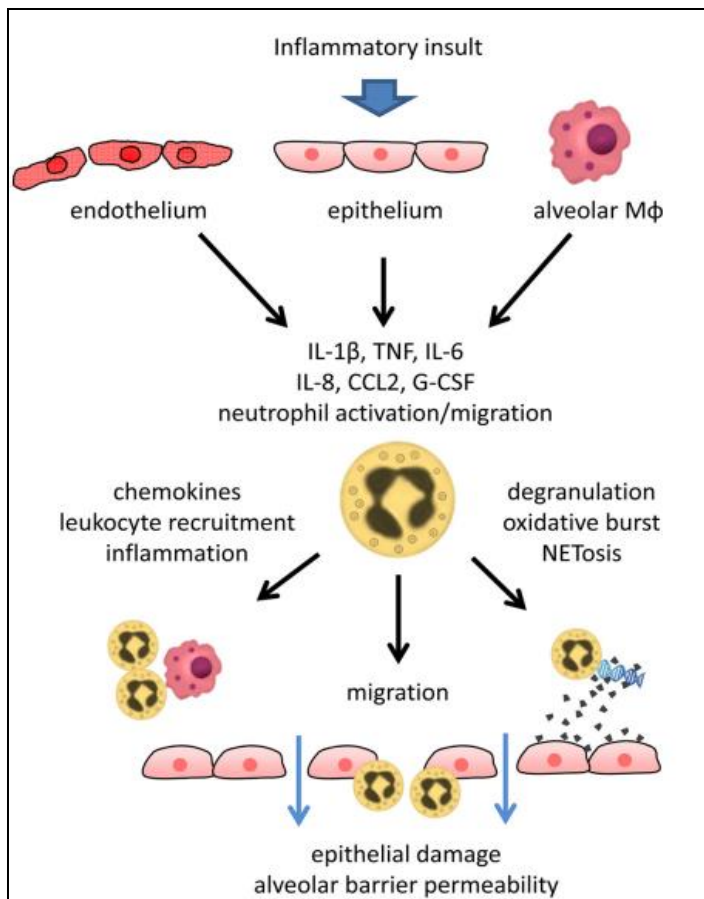


Figure 4: Réponse inflammatoire pulmonaire

Dans les mécanismes de réponse à l'inflammation pulmonaire, les macrophages alvéolaires vont sécréter différentes cytokines et chimiokines pro-inflammatoires notamment IL-1 β et CCL2. Ceci provoque le recrutement et l'activation de granulocytes neutrophiles au site de la lésion. Ils vont à leur tour libérer des chimiokines, amplifiant ainsi la réponse inflammatoire. Au cours de cette réponse, une phase de vasodilatation se produit. D'autre part, l'activation des neutrophiles provoque la libération d'ERO pouvant entraîner un stress oxydant, la dégranulation des granulocytes neutrophiles ainsi qu'un phénomène de NETose. Ces mécanismes peuvent être responsables d'effets délétères, conduisant à plus long terme, à l'apparition de pathologies pulmonaires.

Adapté de (Williams and Chambers, 2014)

Il est intéressant de noter que quel que soit le type de particules inhalées, il en résulte toujours une inflammation à court terme. Cependant, si cette inflammation devient chronique, elle peut conduire au développement de diverses pathologies : fibrose, BPCO, cancer (Shi et al., 2013, Song et al., 2016).

Les principaux effets observés suite à des expositions répétées par inhalation/institution sont locaux et systémiques ; se traduisant par la présence d'une réponse inflammatoire, une cytotoxicité, une prolifération, des altérations histopathologiques, des modifications de l'expression de certains gènes, ainsi qu'une cancérogenèse à long terme (cette partie sera développée dans les paragraphes 2.3.3, 2.3.4).

En effet, les études réalisées chez le rat, la souris et le hamster par inhalation ou institution intratrachéale, mettent en évidence la présence d'une inflammation pulmonaire (Bermudez et al., 2002, Bermudez et al., 2004, Lee et al., 1985, Liu et al., 2009, Ma-Hock et al., 2009, Roursgaard et al., 2011, Warheit et al., 2007b, Warheit et al., 1996b). Cette réponse inflammatoire se traduit par une augmentation du nombre total de cellules, principalement des polynucléaires neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA), ainsi que des macrophages alvéolaires. De plus, les NP de TiO₂, 2-50 nm, forme anatase, rutile, ou mélange anatase-rutile, par inhalation à raison de 2-50 mg/m³ ou institution intratrachéale de 500 µg à 50 mg/kg, peuvent entraîner une cytotoxicité se traduisant par une augmentation dans le LBA, des protéines totales, de l'activité d'enzymes tel que la gamma-glutamyl transférase (GGT), la lactate déshydrogénase (LDH), la phosphatase alcaline (PAL) et la N-acétyl-β-D-glucosaminidase (NAG), marqueurs de lésions tissulaires et cellulaires (Grassian et al., 2007, Halappanavar et al., 2011, Liu et al., 2009, Ma-Hock et al., 2009, Roursgaard et al., 2011). Une augmentation du taux de médiateurs cellulaires dans le LBA a également été rapportée suite à l'exposition de rats à des aérosols de NP de TiO₂ (≈ 25 nm, 86 % anatase et 14 % rutile, concentrations de 2, 10 et 50 mg/m³), notamment pour : MCP-1, MIP-2, haptoglobine, myéloperoxydase et ostéopontine (Ma-Hock et al., 2009). Le niveau d'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, G-CSF, Cxcl1, Ccl2, Ccl3, Ccl4, a augmenté après institution intratrachéale chez la souris de NP de TiO₂ de forme rutile, de 8-38 nm, aux doses de 162 et 500 µg (Halappanavar et al., 2015, Roursgaard et al.,

2011). Liu et coll. ont également observé par instillation intratrachéale (0.5, 5, ou 50 mg/kg) chez le rat de NP de TiO₂ (anatase de 5 nm, mélange 80 % anatase et 20 % rutile de 21 nm ; rutile de 50 nm), que les NP anatase de 5 nm entraînent une inflammation pulmonaire plus marquée que les NP de 21 et 50 nm (Liu et al., 2009).

Il est intéressant de noter que cette réponse inflammatoire diffère selon les espèces, le rat développant une inflammation plus sévère et persistante à dose pulmonaire retenue équivalente, tandis que le hamster présente une clairance pulmonaire plus rapide. Une augmentation du nombre de macrophages et/ou neutrophiles, a été mis en évidence chez les 3 espèces. Chez le rat et la souris, l'exposition par inhalation pendant 13 semaines à des particules de TiO₂ pigmentaire (rutile, 1.40 µm) entraîne une surcharge pulmonaire avec une diminution de la clairance des particules à de fortes concentrations (50 et 250 mg/m³). Une cytotoxicité est également observée, se traduisant par une augmentation de l'expression de LDH et des protéines totales dans le LBA à 10, 50 et 250 mg/m³. Chez les hamsters, l'élimination de particules est plus efficace et la cytotoxicité moins importante. Chez le rat, une prolifération de cellules pulmonaires, une altération de l'élimination des particules ainsi que des altérations histopathologiques se traduisant par des modifications épithéliales, métaplasiques et fibroprolifératives, ont été observées (Bermudez et al., 2002, Bermudez et al., 2004, Warheit et al., 1996b). De même, l'exposition de rats et souris par inhalation pendant 13 semaines, à des NP de TiO₂ P25 (21 nm), à une concentration de 10 mg/m³, provoque une inflammation pulmonaire, se manifestant par une augmentation du nombre de granulocytes neutrophiles et de macrophages, ainsi que par une augmentation de la concentration en LDH et protéines totales dans le LBA. Chez les hamsters, aucune modification significative n'a été observée, ce qui est probablement en lien avec leur capacité d'élimination rapide des particules des poumons. Les réponses chez les souris sont limitées

aux animaux exposés à 10 mg/m^3 , alors que des réponses sont également observées chez les rats exposés à 2 mg/m^3 . Enfin, les rats exposés à 10 mg/m^3 développent des lésions fibroprolifératives progressives, contrairement aux souris et hamsters (Bermudez et al., 2004). Ainsi, à charge pulmonaire retenue équivalente, les rats développent une réponse inflammatoire plus sévère que les souris et hamsters, ainsi que des modifications épithéliales, métaplasiques et fibroprolifératives, suite à une exposition par inhalation de particules de TiO_2 tant pigmentaires qu'ultrafines.

D'autre part, la taille, la concentration, la composition, la structure cristalline (rutile, anatase ou amorphe) et l'enrobage des particules, peuvent également influencer la réponse pulmonaire notamment au niveau inflammation ou lésion tissulaire (Bermudez et al., 2002, Bermudez et al., 2004, Roursgaard et al., 2011). Notamment, les NP de TiO_2 (anatase, 20 nm, $23,5 \pm 2,9 \text{ mg/m}^3$) entraînent une réponse inflammatoire plus forte au niveau pulmonaire que les particules fines (anatase, 250 nm, $22,3 \pm 4,2 \text{ mg/m}^3$) suite à une inhalation de 12 semaines chez des rats mâles Fisher 344 (Oberdorster et al., 1994). D'autre part, les NP de type rutile, anatase ou amorphe ne provoquent pas la même intensité dans la réponse inflammatoire, avec des résultats divergents selon les études (Roursgaard et al., 2011, Warheit et al., 2007b). Ainsi, suite à une instillation intratrachéale de 5, 50 et 500 μg chez la souris de NP de TiO_2 type rutile (8 nm), anatase (10,4 nm) ou amorphe, les auteurs ont observés que la forme rutile était la plus inflammogène, et la forme amorphe celle entraînant le plus de lésions tissulaires en lien avec les taux de protéines totales dans le LBA (Roursgaard et al., 2011). En revanche, Warheit et coll. ont observé par instillation intratrachéale (1 ou 5 mg/kg) chez le rat, une augmentation de la réponse inflammatoire pour un mélange anatase/rutile P25 ultrafin ($\sim 25 \text{ nm}$) comparé à la forme rutile pure fine ($\sim 300 \text{ nm}$) et ultrafine ($\sim 100 \text{ nm}$). Les auteurs concluent alors que l'inhalation de NP de TiO_2 de type rutile semble associée à un moindre risque d'effets indésirables pulmonaires (Warheit et al., 2007b). D'autre part, une étude

récente de toxicogénomique par instillation intratrachéale chez la souris a montré que la taille (8, 20 et 300 nm), la structure cristalline (anatase, rutile ou mélange) et les modifications de surface (hydrophobe ou hydrophile) pouvaient également induire des différences de nombre de gènes dérégulés, le plus grand nombre de gènes dérégulés étant observés avec la forme rutile. Cependant les mécanismes sous-jacents conduisant à l'inflammation pulmonaire sont identiques (Rahman et al., 2017) Ainsi, il est primordial de caractériser précisément et de manière adéquate les NP utilisées dans les études de toxicologie, comme mentionné précédemment.

D'autre part, des effets indésirables ont été rapportés chez des rats exposés par inhalation à un aérosol de NP de TiO₂ d'environ 25 nm, sous forme d'un mélange 86 % anatase / 14 % rutile, ou par instillation intratrachéale de NP de TiO₂ de forme anatase, de 5 nm de diamètre, aux plus fortes concentrations : 50 mg/m³ ou 50 mg/kg (Liu et al., 2009, Ma-Hock et al., 2009). En effet, des altérations histopathologiques se sont manifestées par une infiltration alvéolaire de cellules inflammatoires, un épaississement interstitiel et de la paroi alvéolaire (hypertrophie, hyperplasie) ; une augmentation du poids des poumons, ainsi que la présence de NP dans les ganglions lymphatiques. Ces altérations histopathologiques diffèrent également selon les espèces utilisées. Ainsi, le rat est plus sensible au développement de lésions fibroprolifératives progressives comparé aux hamsters et souris, comme mentionné ci-dessus (Bermudez et al., 2002, Bermudez et al., 2004)

Enfin, des modifications de l'expression de gènes principalement impliqués dans la réponse inflammatoire de phase aiguë, ou codant des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires notamment *Saa1*, *Saa3*, *Lcn2*, *C3*, *Cxcl1*, *Cxcl5*, *Ccl2*, ont été mises en évidence suite à l'exposition de souris à des NP de TiO₂ (rutile, 10-38 nm) par inhalation

(environ 40 mg/m³) ou instillation intratrachéale (162 µg) (Halappanavar et al., 2011, Halappanavar et al., 2015).

Un récapitulatif de ces différentes études est présenté en Annexe 1.

2.3.2. Toxicité extrapulmonaire

2.3.2.1. Exposition par voie orale

La toxicité par voie orale semble peu importante à court terme. En effet, une étude réalisée chez des souris exposées par gavage à une unique et forte dose de NP de TiO₂ (25 et 80 nm, 5 g/kg, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co. Ltd), n'a pas mis en évidence de toxicité systémique (Wang et al., 2007a). Cependant, une réponse inflammatoire se traduisant par une augmentation du niveau sérique des ASAT, ALAT et LDH, ainsi que de légères altérations histologiques hépatiques notamment des hépatocytes nécrosés, et rénales comme des protéines retrouvées dans les tubules rénaux et un volume glomérulaire augmenté, ont été observées. Une autre étude conduite chez des rats exposés à des doses plus faibles de NP de TiO₂ (anatase, 75 ± 15 nm) répétées pendant 30 jours (0 à 200 mg/kg), a montré que la toxicité orale différait entre les rats jeunes (3 semaines) et les adultes (8 semaines), les jeunes semblant plus sensibles. En effet, les rats adultes ont présenté de légères altérations hépatiques et rénales ainsi qu'une diminution de la perméabilité intestinale, alors que des œdèmes hépatiques et des lésions cardiaques ont été mises en évidence chez les rats jeunes (Wang et al., 2013). Récemment, une publication de l'INRA a montré que le TiO₂ E171 et le NM-105 administrés par voie orale (gavage, 10 mg/kg de poids corporel/ jour) chez des rats pendant une semaine, n'initiaient pas d'inflammation intestinale mais du titane a été détecté dans les cellules immunitaires des plaques de Peyer (Bettini et al., 2017).

Les effets à plus long terme résultants d'une exposition aux NP de TiO₂ par voie orale sont peu documentés. La plupart des études menées chez le rat et l'Homme, ont montré une faible absorption intestinale de TiO₂ (Cho et al., 2013, Geraets et al., 2014, Jones et al., 2015). Les résultats de 3 études de toxicité orale, dont une de 90 jours, réalisées par gavage chez le rat et se basant sur des lignes directrices OCDE, ont souligné l'absence ou la faible toxicité de particules de TiO₂, de taille et revêtement de surface variés. Les caractéristiques de ces études sont les suivantes : (i) rats mâles et femelles de 8 semaines, TiO₂ pigmentaire, type rutile, avec un revêtement de surface en alumine, $d_{50} = 145$ nm, gavage pendant 90 jours à des doses de 100, 300, ou 1000 mg/kg poids corporel/ jours ; (ii) rats mâles, TiO₂ pigmentaire, type rutile, sans revêtement de surface, $d_{50} = 173$ nm, gavage pendant 28 jours à une dose de 24 000 mg/kg poids corporel/ jour ; (iii) rats femelles, NP 79 % rutile / 21 % anatase avec un revêtement de surface en alumine et silice, $d_{50} = 73$ nm, simple administration à des doses de 175, 550, 1750 ou 5000 mg/kg de poids corporel (Warheit et al., 2015).

Cependant, des effets toxiques neurologiques, cardiovasculaires, ainsi que des lésions hépatiques, rénales, spléniques, et plus récemment l'apparition de lésions colorectales précancéreuses ; ont été rapportés suite à des expositions (sub)chroniques de rats à des NP de TiO₂ par voie orale. En effet, une étude de Hu et coll. datant de 2010, a mis en évidence un lien entre l'exposition par voie orale aux NP de TiO₂ (anatase, 5 nm) et des effets neurotoxicologiques, notamment une possible altération de la mémoire spatiale pouvant résulter d'une perturbation de l'homéostasie d'oligo-éléments ; d'enzymes et de neurotransmetteurs dans le cerveau de souris exposées par gavage à des doses de 5, 10 et 50 mg/kg de poids corporel pendant 60 jours. (Hu et al., 2010). En 2012, Sang et coll. ont observé des lésions chroniques de la rate chez des souris exposées oralement à des NP de TiO₂ (anatase, 5-6 nm) pendant 90 jours, par gavage à des doses de 2.5, 5 et 10 mg/kg de poids corporel, ainsi qu'une altération de l'expression de cytokines inflammatoires et

apoptotiques, associée à une baisse de l'immunité (Sang et al., 2012). En 2015, Chen et coll. ont montré que l'exposition orale à des NP de TiO₂ (anatase, 24 ± 5 nm) pouvait induire des effets indésirables cardio-vasculaires, même à faible dose, chez des rats de 3 semaines, par gavage à des doses de 2, 10, 50 mg/kg pendant 30 et 90 jours (Chen et al., 2015b). Une autre étude a révélé la présence de lésions hépatiques, rénales et cardiaques, ainsi qu'une altération de la réponse inflammatoire et du système immunitaire, suite à l'exposition de rats âgés de 3 semaines, à des NP de TiO₂ de type anatase, 24 ± 5 nm, par gavage à des doses de 2, 10 et 50 mg/kg par jour, avec ou sans consommation journalière de 1,8 g/kg de glucose pendant 30 et 90 jours (Chen et al., 2015a). Ces auteurs ont également montré des interactions entre le TiO₂ administré oralement et le glucose, suggérant la nécessité de limiter la co-exposition NP de TiO₂ et sucre chez les enfants, notamment dans les bonbons.

Récemment, l'étude de l'INRA a mis en évidence pour la première fois, une apparition de lésions colorectales précancéreuses suite à une exposition chronique (100 jours) de rats à l'additif E171 par voie orale, par gavage, 10 mg/kg de poids corporel/ jour (Bettini et al., 2017). Ces résultats ne permettent pas de conclure à des effets chez l'Homme. Cependant, de nouveaux effets ont été identifiés, notamment des effets promoteurs potentiels de la cancérogenèse.

2.3.2.2. Exposition cutanée

Des études de toxicité à court terme réalisées chez le lapin et la souris ont montré que le TiO₂ ultrafin n'était ni irritant, ni sensibilisant cutané (Warheit et al., 2007a). Dans ces études, 0,5 g de NP de TiO₂ (≈ 100 nm, mélange de 79 % rutile/21 % anatase) ont été appliqués sur peau saine, rasée de lapins, ainsi que 5 %, 25 %, 50 % et 100 % de ce mélange sur des oreilles de souris. Une autre étude de toxicité aiguë a mis en évidence des altérations biochimiques cutanées chez des rats de 8 semaines (mâles et femelles), après application

topique de NP de TiO₂ pendant 14 jours, de forme anatase ≈ 20 nm, à la concentration de 42 mg/kg de poids corporel (Unnithan et al., 2011). Cependant les doses utilisées sont importantes et ne reflètent pas les expositions humaines.

L'exposition cutanée à long terme aux NP de TiO₂ est peu documentée. En 2009, Wu et coll. ont observé *in vitro*, sur des peaux de porcs isolées, une absence de pénétration des NP de TiO₂ (forme anatase 4 et 10 nm, forme rutile 25, 60 et 90 nm, concentration finale en TiO₂ de 5 %) à travers la couche cornée, 24 h après exposition (Wu et al., 2009). *In vivo*, la même étude n'a mis en évidence aucun effet indésirable chez le cochon après administration de NP de TiO₂ de différentes tailles (application sur l'oreille droite de porcs de 24 mg de formulations contenant 5 % de TiO₂ (4 ou 60 nm) pendant 30 jours) au niveau de l'oreille, pendant 30 jours. Cependant, une pénétration des NP à travers la peau, une atteinte de différents tissus avec induction de lésions pathologiques dans plusieurs organes majeurs, principalement la peau et le foie ; ont été rapportées chez des souris sans poils après 60 jours d'exposition, suite à l'application sur environ 3 cm² de peau de 24 mg de formulations tests de TiO₂ 10 nm, 25 nm, 60 nm, Degussa P25 soit 400 µg de TiO₂ /cm². Toutefois, ces observations sont à analyser avec précaution. En effet, cette étude présente des limitations méthodologiques, notamment la possibilité d'une exposition orale par léchage, concernant les souris regroupées dans une même cage, au nombre de 6 (Wu et al., 2009).

2.3.3. Génotoxicité

La génotoxicité induite par les nanomatériaux a été observée en culture cellulaire ainsi que sur des modèles animaux. Les données obtenues à partir des modèles *in vitro* qui évaluent principalement la génotoxicité primaire, sont plus nombreuses. En effet, ces modèles semblent plus sensibles que les modèles animaux (Magdolenova et al., 2014). Cependant, il

est actuellement difficile de savoir si les tests de génotoxicité standards développés pour les substances ou les produits au sens du règlement REACH, sont adaptés aux nanomatériaux.

La génotoxicité des NP de TiO₂ demeure controversée (Charles et al., 2018, Moller et al., 2017). En effet, les résultats des études sont contradictoires et difficiles à interpréter, notamment en raison de la forte influence des conditions expérimentales comme le type de lignée cellulaire, ainsi que des caractéristiques des particules utilisées : taille, surface spécifique, forme cristalline, enrobage éventuel...

In vitro, les NP de TiO₂ peuvent être génotoxiques (Charles et al., 2018, Moller et al., 2017). En 2010, un rapport du CIRC analysant des études *in vitro* utilisant du TiO₂ fin et ultrafin ainsi que de l'ADN purifié, a mentionné une induction de lésions de l'ADN avec un effet plus important pour le TiO₂ ultrafin. Ces observations suggèrent la capacité de ces 2 types de particules à générer des ERO (IARC., 2010). Cependant, ce même rapport concluait que la majorité des études de génotoxicité *in vitro* donnaient des résultats négatifs. D'autres études ont mis en évidence la présence de lésions de l'ADN provenant de la formation d'ERO. Ainsi, Wang et coll. en 2007, ont montré un potentiel génotoxique des particules ultrafines de TiO₂ (6,57 nm), à raison de 26, 65 et 130 µg/ml pendant 6, 24 et 48h, sur une lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine (Wang et al., 2007b). En 2012, Guichard et coll. ont observé la capacité de NP de TiO₂ de forme anatase de 14 ± 4 nm, rutile de 10 ± 2 nm, ou Degussa P25 de 25 ± 6 nm ; à des doses de 1-50 µg/cm², à générer des ERO sur cellules d'embryons de hamster Syriens (SHE) après incubation pendant 24 à 72h. De plus, ils ont remarqué que les NP produisaient un niveau supérieur d'ERO comparé aux microparticules de masse équivalente (anatase 160 ± 48, rutile 530 ± 216); et que la forme anatase induisait les niveaux de radicaux libres les plus élevés (Guichard et al., 2012). Cependant, un test des comètes réalisé 24 h après l'exposition a révélé la présence de lésions de l'ADN similaires

entre les NP de forme anatase et les microparticules. Enfin, les auteurs n'ont pas observé la formation de micronoyaux 24 h après l'exposition, quelles que soient la taille et la structure cristalline des particules utilisées. En 2011, Shukla et coll. ont rapporté que NP de TiO₂ (anatase, ≈ 50 nm, 0.008, 0.08, 0.8, 8 et 80 µg/ml, 6h) induisaient une génotoxicité (test des comètes et micronoyaux) *via* la formation d'ERO sur la lignée cellulaire épidermique humaine A431 (Shukla et al., 2011). En 2016, Armand et coll. ont exposé des cellules A549 à de faibles doses de NP de TiO₂ pendant 2 mois (1–50 µg/mL, 86 % anatase/14 % rutile, 24 ± 6 nm), et ont observé un effet génotoxique *via* l'induction de lésions de l'ADN (test des comètes et détection des foyers 53BP1 par immunofluorescence) (Armand et al., 2016b).

In vivo, de rares études fiables permettant d'évaluer le potentiel génotoxique dans des modèles animaux, sont disponibles actuellement (Charles et al., 2018). Driscoll et coll. ont observé en 1997, une augmentation de la fréquence de mutation du gène *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (Hprt)* dans des cellules alvéolaires de type II, chez des rats exposés par instillation intratrachéale à des NP de TiO₂ de forme anatase (18 nm, 100 mg/kg) pendant 15 mois (Driscoll et al., 1997). Trouiller et coll. en 2009, ont mis en évidence chez la souris, le potentiel génotoxique de NP de TiO₂ P25 (75 % anatase/25 % rutile, 21 nm) dispersées dans de l'eau de boisson (60, 120, 300 et 600 µg/ml, 3 à 7 mL ingéré/souris/jour) *via* une augmentation de la fréquence des délétions et des cassures de l'ADN, une induction de la formation de foyers γ-H2AX (famille des histones H2A, membre X), de micronoyaux, de lésions oxydatives de l'ADN comme la formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ou 8-OHdG (Trouiller et al., 2009). En 2011, Sycheva et coll. ont rapporté l'apparition de lésions de l'ADN du foie et de la moelle osseuse de souris, suite à une exposition répétée par gavage à 40, 200 et 1000 mg/kg de poids corporel de NP de TiO₂ (anatase, 33 nm) pendant 7 jours (Sycheva et al., 2011). En 2012, Naya et coll. n'ont pas

observé de génotoxicité en réalisant un test des comètes chez des rats instillés intratrachéalement avec des NP de TiO₂ de forme anatase (Naya et al., 2012). En 2014, Chen et coll. ont montré que les NP de TiO₂ (anatase, 75 ± 15 nm) étaient génotoxiques *in vivo* chez le rat par gavage, aux doses de 10, 50 et 200 mg/kg de poids corporel/jour pendant 30 jours, et *in vitro* à raison de 5, 10, 20, 50 et 100 µg/mL sur cellules V79 (Chen et al., 2014b). Récemment, Li et coll. ont observé un effet génotoxique de NP de TiO₂ (anatase, 10 nm) dans le foie et le poumon de souris, suite à 3 injections intrapéritonéales par jour de 50 mg/kg (Li et al., 2017). Relier et coll. ont mis en évidence un effet génotoxique pulmonaire retardé après 3 instillations endotrachéales réalisées sur 8 jours, chez le rat pour des doses cumulées de NP de TiO₂ P25 de 0,5 ; 2,5 et 10 mg/kg ou 87, 437 et 1700 cm²/poumon (Relier et al., 2017). Cet effet était associée à une inflammation persistante à la plus forte dose uniquement soit 10 mg/kg, ce qui représente une surcharge pulmonaire.

Différents mécanismes peuvent être à l'origine de la génotoxicité des nanomatériaux. La génotoxicité primaire résulte de l'interaction directe des particules avec l'ADN ; de leur capacité à induire la production d'ERO en lien avec leur réactivité de surface ou la libération de molécules pro-oxydantes (Magdolenova et al., 2014, Pati et al., 2016, Schins and Knaapen, 2007, Wang et al., 2012). La génotoxicité secondaire concerne la libération d'ERO ou d'espèces réactives de l'azote lors d'une inflammation prolongée, résultant notamment de l'activation des neutrophiles comme mentionné dans le paragraphe 2.3.3 ; un autre mécanisme est médié par une surcharge pulmonaire (Borm et al., 2015). Dans ce cas, les NP n'agissent pas directement sur l'ADN.

Concernant les NP de TiO₂, les mécanismes conduisant à la génotoxicité ne sont pas encore élucidés actuellement. Il s'agirait principalement de génotoxicité secondaire à un stress oxydant entraînant la formation d'ERO (Charles et al., 2018, Gurr et al., 2005, Kang et al.,

2008). Toutefois, un mécanisme de génotoxicité primaire ne peut être exclu (Charles et al., 2018, Trouiller et al., 2009). En effet, les NP de TiO₂ pourraient en théorie, interagir avec l'ADN puisqu'elles ont été détectées à l'intérieur du noyau dans diverses études *in vitro* (Ahlander et al., 2013, Browning et al., 2014, Shukla et al., 2011). Cependant le mécanisme de pénétration n'est toujours pas connu actuellement. La génotoxicité induite par les particules peut à terme conduire à un processus de cancérogenèse.

2.3.4. Cancérogenèse

Les lésions de l'ADN représentent la 1^{ère} étape du processus de cancérogenèse induit par les particules suite à l'induction de l'activité mitotique : dans ce cas une lésion fixée d'un nucléotide peut se transformer en mutation par transition ou transversion, si celle-ci n'est pas réparée (Figure 5).

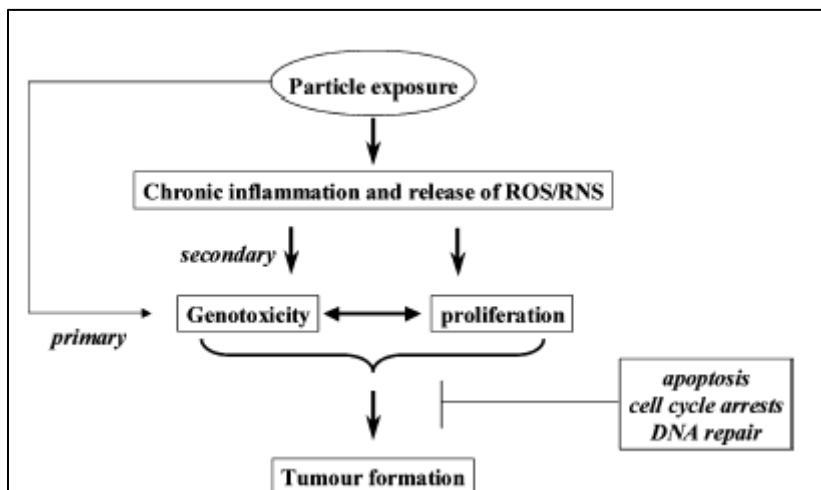


Figure 5: Implication des mécanismes de génotoxicité primaire et secondaire dans la cancérogenèse

Dans les mécanismes de cancérogenèse induits par les particules, ces dernières sont impliquées dans la génotoxicité et la prolifération cellulaire. La génotoxicité peut être primaire ou secondaire. La génotoxicité primaire concerne la formation de lésions de l'ADN par les particules en absence d'inflammation. La génotoxicité secondaire concerne l'attaque oxydante de l'ADN par les ERO, produites par les macrophages et/ou neutrophiles activés lors de l'inflammation induite par les particules. D'autre part, des effets génotoxiques se produisant sur des cellules en prolifération, peuvent conduire à des modifications génétiques irréversibles (mutagenèse) s'ils ne sont pas correctement réparés. A terme, ils peuvent ainsi être responsables d'un processus de transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse. Pour prévenir ces effets génotoxiques, la cellule a mis en place des mécanismes de défense comprenant un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN et le cas échéant, une apoptose de la cellule mutée (Schins and Knaapen, 2007).

Concernant l'exposition orale, aucun effet cancérigène n'avait été observé jusqu'à récemment (INRS, 2013). En effet, l'étude de l'INRA datant de janvier 2017 a mis en évidence pour la première fois, une apparition de lésions colorectales précancéreuses suite à une exposition chronique de rats à l'additif E171 par voie orale, comme expliqué précédemment (Bettini et al., 2017).

Les NP de TiO₂ ne semblent pas cancérigènes au niveau cutané, notamment dû à leur difficulté à atteindre leur cible, à savoir des cellules précurseurs de kératinocytes (Newman et al., 2009, Sagawa et al., 2012, Xu et al., 2011).

Suite à une exposition pulmonaire aux NP de TiO₂, une augmentation du nombre de tumeurs bénignes et malignes a été observée dans plusieurs études. Ce phénomène semble spécifique au rat. En effet, dans les mêmes conditions : TiO₂ pigmentaire, de forme rutil, de 220 nm, à la concentration de 250 mg/m³, ou TiO₂ ultrafin, de 21 nm, à la concentration de 10 mg/m³, aucun effet cancérigène n'a été observé chez la souris ni le hamster (Bermudez et al., 2004, Heinrich et al., 1995, Hext et al., 2005). D'autre part, à masse équivalente, l'effet cancérigène des NP est supérieur à celui observé pour les fines particules (FP) (Baan, 2007, Heinrich et al., 1995) ; d'où la nécessité de développer des recommandations distinctes pour les FP et NP, dans le cadre des expositions professionnelles. En effet, aucune VLEP spécifique au TiO₂ ultrafin n'a été proposée en France, comme mentionné précédemment. Seule une VLEP indicative de 10 mg/m³ a été définie dans l'air des locaux de travail.

Concernant les études par inhalation chez l'animal, Lee et coll. ont mis en évidence en 1985, le développement d'adénomes alvéolaires et de carcinomes épidermoïdes du poumon chez des rats exposés par inhalation pendant 2 ans, à de fortes concentrations de particules fines de TiO₂ : 250 mg/m³, rutil, MMAD 1,5 – 1,7 µm (Lee et al., 1985). Ces tumeurs

résulteraient d'une surcharge pulmonaire plutôt que d'un pouvoir cancérigène spécifique des particules fines de TiO₂ (Olin, 2000). En 1995, Heinrich et coll. ont montré la présence d'hyperplasie épithéliale, de fibrose et de tumeurs chez des rats femelles, exposés par inhalation à du TiO₂ ultrafin à la concentration de 10 mg/m³ pendant 2 ans. En revanche, l'incidence de tumeur pulmonaire chez les souris n'a pas été significativement affectée. Cet effet est plus important pour les NP comparé aux FP, à masse équivalente (Baan, 2007, Heinrich et al., 1995). En 2004, Bermudez et coll. ont souligné la présence d'une prolifération métaplasique focale, d'une fibrose alvéolaire progressive, chez des rats exposés par inhalation pendant 13 semaines, à du TiO₂ ultrafin (10 mg/m³, 21 nm) (Bermudez et al., 2004).

Concernant l'instillation intratrachéale, aucune différence dans l'incidence de tumeurs pulmonaires n'a été observée chez des souris exposées à 0.5 mg de TiO₂ par injection unique, de taille non spécifiée, ni chez des hamsters exposés de manière répétée à 3 mg de TiO₂ fin : 97 % < 5 µm et 51 % < 0,5 µm, une fois par semaine, pendant 15 semaines (IARC., 2010, INRS, 2013, Koizumi et al., 1993, Stenback et al., 1976). En 2000, Borm et coll. ont observé, chez des rats femelles, 129 semaines après instillation de TiO₂ fin, de 0,25 µm, à dose cumulée de 60 mg, et de TiO₂ ultrafin, de 21 nm, à dose cumulée de 30 mg ; la formation de tumeurs pulmonaires corrélée à une inflammation chronique (Borm et al., 2000). En 2005, une augmentation significative du nombre de tumeurs bénignes et malignes a été rapportée, chez des rats femelles, suite à des instillations intratrachéales répétées sur 30 mois, de TiO₂ ultrafin P25, de 25 nm, mélange 80 % anatase / 20 % rutile, à raison de 5x3, 5x6, 10x6 mg ; ainsi que de TiO₂ fin, AL 23-203-3, de 0,2 µm, de forme anatase, à raison de 10x6 et 20x6 mg (Pott and Roller, 2005).

En 2011, le NIOSH a classé le TiO₂ ultrafin comme « potentiellement cancérigène ». Ce potentiel cancérigène ne proviendrait pas d'une action directe du TiO₂, mais plutôt d'un mécanisme de génotoxicité secondaire associé à une inflammation pulmonaire persistante. En

effet, l'importante dose de TiO₂ retenue au niveau pulmonaire et sa biopersistance, associées à une surcharge des macrophages, peuvent être à l'origine d'une inflammation chronique. Cette inflammation prolongée entraîne la libération d'ERO, pouvant provoquer des lésions de l'ADN puis des mutations, et induire à long terme la formation de tumeurs (Figure 5) (Dankovic et al., 2007, Hervé-Bazin, 2007, INRS, 2013, NIOSH, 2011, Shi et al., 2013).

2.3.5. Reprotoxicité

Une exposition par voie orale chez le rat pendant 65 jours à des NP de TiO₂, ajoutées dans la nourriture à raison de 1 à 2 %, fabriquées par Riedel-de-Haën® et dont on ne possède aucune précision quant aux caractéristiques physico-chimiques ; ainsi qu'une exposition sous-cutanée chez la souris 3, 7, 10 et 14 jours post-coït, par injection de 100 µL de NP de TiO₂ à 1 mg/ml, de forme anatase, de 25-70 nm ; ont mis en évidence une diminution de la production de sperme ainsi que de la motilité des spermatozoïdes (El-Sharkawy et al., 2010, Takeda et al., 2009). Une exposition par inhalation chez la souris entre le 8^{ème} et 18^{ème} jour de gestation, à des NP de TiO₂ de forme rutile, de 97 nm, enrobées de polyalcools, à la concentration de 40 mg/m³, a montré la présence de très faible quantité de TiO₂ dans le lait maternel ainsi que dans le foie des nouveau-nés (Hougaard et al., 2010). De légères altérations neurocomportementales ont également été identifiées chez les nouveau-nés, notamment une modification de leur déplacement et de leur réaction face à un stimulus auditif. Une autre exposition par inhalation chez des rats femelles Sprague-Dawley entre le 7^{ème} et 20^{ème} jour de gestation, à des NP de TiO₂ de 170 nm, à la concentration de 10 mg/m³, a mis en évidence des résultats similaires, notamment une altération du comportement et des fonctions cognitives chez les ratons mâles, 5 mois après leur naissance (Engler-Chiurazzi et al., 2016). D'autre part, l'administration intraveineuse de 0.8 mg de NP de TiO₂ (forme rutile, 35 nm) chez la souris entre le 16^{ème} et 17^{ème} jour de gestation ; est responsable d'une baisse du poids corporel

maternel et fœtal, ainsi que du poids de l'utérus maternel (Yamashita et al., 2011). La présence de NP a été observée dans le placenta, ainsi que dans le foie et le cerveau fœtal. Récemment, une étude a mis en évidence pour la première fois un impact sur l'épigénome fœtal de l'inhalation d'un aérosol de NP de TiO₂ P25, 80 % anatase 20 % rutil, de 21 nm, à la concentration de 10 mg/m³, chez des rates en gestation (Stapleton et al., 2018). En effet, des changements épigénétiques et transcriptomiques significatifs ont été observés dans le tissu cardiaque des fœtus, principalement des altérations concernant l'adaptation immunitaire et la croissance des organismes.

2.3.6. Neurotoxicité

Les NP de TiO₂ peuvent se retrouver dans le système nerveux central (SNC) par translocation nasale via le bulbe olfactif ou en traversant la barrière hémato-encéphalique après translocation sanguine. En effet, une étude sur des modèles *in vitro* de BHE a suggéré un passage de cette barrière par les NP de TiO₂, résultant en une altération de sa perméabilité et de son intégrité, ainsi qu'une réponse inflammatoire (Brun et al., 2012). En 2008, Wang et coll. ont observé suite à une administration intranasale chez des souris femelles, de NP de TiO₂, de forme rutil de 80 nm, ou de forme anatase de 155 nm, une translocation des NP de TiO₂ vers le SNC via le bulbe olfactif, ainsi que des lésions oxydatives du tissu cérébral de type peroxydation lipidique, et une réponse inflammatoire se traduisant par une augmentation des niveaux de TNF α et IL-1 β concernant la forme anatase (Wang et al., 2008). En 2010, Li et coll. ont observé un passage de la BHE par les NP de TiO₂ de 3 nm, suite à des instillations intratrachéales répétées pendant 4 semaines, dont la dose totale était de 13,2 mg/kg ; induisant des lésions cérébrales par un mécanisme de stress oxydant (Li et al., 2010b).

2.3.7. Toxicité cardio-vasculaire

Une altération du système cardio-vasculaire a été observée suite à l'inhalation chez le rat, de NP de TiO₂ ultrafin P25, \approx 21 nm, à la concentration de 6 mg/m³ (Kan et al., 2014). D'autre part, une dysfonction endothéliale et une altération de la vasoréactivité artériolaire a été rapportée suite à l'inhalation corps entier chez le rat, de TiO₂ ultrafin P25, \approx 21 nm, à la concentration de 1,5-12 mg/m³ (Knuckles et al., 2012, LeBlanc et al., 2010, Nurkiewicz et al., 2008, Nurkiewicz et al., 2009). Ces effets sur la circulation sanguine, peuvent résulter de l'activation de mécanismes inflammatoires (Nurkiewicz et al., 2008).

2.4. Toxicité humaine

Les études épidémiologiques s'intéressant aux effets du TiO₂ sont peu nombreuses et présentent des limites méthodologiques comme le faible nombre de participants, une évaluation de l'exposition inadéquate, une co-exposition à d'autres nanoparticules (Bernstein, 2007, Binet et al., 2017, IARC., 2010, Liou et al., 2015). De plus, les rares études réalisées en milieu professionnel sont peu concluantes ; même si certaines ont rapporté des effets respiratoires et cardiovasculaires (Ichihara et al., 2013, Pelclova et al., 2012, Pelclova et al., 2016b).

Concernant le risque de cancer, seules quelques données concernant le TiO₂ sont disponibles actuellement. En 1987, une étude portant sur 209 employés travaillant dans une usine de TiO₂ dans laquelle la concentration en particules totales dans la zone de réduction (essentiellement du TiO₂) est maintenue entre 0,2 et 2,8 mg/m³, a mis en évidence la présence d'un épaissement pleural chez 17 % des sujets. Cependant, cette observation a été critiquée car les travailleurs avaient également été exposés à l'amiante dans le passé (Garabrant et al.,

1987). En 1988, Chen & Fayerweather ont réalisé une étude sur l'incidence et la mortalité par cancer parmi 1576 employés de 2 usines de production de TiO₂ aux USA, en s'aidant des registres des sociétés (Chen and Fayerweather, 1988). Les analyses de cohorte ont suggéré que les risques de développer un cancer du poumon et d'autres maladies respiratoires mortelles n'étaient pas plus élevés pour les employés exposés au TiO₂ que pour les groupes référents. Cependant, un certains nombres de défauts ont été observés dans cette étude, notamment le manque d'informations concernant l'exposition dont les dimensions du TiO₂ concerné, ainsi que des rapports médiocres sur la mortalité par cancer.

Ainsi un groupe de travail évaluant les monographies du CIRC a estimé que ces résultats n'étaient pas concluants, fournissant des preuves inadéquates de la cancérogénicité chez l'homme du TiO₂. En 1991, une étude réalisée à Montréal a suggéré une association entre exposition au TiO₂ et des risques excessifs pour le cancer du poumon à cellules squameuses et le cancer de la vessie (Siemiatycki et al., 1991). En 2001, Boffetta et coll. ont réévalué l'association entre exposition au TiO₂ et cancer du poumon observée dans l'étude de Montréal, en utilisant une classification légèrement différente des sujets exposés. En effet, bien qu'il était impossible d'attribuer des valeurs quantitatives aux niveaux d'exposition, 3 niveaux de concentration ont été déterminés : faible de 0.05 à 1 mg/m³ concernant les soudeurs à arcs et peintres avec rouleaux; moyen de 1 à 10 mg/m³ concernant les peintres avec aérosol en spray; et fort > 10 mg/m³ concernant les travailleurs mal protégés impliqués dans le broyage et ensachage du TiO₂ pigmentaire (Boffetta et al., 2001). L'exposition professionnelle au TiO₂ ne semble pas augmenter le risque de cancer du poumon. En 2003, une étude de cohorte rétrospective sur la mortalité chez 4241 travailleurs employés dans 4 usines de TiO₂ aux USA, n'a pas montré d'association entre l'exposition au TiO₂ et une augmentation du risque de décès par cancer ou d'autres maladies (Fryzek et al., 2003). La plus grande étude de cohorte épidémiologique disponible, a été effectuée chez 15 045 travailleurs

dans 11 usines de production de TiO₂ en Finlande, France, Allemagne, Italie, Norvège et au Royaume-Uni, dont les expositions moyennes sont estimées entre 0,2 à 0,4 mg/m³ par an dans les années 2000, et dont l'exposition cumulée médiane des travailleurs a été de 1,98 mg/m³ par an (Hext et al., 2005). Les résultats de l'étude n'ont pas suggéré d'effet cancérigène pulmonaire suite à l'exposition au TiO₂.

En résumé, le rapport du CIRC a conclu à des preuves suffisantes du pouvoir cancérigène du TiO₂ chez les rongeurs, mais à des preuves insuffisantes chez l'Homme (TiO₂ micrométrique et nanométrique), en se basant sur les études épidémiologiques. Ainsi, le CIRC a classé le TiO₂ comme « potentiellement cancérigène » (catégorie 2B) pour l'Homme (Baan, 2007).

Actuellement, il est nécessaire de réaliser de nouvelles études épidémiologiques afin de pouvoir conclure sur les effets des expositions professionnelles au TiO₂ (Liou et al., 2015). Cependant, un problème éthique peut se poser avec l'utilisation de volontaires humains lors d'expérimentations.

3. Etude de la toxicité pulmonaire des nanoparticules de TiO₂ dans un modèle murin

3.1. Physiologie de l'appareil respiratoire du rat et de l'Homme

3.1.1. Anatomie comparée des voies respiratoires

Les voies respiratoires ou aériennes représentent l'ensemble des conduits qui permettent le passage de l'air entre l'extérieur du corps et les poumons au cours de la ventilation (respiration). Les voies aériennes supérieures sont constituées par le nez (museau), la bouche, le pharynx ou carrefour aéro-digestif et le larynx. Les voies aériennes inférieures se composent d'une zone de conduction constituée de la trachée, des bronches souches et lobaires, des bronchioles, ainsi que d'une zone d'échange, les conduits et sacs alvéolaires et les alvéoles pulmonaires. Les voies aériennes interviennent dans les fonctions respiratoires : ventilation pulmonaire, défense contre des toxiques inhalés, humidification de l'air inspiré, mais également dans des fonctions non respiratoires, notamment la déglutition, la phonation, l'olfaction et le goût.

Concernant les rongeurs, leurs voies respiratoires sont étroites. Les cavités nasales sont constituées de cornets nasaux richement vascularisés et très ramifiés, ce qui permet d'augmenter la surface de contact de la muqueuse nasale et le brassage de l'air ambiant. Cette muqueuse permet de filtrer, humidifier, réchauffer ou rafraîchir l'air avant son arrivée dans les poumons. Le poumon est découpé en lobes par des scissures interlobaires profondes chez les rongeurs. Le poumon droit est le plus volumineux, et est constitué de 4 lobes : lobe crânial, moyen, caudal et accessoire (azygos). Le poumon gauche ne comprend qu'un unique lobe ; comme chez le rat, la souris et le hamster (Figure 6). Les voies respiratoires supérieures

étroites, le faible volume de la cavité respiratoire et la persistance du thymus prédisposent les rongeurs aux infections respiratoires (Detaillé, 2008).

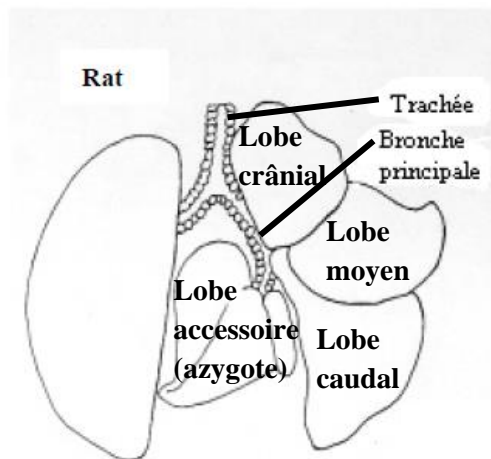


Figure 6. Anatomie des poumons du rat.

Chez l'Homme, le poumon droit comprend 3 lobes : supérieur, moyen et inférieur tandis que le gauche est divisé en 2 lobes : supérieur et inférieur. Les lobes sont également séparés par des scissures : scissure grande ou oblique, et petite ou horizontale, dans le poumon droit ; scissure oblique dans le poumon gauche. Chaque lobe est divisé en segments pulmonaires. Les bronches sont les conduits qui amènent l'air riche en dioxygène de l'extérieur du corps vers les poumons. La trachée se divise en 2 bronches souches principales droite et gauche, puis chacune se divise en bronches, bronchioles, bronchioles terminales, bronchioles respiratoires, canaux alvéolaires et sacs alvéolaires regroupant plusieurs alvéoles pulmonaires (Annexe 2).

Contrairement à l'Homme qui est capable de respirer à la fois par le nez et la bouche, le rat respire uniquement par le nez. D'autre part, le rat se déplaçant sur ces 4 pattes, la déposition des particules inhalées au niveau des voies aériennes sera différente de l'Homme.

Concernant les poumons, la répartition par lobes est différente entre les 2 espèces, et le rat ne possède pas de bronchioles respiratoires.

3.1.2. Histologie des alvéoles pulmonaires

Les alvéoles pulmonaires sont des petits sacs arrondis ou polyédriques délimités par une paroi alvéolaire, fine cloison commune à deux alvéoles voisines. La paroi alvéolaire permet de séparer l'air et le sang (échanges gazeux avec le sang), et est ainsi appelée barrière alvéolo-capillaire. Elle est constituée de 3 éléments : un fin épithélium particulier constitué de pneumocytes de type I et II, recouvrant un tissu conjonctif fin formant la charpente ou interstitium constitué de fibres de réticuline, collagène et élastine, fibroblastes, macrophages, lymphocytes, polynucléaires éosinophiles et mastocytes, entourant un riche réseau de capillaires. Des macrophages alvéolaires sont également présents afin d'assurer la défense pulmonaire.

L'épithélium alvéolaire est formé de pneumocytes de type I, cellules à fin cytoplasme, peu visible, couvrant la majeure partie de la surface alvéolaire. Ces cellules très aplaties, sont très sensibles aux toxiques inhalées et sont incapables de se diviser, présentant ainsi une capacité de réparation limitée. Leur rôle est d'équilibrer les gaz afin d'empêcher toute fuite de liquide. Les pneumocytes de type II, à cytoplasme vacuolaire et noyau volumineux, plus abondants, couvrent une surface alvéolaire plus réduite. Leur rôle est la sécrétion de surfactant, un agent tensio-actif qui diminue la tension superficielle, empêchant l'alvéole de se collaber. Les macrophages alvéolaires sont des composants essentiels du système immunitaire du tissu pulmonaire. Ils sont formés à partir des monocytes sanguins provenant de la moelle osseuse ou résultent d'une prolifération locale (Aggarwal et al., 2014a, Boitelle, 1997).

Ils phagocytent les petites particules et microorganismes atteignant les alvéoles. Suite à la phagocytose, ils migrent vers les voies respiratoires où ils sont éliminés par expectoration ou déglutition. D'autres macrophages vont migrer dans le tissu conjonctif et y déverser les produits de phagocytose (Figure 7). Les macrophages interstitiels sont moins nombreux ; et absents chez les rats.

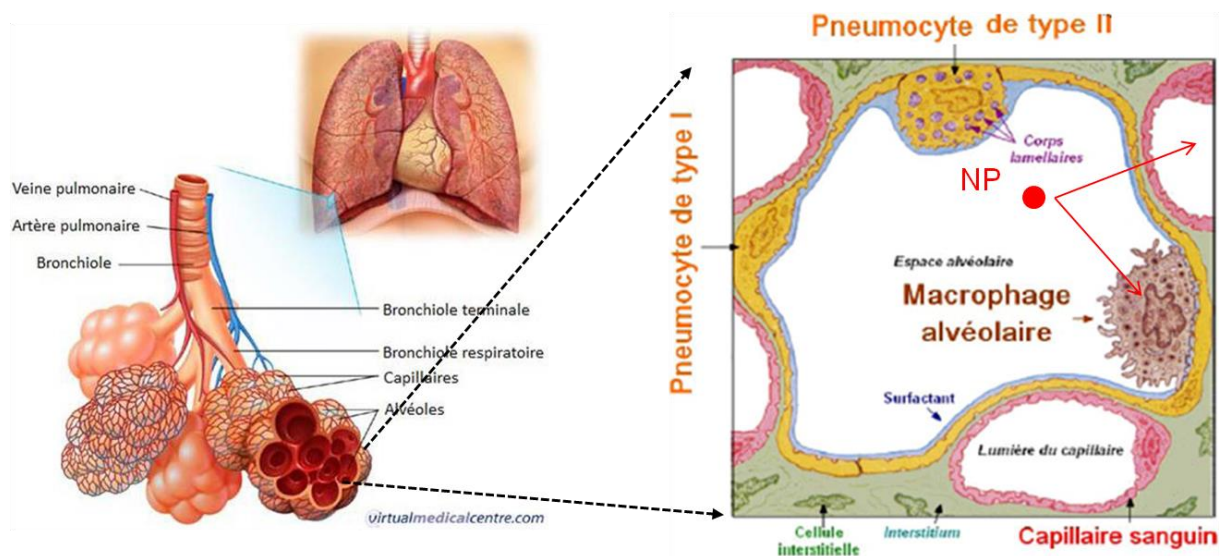


Figure 7: Histologie d'une alvéole pulmonaire humaine.

3.1.3. Physiologie des voies respiratoires

Les paramètres biologiques respiratoires diffèrent entre l'homme et le rat ; le rat possédant des fréquences respiratoires et cardiaques élevées. Les principales constantes biologiques et respiratoires sont présentées ci-dessous (Tableau III).

Tableau III : Principales constantes biologiques et respiratoires chez l'Homme et le rat (Bernstein, 2007, Detaille, 2008).

Paramètres		Homme	Rat	Ratio Rat/Homme
Longévité		80-85,6 ans	25-35 mois	X
Poids adulte	Mâle	77 kg (175 cm)	225-325 (g)	X
	Femelle	63 kg (163 cm)	267-520 (g)	X
Température corporelle (°C)		36,5-37,5	35,9-37,5	X
Fréquence respiratoire (cycles/minute)		12-20	71-146	X
Fréquence cardiaque (battements/minute)		50-80	250-400	X
Volume sanguin (mL /kg)		66-75 (≈5L pour 65 kg)	50-65	X
Ventilation minute (ml/min)		7000	100	0,014
Volume inhalé/6 h jour (ml)		2 520 000	36 000	0,014
Volume pulmonaire (ml)		4341	13	0,003
Surface alvéolaire (μm ²)		143 000 000 000 000	463 000 000 000	0,003
Nombre alvéoles/poumon		1 000 000 000	40 000 000	0,04
Nombre cellules alvéolaires/poumon		56000000000	130 000 000	0,002

3.1.4. Cohérence homme-animal

Des différences dans l'anatomie, l'histologie, la physiologie des voies respiratoires existent entre Homme et Rat comme détaillé précédemment. De plus, des différences ont également été observées dans la réponse pulmonaire résultant de l'inhalation chronique de

particules faiblement solubles et faiblement toxiques telles que le TiO₂, questionnant ainsi sur la pertinence du modèle animal rat.

Les rats sont considérés comme particulièrement sensibles à la toxicité pulmonaire induite par les particules faiblement solubles et faiblement toxiques (IARC., 2010). A titre d'exemple, des études ont montré que, à charge pulmonaire retenue équivalente, les rats développaient une réponse inflammatoire plus sévère ; ainsi que des modifications épithéliales, métaplasiques et fibroprolifératives, suite à une exposition par inhalation à des particules de TiO₂ pigmentaires et ultrafines (Bermudez et al., 2002, Bermudez et al., 2004, Warheit et al., 1996b).

Ainsi, le rat semble être le meilleur modèle animal pour évaluer le risque de cancer du poumon (Borm et al., 2015, Greim et al., 2001). En effet, même si une accumulation de particules dans les poumons profonds a été observée chez différentes espèces étudiées, le développement de tumeurs pulmonaires n'a été décrit que chez le rat. La souris, le hamster, les primates non humains, et l'Homme n'en développent pas. Il est maintenant bien établi que les effets pulmonaires (dont l'apparition de tumeurs) consécutifs à une inhalation chronique de particules faiblement solubles et faiblement toxiques, ne se produisent qu'à des expositions entraînant une accumulation de particules dans les poumons profonds dû à une altération significative de l'élimination pulmonaire et à leur biopersistance. Ce concept de surcharge pulmonaire a été introduit pour la première fois par Morrow en 1988 (IARC, 2010, Morrow, 1988).

Par conséquent, la pertinence du rat en tant que modèle pour l'évaluation chez l'homme, des dangers et des risques d'une exposition répétée aux particules faiblement solubles et faiblement toxiques est encore remise en question par un certain nombre d'évaluations critiques.

Cependant, le NIOSH a conclu, suite à l'évaluation des études expérimentales par inhalation et épidémiologiques disponibles, que les meilleures données à l'appui d'une évaluation quantitative des risques pour le TiO₂ proviennent d'études chroniques et subchroniques par inhalation chez le rat. Ces études ont fourni des données sur l'inflammation et la tumorigénicité en fonction des expositions, utilisables comme base pour l'évaluation quantitative des risques (Binet et al., 2017).

Enfin, il semblerait que cette plus grande sensibilité du rat aux réponses pro-inflammatoires d'une exposition chronique, s'explique par la différence de localisation des particules inhalées : majoritairement alvéolaire chez le rat ; dans l'interstitium pulmonaire chez l'homme (Warheit, 2013).

Ainsi toute VLEP basée sur des données chez le rat intégrerait un facteur de sécurité chez l'Homme (Binet et al., 2017).

3.2. Génération et caractérisation de l'aérosol

3.2.1. Génération de l'aérosol

Les méthodes de génération d'aérosols utilisés dans les études toxicologique par inhalation, sont regroupées en 3 grandes catégories : méthodes en voie humide, méthodes en voie sèche, et méthodes de synthèse directe (Figure 8) (Morimoto et al., 2013).

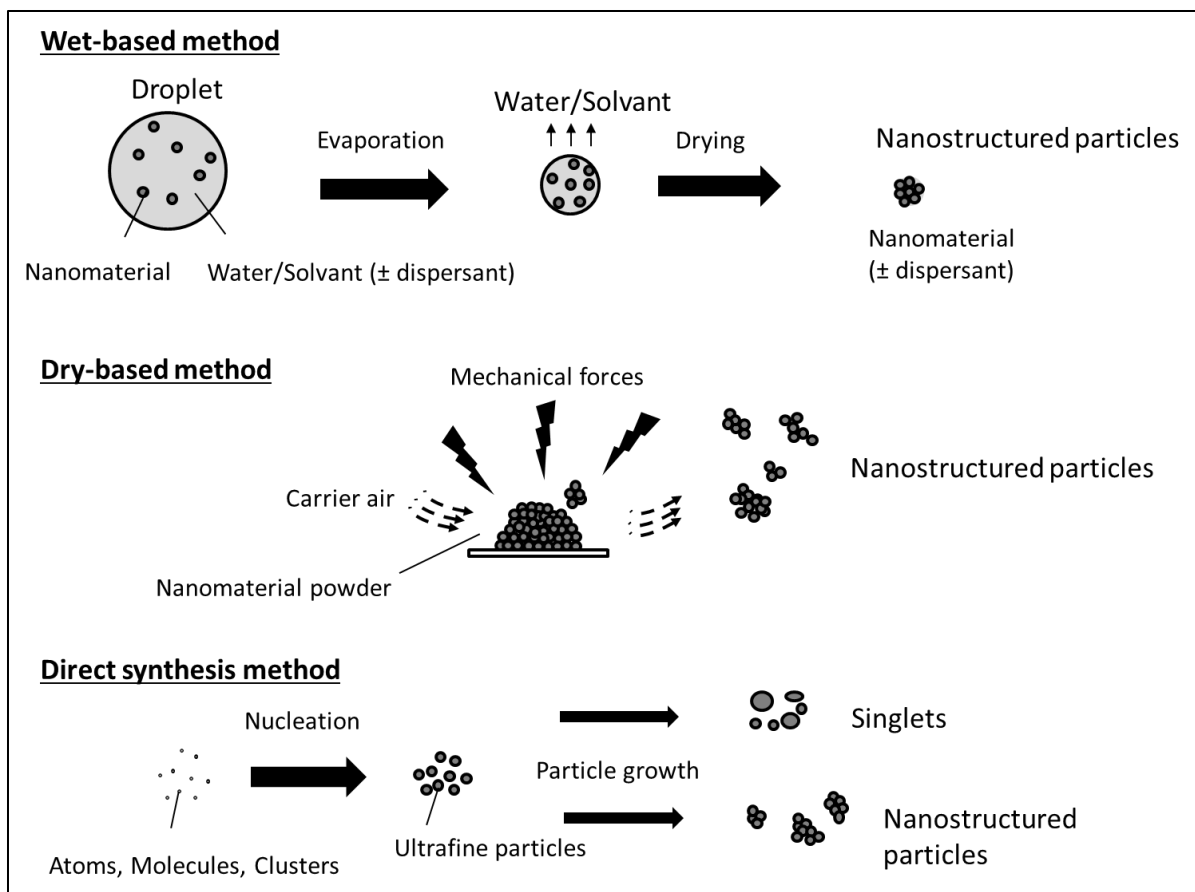


Figure 8: Représentation schématique des méthodes de préparation de nanomatériaux aérosolisés.

Les méthodes en voie humide, en voie sèche et de synthèse directe sont les 3 grandes catégories de méthodes de génération d'aérosol dans les systèmes d'inhalation.

D'après (Morimoto et al., 2013)

3.2.1.1. Méthodes en voie humide

Les nanomatériaux sont dispersés en solution aqueuse, principalement par sonication ; en ajoutant éventuellement un peu de surfactant pour stabiliser la suspension. Cette dernière est ensuite pulvérisée sous forme de gouttelettes, en utilisant notamment un atomiseur, un nébuliseur, un générateur à électronébulisation, ou un atomiseur à ultrasons. Puis l'eau est évaporée afin d'obtenir l'aérosol.

Différents facteurs influencent la taille des agglomérats de particules présents dans un aérosol ; notamment la concentration et l'indice de dispersion des particules, ainsi que la taille des gouttelettes générées (Noel et al., 2013a, Noel et al., 2013b). Ainsi, il est possible de

générer des aérosols constitués de petits (< 100 nm) ou grands (> 100 nm) agglomérats nanostructurés monodispersés, ou constitués de particules primaires notamment par électronébulisation (Figure 9.A). Grassian et coll. ont utilisé cette technique pour générer un aérosol à partir d'une suspension aqueuse de NP de TiO_2 de 2-5 nm. L'aérosol était constitué d'agglomérats de particules primaires, possédant un diamètre géométrique moyen de 128 nm (Grassian et al., 2007).

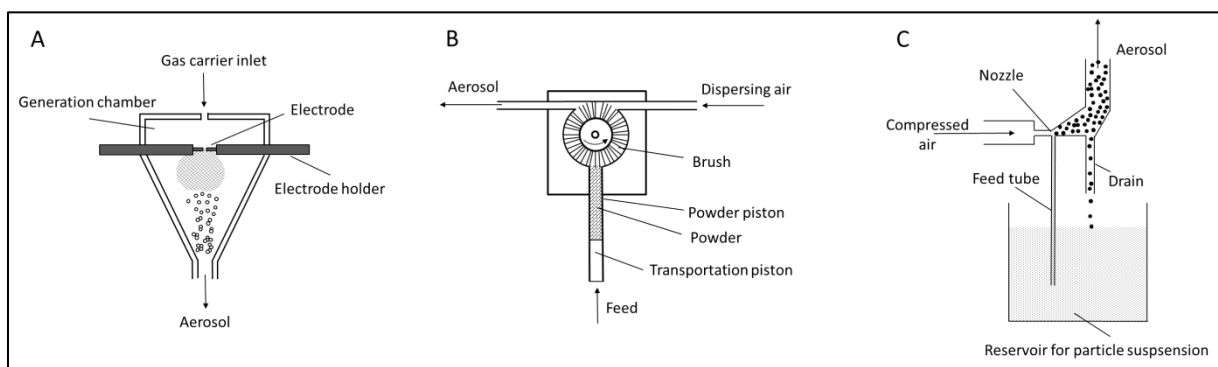


Figure 9: Exemples de générateurs d'aérosols.

A) Représentation schématique d'un générateur d'étincelles ; B) Représentation schématique d'un générateur à brosse rotative ; C) Représentation schématique d'un atomiseur

La méthode en voie humide semble la plus adaptée pour générer des aérosols de taille nanométriques, à partir de nanoparticules manufacturées.

Cependant, elle présente certaines limites. Tout d'abord, le solvant permettant la dispersion peut contenir d'éventuels contaminants. D'autre part, la mise en suspension ainsi que l'utilisation d'un surfactant, peuvent modifier les propriétés physicochimiques des nanomatériaux aérosolisés ; et donc impacter la réponse biologique induite. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser chez le groupe contrôle, un aérosol obtenu avec la même méthode de génération en utilisant la même solution aqueuse, afin d'évaluer leur impact sur la toxicité de l'aérosol nanostructuré.

3.2.1.2. Méthodes en voie sèche

L'aérosol est généré en appliquant sur une poudre nanostructurée sèche des forces mécaniques couplées à un flux d'air. La dispersion des nanomatériaux s'effectue grâce à différents dispositifs, notamment un générateur à brosse rotative comme celui utilisé dans notre étude, un générateur de poussière Wright, un générateur à lit fluidisé et un système acoustique contrôlé par ordinateur (Figure 9.B).

Cette approche est la plus fréquemment employée. En effets, les dispositifs sont simples d'utilisation, peu coûteux, et permettent de générer des aérosols nanostructurés de forte concentration. De plus, il n'est pas nécessaire d'appliquer un traitement préalable sur la poudre nanostructurée.

Cependant, il est très difficile avec cette technique, d'obtenir des aérosols constitués de nanoparticules primaires individualisées, ou de petits agglomérats (moins de 100 nm) (Morimoto et al., 2013, Noel et al., 2013b). Les forces appliquées par le générateur sur la poudre, sont souvent insuffisantes pour disperser les agglomérats (Kim et al., 2010, Valverde and Castellanos, 2007). L'agglomération dépend de la taille des particules primaires et de la concentration de l'aérosol généré. Les aérosols obtenus par cette approche sont généralement constitués de grands agglomérats de plusieurs centaines de nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres. Il existe peu de données en milieu professionnel, mais il semblerait que la manipulation de nanopoudres dans les procédés industriels, conduise à la génération d'aérosols nanostructurés de taille semblable à ceux obtenus avec ces méthodes en voie sèche (Curwin and Bertke, 2011, Pelclova et al., 2016a).

3.2.1.3. Méthodes de synthèse directe

Les aérosols sont générés directement à partir de précurseurs de nanoparticules se trouvant sous différents états : solide (générateur d'étincelles), liquide (plaque chaude) ou gaz

(flamme) (Figure 9.C). Les atomes ou molécules présents dans le précurseur, sont ensuite nucléés/condensés et/ou coagulés afin de former des nanoparticules solides (Figure 8) (Geiser et al., 2005, Ji et al., 2007, Morimoto et al., 2013, Ostraat et al., 2008).

Cette approche permet de générer des aérosols constitués d'agrégats/agglomérats monodispersés de nanoparticules inférieurs à 100 nm, qui sont ainsi plus petits que ceux obtenus avec les 2 techniques précédentes. Toutefois, la concentration des aérosols est la plus faible.

Les propriétés et la concentration de l'aérosol dépendent de la nature du matériau précurseur. De plus, les aérosols générés semblent peu représentatifs des situations d'exposition professionnelles. Enfin, des gaz et particules autres que les nanoparticules se forment souvent lors des processus de nucléation/condensation et/ou coagulation, et sont difficiles à éliminer. Néanmoins, cette approche permettrait une meilleure compréhension des propriétés toxicologiques des nanoparticules, ainsi que de leurs interactions avec les macromolécules biologiques.

3.2.2. Caractérisation de l'aérosol

Une caractérisation adéquate des particules primaires et des aérosols générés est essentielle dans les études de toxicologie par inhalation, puisqu'elle permet d'évaluer la fraction respirable de l'aérosol, d'estimer la dose déposée dans les poumons, ainsi qu'aider à identifier les paramètres physico-chimiques responsables des propriétés toxicologiques.

Dans ce contexte, des lignes directrices internationales ont été développées afin d'aider scientifiques et régulateurs à évaluer les risques liés aux nanomatériaux (ISO, 2016, OECD, 2016b). La première étape indispensable est la caractérisation approfondie des nanopoudres utilisées en dehors des méthodes de synthèse directe. Les principales propriétés physico-chimiques semblant les plus pertinentes à évaluer, sont l'état

d'agglomération/agrégation, la composition chimique avec la détermination des impuretés, la taille et la distribution des particules primaires, la forme, la solubilité/dispersibilité, la porosité/surface spécifique, la réactivité ainsi que la charge de surface (ISO, 2012, ISO, 2013, OECD, 2016a). Ces propriétés ont été détaillées précédemment dans le paragraphe 2, concernant la toxicité du TiO₂. Cependant, il est actuellement difficile d'identifier précisément tous les paramètres nécessaires pour l'évaluation de la toxicité des nanomatériaux.

La caractérisation des aérosols nécessite une instrumentation et des méthodes de mesure spécifiques. De nombreux équipements de prélèvements d'aérosols sont disponibles actuellement, tel que les instruments permettant des analyses en temps réel, ainsi que les échantillonneurs d'aérosols pour des analyses différées. Ils font appel à diverses technologies notamment électriques, optiques notamment le compteur optique de particules PALAS FIDAS, de diffusion, de condensation et des prélèvements sur filtre (Kulkarni et al., 2011).

Le choix de l'équipement adapté est complexe. En effet, il faut tenir compte des caractéristiques de la nanopoudre utilisée et de l'aérosol généré ; notamment sa distribution granulométrique qui peut s'étendre sur une large gamme de taille et varier énormément en fonction du type de nanopoudre. De plus, il est indispensable de connaître les spécifications des appareils notamment leur gamme de mesure, de concentration.

D'autre part, en fonction des propriétés physiques des particules et de la technologie de mesure utilisée, il est possible de n'obtenir qu'une simple estimation de la taille réelle des particules constituant l'aérosol. De plus, les particules primaires ont plutôt tendance à former des agglomérats ou agrégats. Afin de mesurer leur taille, ils sont assimilés à une particule sphérique équivalente de même diamètre, alors que les agglomérats sont rarement sphériques. Enfin, le diamètre médian des particules peut également différer pour un même aérosol, en fonction de l'équipement utilisé et du paramètre mesuré. Ainsi, Ma-Hock et coll. se sont

intéressés en 2007, à la distribution granulométrique de plusieurs particules dont le TiO₂ en utilisant un impacteur en cascade, un compteur optique de particules et un spectromètre de mobilité électrique SMPS. La granulométrie obtenue avec le SMPS est de 0,25 µm, celle obtenue avec le compteur optique de particules est de 0.55 µm tandis que celle obtenue avec l'impacteur en cascade est de 1,1 µm : celle-ci varie donc substantiellement en fonction de l'instrument de mesure (Ma-Hock et al., 2007). En effet, les paramètres mesurés diffèrent : le SMPS et le compteur optique de particules s'intéressent à la distribution en nombre de l'aérosol tandis que l'impacteur en cascade mesure la distribution en masse.

Ainsi, il est indispensable de combiner différents appareils de mesure afin d'obtenir une caractérisation précise et adaptée de l'aérosol généré (Tableau IV) (Cosnier et al., 2016).

Tableau IV : Caractérisation minimale d'un aérosol.

Paramètres	Equipement de laboratoire	Observations
Concentration en masse (mg/m³)	Filtre à membrane Microbalance oscillante à élément conique (TEOM®)	Différées Temps réel
Distribution en taille (f[masse])	Impacteur en cascade	Différées
Concentration en nombre (particules /cm³)	Compteur de particules à noyau de condensation (CNC)	Temps réel
Distribution en taille (f[nombre])	Analyseur de mobilité des particules à balayage (SMPS, Scanning Mobility Particle Sizer) Impacteur électrique basse pression (ELPI) Spectromètre APS	Temps réel
Charge électrique	Electromètre Impacteur électrique basse pression (ELPI)	Temps réel
Morphologie	Microscopie électronique (transmission + balayage)	Différées

3.3.Exposition des animaux

3.3.1. Réglementation en recherche animale

Dans les études de toxicologie par inhalation, il est indispensable de veiller au bien-être des animaux utilisés, en évitant ou minimisant toute gêne ou douleur. D'autre part,

l'utilisation de populations animales homogènes est nécessaire, afin de limiter les variations biologiques observées et d'augmenter la reproductibilité expérimentale. Ainsi, les rongeurs de laboratoire doivent posséder un fond génétique connu, être élevés et hébergés dans des conditions standardisées.

Dans ce contexte, la directive 2010/63/EU relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, insiste sur le principe des « 3R » (Russell and Burch, 1959); remplacer, réduire et raffiner l'utilisation des animaux en Europe (EU, 2010). Ce principe est une exigence juridique. L'objectif final est le remplacement total des expérimentations animales par des méthodes alternatives. Cette directive a été transcrite en droit français (Décret 2013-118).

3.3.2. Conditions environnementales

Les réglementations européenne et française imposent des normes sur les conditions expérimentales et d'hébergements des animaux, afin de leur apporter un maximum de bien-être, satisfaire leurs besoins physiologiques et éthologiques. Ces normes permettent également de limiter la variabilité expérimentale. Dans ce contexte, la température et l'humidité relative de l'air sont contrôlées. Concernant les souris et les rats, principalement utilisés dans les études par inhalation, il est nécessaire de maintenir la température entre 20 et 24°C et l'humidité relative entre 45 et 65 % (EU, 2010). De plus, le flux et le renouvellement d'air sont vérifiés en continu, afin d'assurer une respiration en adéquation avec les exigences physiologiques des animaux.

3.3.3. Methodes d'exposition

3.3.3.1. Inhalation oro-nasale

Les animaux sont placés dans des tubes de contention, afin d'exposer uniquement leur museau à l'aérosol (Figure 10.A). Ainsi, les contaminations de leur fourrure par les nanoparticules, et leur éventuelle absorption par voie digestive suite au toilettage, sont limitées. De plus, cette voie d'exposition permet d'obtenir une concentration d'exposition élevée, et de diminuer la quantité de nanoparticules utilisées en raison du volume réduit de la chambre (Oyabu et al., 2016).

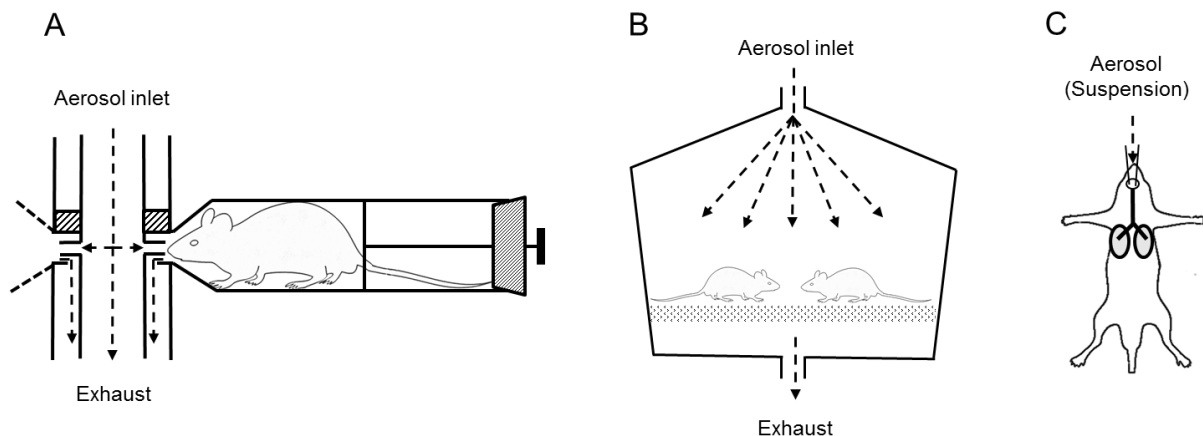


Figure 10: Représentation schématique des modèles d'exposition par inhalation chez le rongeur.

A) Système d'inhalation « nez seul » ; B) Inhalation corps entier ; C) Intubation endotrachéale

Cependant, la contention en contraignant les animaux, peut modifier des paramètres respiratoires et biologiques. Le stress se traduit par une augmentation du taux de corticostérone dans le sang (Scherer et al., 2011). Cette hormone sécrétée par le cortex surrénalien, est impliquée dans la régulation de l'énergie métabolique, les réponses au stress, ainsi que les réactions immunitaires (Rickard and Young, 2009). Elle est capable de diminuer la réponse inflammatoire résultant de l'inhalation de particules. D'autre part, la contention

peut augmenter la température corporelle. Dans ce contexte, Narciso et coll. ont précisé que la queue des rongeurs devrait se trouver en dehors des tubes de contention ou dans une zone plus froide, puisqu'elle est impliquée dans la thermorégulation (Narciso et al., 2003). Afin de minimiser le stress résultant de cette procédure, il est indispensable d'acclimater les animaux aux tubes de contention, avant toute exposition à des aérosols. D'autre part, il est important de traiter les animaux du groupe témoin d'une manière identique à ceux du groupe exposé ; afin de tenir compte de l'effet de la contention. Ainsi, les témoins sont également placés dans des tubes de contention, mais exposés à de l'air filtré (Cosnier et al., 2016)

3.3.3.2. Inhalation corps entier

Les animaux sont placés dans des chambres d'inhalation (Figure 10.B). La contention limitée permet de diminuer les contraintes et la manipulation des animaux. Ainsi, elle est plus appropriée pour des études par inhalation à long terme et répétées.

Cependant, une contamination par d'autres voies d'exposition est possible notamment orale et dermique, et peut influencer les effets observés suite à l'exposition à l'aérosol. Dans ce contexte, Griffis et coll. ont estimé que 60 à 80 % d'un aérosol radiomarqué de ^{99}Tc déposé sur la fourrure, pouvaient se retrouver dans le tractus gastro-intestinal de certains animaux exposés (Griffis et al., 1979).

D'autre part, le comportement des animaux peut influencer la quantité de particules inhalées. Ainsi, il est plus difficile de contrôler la dose atteignant le système respiratoire suite à une inhalation corps entier. En effet, le contrôle des aérosols s'effectue dans la chambre, mais pas directement dans la zone respiratoire des animaux, contrairement à l'inhalation « nez seul » où les contrôles sont réalisés au port d'inhalation. De plus, l'aérosol doit être distribué de manière homogène dans la chambre. Récemment, Oyabu et coll. ont exposé des rats à des NP de TiO_2 de type rutile, en utilisant 2 méthodes d'inhalation ; « nez seul » et corps entier.

Ils ont ensuite comparé le dépôt pulmonaire des NP et les effets sur la santé résultant des 2 types d'exposition. Ils ont observé dans les 2 cas, un dépôt et des modifications histopathologiques similaires (Oyabu et al., 2016).

3.3.3.3. Intubation endotrachéale

Une sonde endotrachéale est introduite dans la gueule de l'animal anesthésié, pour permettre d'administrer directement l'aérosol dans les poumons (Figure 10.C). Cette approche permet de mieux contrôler la dose délivrée dans le poumon. De plus, il est possible d'utiliser des nanomatériaux radioactifs ou des substances dangereuses, puisque l'aérosol est confiné. Cependant, elle contourne les voies aériennes supérieures et ne respecte donc pas les voies naturelles et physiologiques de pénétration des aérosols, de la même manière que l'instillation intratrachéale (Driscoll et al., 2000). D'autre part, l'anesthésie peut modifier les paramètres respiratoires de l'animal, influençant ainsi le taux de déposition des particules (Kreyling, 2016, Kreyling et al., 2009, Kreyling et al., 2002).

3.4. Dose déposée

3.4.1. Modèles de deposition

L'inhalabilité est l'efficacité selon laquelle les particules pénètrent dans le nez ou la bouche du fait de la respiration. Des calculs d'inhalabilité ont ainsi été développés, en tenant compte du diamètre aérodynamique des particules et de la vitesse du vent. Seules les particules inhalées auront ensuite une probabilité forte de se déposer dans les voies respiratoires (Hervé-Bazin, 2007). Le cas échéant, elles seront exhalées. Le dépôt total concerne la somme des probabilités de dépôt dans les 3 régions anatomiques : la région extrathoracique, l'arbre trachéobronchique et la région alvéolaire. Plusieurs mécanismes

interviennent dans le phénomène de déposition des particules inhalées au niveau des poumons (Figure 11) :

- la **diffusion**, ou mouvement « brownien » : mouvement aléatoire des particules provoqué par leur choc avec les molécules d'air. Ce phénomène augmente avec la diminution de la taille des particules. Ainsi, il est majoritaire pour les particules < 200-300 nm.
- les **effets électrostatiques** (attraction ou répulsion) concernant uniquement les particules électriquement chargées. Ce mécanisme agit faiblement sur la déposition des particules.
- l'**impaction** ; lors d'un changement de direction au niveau des voies aériennes, de nombreuses particules vont heurter la surface au lieu de suivre l'écoulement de l'air, et pourront alors s'y déposer.
- l'**interception** ; lorsqu'une particule se déplace tellement près de la surface des voies aériennes, qu'elle s'y dépose. Ce processus concerne principalement les particules agglomérées ou allongées de type fibres.
- la **sédimentation**, traduisant le dépôt des particules sous l'effet de la gravité. Elle concerne principalement les particules dont le diamètre aérodynamique est supérieur à 0.5 μm , possédant une masse et un temps de résidence dans les voies aériennes suffisants.

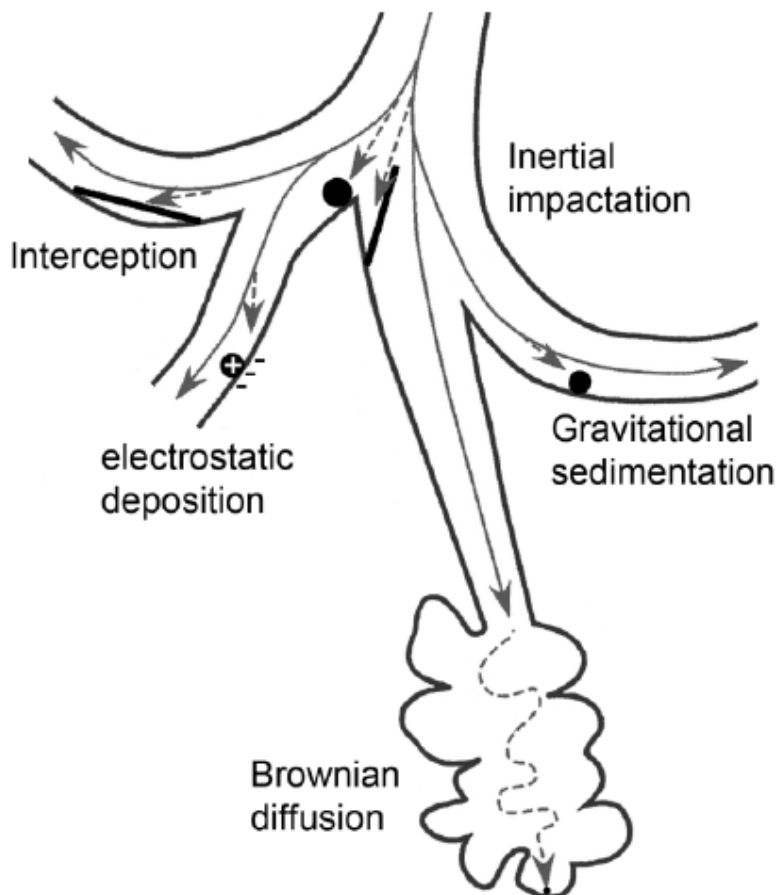


Figure 11: Mécanismes de déposition des particules inhalées dans les voies respiratoires. Les grosses particules sont soumises à l'impaction, préférentiellement dans les voies aériennes supérieures, les plus petites particules se déposent par sédimentation et les petites particules dans les alvéoles par diffusion. Le dépôt électrostatique est observé pour les particules chargées et l'interception pour les particules en forme de fibres. D'après (Froehlich and Salar-Behzadi, 2014).

Après leur dépôt, la toxicité des particules sera influencée par leurs propriétés physico-chimiques, telles que la réactivité de surface et la vitesse de dissolution. Les particules pourront ensuite être transloquées vers le sang et d'autres organes, pouvant entraîner des effets délétères sur la santé.

La dose déposée dans les différentes parties du système respiratoire peut être estimée à l'aide d'outils de modélisations. L'un des modèles les plus avancés est le modèle MPPD (Multiple-Path Particle Dosimetry Model), disponible gratuitement (*via* www.ara.com) (Anjilvel and Asgharian, 1995, Price et al., 2002). Initialement, ce modèle de calcul permettait d'estimer la dosimétrie des particules dans l'appareil respiratoire d'humains et de rats.

Actuellement, d'autres modèles ont été développés ; la souris, le singe, le cochon et le lapin. Ses domaines d'application sont l'évaluation des risques, la recherche et l'éducation.

Le modèle MPPD permet de calculer le dépôt et la clairance d'aérosols mono- et polydispersés dans le système respiratoire de rats, d'humains (adultes et enfants), et d'autres espèces, pour des particules de taille comprise entre 0.01 μm et 20 μm . Il permet de transposer des doses d'exposition utilisées *in vivo* chez le rat en doses d'exposition humaines réalistes, et inversement. En effet, les prédictions de l'algorithme sont en corrélation avec les données expérimentales observées chez le rat. En revanche, l'extrapolation de doses utilisées *in vivo* en doses utilisables *in vitro* pour des cultures cellulaires est plus complexe.

L'utilisation de ces modèles informatiques ne doit pas dispenser, quand cela est possible, de mesurer directement la quantité de nanomatériaux déposée au niveau pulmonaire. En effet, les propriétés toxicologiques d'un nanomatériau dépendent directement de la quantité en contact avec les tissus cibles, et non de la concentration atmosphérique. De plus, il est nécessaire d'évaluer le temps de rétention des particules dans les poumons, puisqu'il influence leurs propriétés toxicologiques. D'autre part, la solubilité des particules doit être connue puisque leur dissolution peut se produire au contact du liquide pulmonaire ou du contenu lysosomal. Enfin, la microscopie permet de s'assurer que les effets proviennent bien des nanomatériaux, et fournit des informations supplémentaires : forme, état d'agglomération des particules.

3.4.2. Déposition, rétention et élimination

Après inhalation, les particules sont soit exhalées, soit déposées dans différentes parties de l'appareil respiratoire, comprenant les voies aériennes supérieures : fosses nasales, bouche, pharynx et larynx ; l'arbre trachéo-bronchique : trachée, bronches et bronchioles ; ainsi que les alvéoles pulmonaires (Donaldson et al., 2008, Miller, 2000). Leur dépôt, selon

les mécanismes décrits plus haut, dépend de nombreux paramètres, notamment le diamètre, la taille des particules et agrégats/agglomérats, ainsi que leur comportement dans l'air. Ainsi, les particules possédant un diamètre compris entre 10 nm et 100 nm, se déposent principalement dans les alvéoles pulmonaires ; de manière beaucoup plus importante que les particules micrométriques dont le dépôt se fait préférentiellement dans les voies aériennes supérieures. Les particules plus petites (< 10 nm), se déposent surtout dans les voies aériennes supérieures et un peu dans la région trachéo-bronchique. Pendant un effort ou chez les personnes souffrant de problèmes pulmonaires comme les bronchites chroniques, la pénétration des nanomatériaux par voie respiratoire est plus importante (Figure 12) (Froehlich and Salar-Behzadi, 2014, Oberdorster et al., 2005).

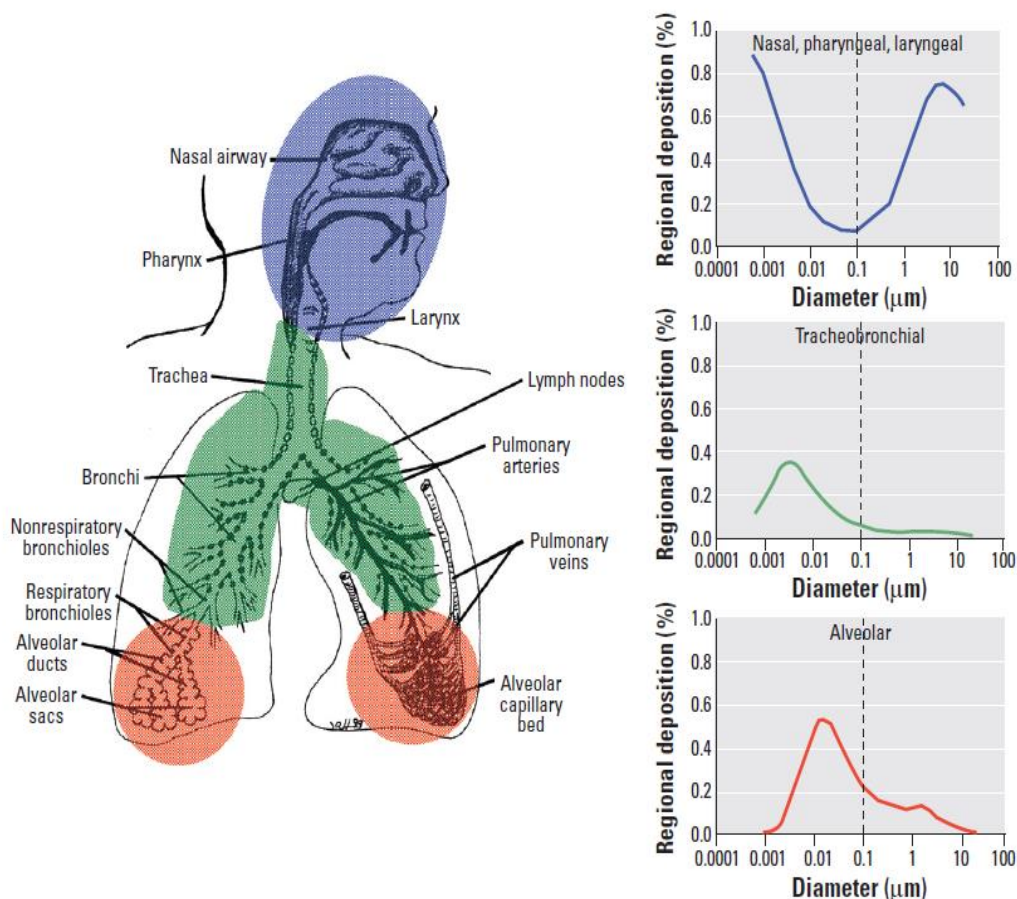


Figure 12: Prédiction du dépôt de particules inhalées de différentes tailles dans les régions nasopharyngées, trachéobronchiques et alvéolaires, au cours de la respiration nasale.

Le dépôt au niveau alvéolaire est maximal pour des particules d'environ 10 nm (Oberdorster et al., 2005).

Les processus d'élimination comprennent l'élimination chimique, pouvant se produire n'importe où dans l'appareil respiratoire. Elle correspond à la dissolution des nanomatériaux solubles dans les fluides biologiques, notamment influencée par le pH, l'état d'agrégation ainsi que l'adsorption de molécules biologiques en surface. Les NP de TiO₂, considérées comme faiblement solubles, sont peu concernées par ce mécanisme d'élimination.

D'autre part, l'élimination physique comprend le transport de particules pas ou peu solubles, vers différents sites de l'organisme : nez et bouche notamment. Dans ce cas, les mécanismes d'élimination vont dépendre de l'endroit de dépôt dans l'arbre respiratoire. Ainsi, les particules insolubles déposées dans les voies aériennes supérieures et la région trachéo-bronchique, sont majoritairement éliminées par transport muco-ciliaire vers le nez et la bouche. Puis elles sont soit expulsées vers l'extérieur, en se mouchant ou en éternuant, soit ingérées dans le tractus gastro-intestinal par déglutition. Les particules déposées dans les alvéoles pulmonaires, sont principalement phagocytées par les macrophages alvéolaires. Ainsi elles peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques associés au poumon, ou être transloquées dans la circulation sanguine, puis s'accumuler dans les organes secondaires (Figure 13). Le recrutement des macrophages alvéolaires augmente avec le nombre de particules déposées : à masse égale, il est ainsi plus important pour les PUF. Cependant, ce processus est saturable. En effet, une augmentation du nombre de particules facilite leur pénétration et leur persistance dans les tissus de l'organisme, en saturant les systèmes de clairance pulmonaire. D'autre part, ce processus dépend de la taille ainsi que des propriétés de surface des NP. Ainsi, les petites particules de moins de 20 nm, non agrégées/agglomérées, sont phagocytées de manière moins efficace. Une explication serait que ces dernières interagissent avec le film liquidien de l'épithélium, et ont ainsi plus de chance d'être internalisées par endocytose par les cellules épithéliales, puis de migrer vers l'interstitium pulmonaire (Ferin et al., 1992, Hervé-Bazin, 2007). Elles sont alors moins accessibles pour la

phagocytose et la clairance des macrophages (Geiser, 2010). D'autre part, les agrégats/agglomérats de particules de diamètre médian de l'ordre du micromètre, semblent se déposer comme des particules sphériques équivalentes, de même diamètre aérodynamique. La toxicité et le devenir de ces agrégats ne sont pas bien connus. La probabilité de désagglomération dans le liquide pulmonaire semble limitée (Creutzenberg et al., 2012). De plus, la probabilité que les particules primaires provenant de ces agglomérats échappent aux mécanismes de clairance classiques est faible (Landsiedel et al., 2012).

La rétention pulmonaire des particules dépend également de leur site de dépôt. En effet, les particules déposées dans les voies aériennes supérieures ou dans les bronches et bronchioles, sont éliminées de manière rapide et efficace, en quelques heures à quelques jours par l'escalator muco-ciliaire, puis souvent ingérées dans le tractus gastro-intestinal. Cependant, les particules déposées plus profondément dans les alvéoles pulmonaires, ont un temps de rétention augmenté, lié à un transport du mucus moins efficace, en particulier les particules et agglomérats de 10 à 100 nm dont la demi-vie est de 65 jours pour les rats et plusieurs mois pour les hommes (Donaldson et al., 2008, ICRP, 1994, Kreyling et al., 2013, Snipes et al., 1988).

Ainsi, une diminution de la phagocytose et de la clairance des particules dans les alvéoles pulmonaires peut entraîner leur accumulation, provoquant ainsi des effets toxiques à long terme notamment des pathologies respiratoires, y compris pour le TiO_2 considéré comme faiblement toxique (Hervé-Bazin, 2007).

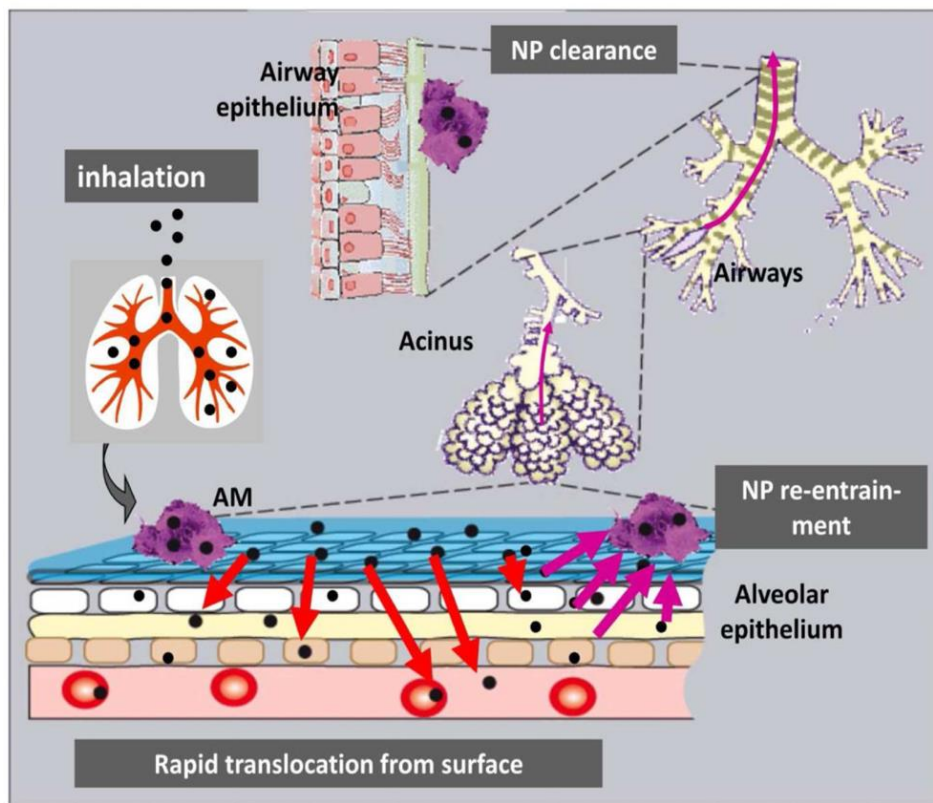


Figure 13: Devenir des nanoparticules dans les poumons.

Après inhalation, les particules peuvent rester au site de dépôt dans les voies respiratoires ou être transportées vers différents sites de l'organisme en vue de leur élimination. La principale voie d'élimination concerne le transport médié par les macrophages des poumons vers les voies aériennes supérieures (escalator mucociliaire). D'autre part, une redistribution des particules de l'épithélium vers l'interstitium et les ganglions lymphatiques, ainsi qu'une translocation vers la circulation sanguine pouvant entraîner leur accumulation dans des organes de stockage (ADME). Seules les nanoparticules sont capables de migrer dans la circulation sanguine. Cette translocation est fonction des propriétés physico-chimiques et de surface des NP concernées. De plus, lorsque les NP entrent en contact avec les fluides biologiques, les protéines présentes plus ou moins associées à des lipides, peuvent s'adsorber en surface des NP, formant un revêtement appelé couronne protéique. Cette couronne est capable de modifier les capacités des NP à interférer avec les tissus notamment lors de la traversée de membranes biologique, et ainsi d'influencer les réponses biologiques. Toutefois, suite à une exposition aiguë par inhalation, l'accumulation des NP dans les organes secondaires semble limitée. Les dangers paraissent d'avantage liés à des expositions chroniques. D'après (Kreyling et al., 2013).

Enfin, la région proximale alvéolaire (PAR) semble être le site de rétention préférentiel des particules respirables pénétrant dans le parenchyme pulmonaire, notamment en lien avec son architecture particulière favorisant un dépôt élevé et une clairance lente. Ainsi, dans le cas des particules insolubles telles que les NP de TiO_2 , Donaldson et coll ont précisé qu'il serait plus précis d'exprimer la dose de particules par unité de surface de la

région proximale alvéolaire (Donaldson et al., 2008). Dans ce contexte, ils ont exprimé des données précédemment obtenues dans le poumon des rats en terme de surface de particules par unité de surface PAR. En estimant cette région chez le rat à 300 cm^2 , ils ont obtenu une valeur seuil d'apparition de l'inflammation de $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$; en se basant sur le nombre de polynucléaires neutrophiles présents dans le LBA. De même, en exprimant *in vitro* la dose en termes de surface de particules par unité de surface de culture cellulaire (lignée A549) ; ils ont retrouvé cette valeur seuil de $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ pour l'apparition de l'inflammation, en s'intéressant au niveau d'expression d'IL-8 (Donaldson et al., 2008). Cette correspondance entre les effets pro-inflammatoires *in vivo* et *in vitro* souligne l'importance de cette région pour exprimer la dose de particules.

3.5. Biodistribution

En fonction de la taille et de l'état d'agglomération/agrégation, les NP peuvent pénétrer dans les cellules par différents mécanismes d'endocytose, comprenant la phagocytose, la pinocytose qui regroupe l'endocytose dépendante de clathrine, indépendante de clathrine, dépendante de cavéoline ainsi que la macropinocytose (Yameen et al., 2014). Ces différents mécanismes d'internalisation des particules entraînent leur séquestration dans les lysosomes, excepté l'endocytose dépendante de cavéoline qui semble permettre aux NP d'être distribuées dans la cellule ainsi que de la traverser par transcytose (Oh et al., 2007), leur permettant ainsi de passer à travers la barrière alvéolo-capillaire (George et al., 2015, Wang et al., 2011). Différents paramètres peuvent influencer l'internalisation des particules, notamment leurs propriétés de surface dont la charge et leur couronne, leur forme ainsi que leur taille (Bannunah et al., 2014, Chithrani, 2010, Kettler et al., 2014, Zhang et al., 2015a). De nombreuses études ont mentionné une faible translocation de NP dans le sang, ainsi que leur

distribution dans des organes extra-pulmonaire (Gate et al., 2017, Kreyling, 2016, Kreyling et al., 2009) En 2010, Geiser & Kreyling ont rapporté que les NP inhalées de 5 à 100 nm, dont des NP de TiO₂, pouvaient traverser la barrière alvéolo-capillaire. Une fois dans la circulation sanguine, les NP de TiO₂ peuvent ensuite s'accumuler dans le foie et le système lymphatique, être distribuées à d'autres organes ou tissus, ou éliminées de l'organisme par clairance (Geiser and Kreyling, 2010).

Cependant, ces observations sont généralement réalisées en utilisant de grandes quantités de NP non représentatives des expositions humaines professionnelles ou environnementales.

D'autre part, une étude réalisée chez la souris par instillation intratrachéale, a suggéré que les NP de TiO₂ pourraient traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Li et al., 2010b).

Une autre étude par instillation intra-nasale chez des souris femelles, a suggéré une translocation des NP de TiO₂ vers le SNC via les nerfs olfactifs, puis un dépôt préférentiel dans l'hippocampe (Wang et al., 2008).

4. Toxicologie mécanistique par approche de type « omiques »

4.1. Concept

La toxicité des NP chez l'animal est évaluée par des approches de toxicologie conventionnelle. Cependant, ces approches ne sont pas suffisantes pour identifier et comprendre les mécanismes moléculaires de toxicité sous-jacents. Ainsi, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies complémentaires, permettant d'évaluer plus précisément les risques liés aux nanomatériaux.

L'apparition de la technologie des puces à ADN (ou transcriptomique) à la fin du XX^{ème} siècle, a révolutionné les études toxicologiques. En effet, cette technologie de criblage à haut-contenu permet d'analyser simultanément le niveau d'expression de milliers de gènes (transcrits ou ARNm), altérés directement ou indirectement suite à l'exposition à un toxique. Dans ce contexte, une nouvelle sous-discipline scientifique appelée toxicogénomique, s'est développée (Nuwaysir et al., 1999, Chen et al., 2012). Elle combine les domaines de la toxicologie et de la génomique. La génomique étudie l'expression d'un ensemble, voire la totalité de gènes (ARNm), protéines et métabolites en utilisant les techniques de criblage à haut-contenu : transcriptomique, protéomique et métabolomique (Oleksiak, 2008). La toxicogénomique est l'application de ces technologies de génomique dans le domaine de la toxicologie, afin d'identifier les toxiques potentiels pour l'homme et l'environnement, leurs mécanismes d'action et des biomarqueurs moléculaires (Chen et al., 2012, Gao et al., 2011a, Hamadeh et al., 2002, Heijne et al., 2005, Nuwaysir et al., 1999, Waters and Fostel, 2004). La toxicogénomique s'intègre elle-même dans une discipline plus générale ; la toxicologie systémique, développée plus récemment. En 2004, Waters et Fostel expliquaient que la

toxicologie évolue progressivement vers une toxicologie systémique, une combinaison de biologie systémique et de toxicologie. Cette discipline associe la toxicologie conventionnelle et les technologies de criblage à haut-contenu, pour permettre une compréhension holistique des mécanismes d'interactions entre les substances et les systèmes vivants, à différents niveaux d'organisation biologique (Figure 14). Actuellement, le contexte sociétal exige un examen de plus en plus attentif des risques potentiels pour la santé, liés à l'exposition aux produits chimiques de la vie quotidienne. Ainsi, la toxicologie systémique s'intègre dans le développement de nouvelles approches prédictives d'évaluation des risques chimiques, comprenant notamment l'identification des séquences d'évènements conduisant à la toxicité ou « Adverse Outcome Pathways (AOP) » (Costa and Fadeel, 2016, Sturla et al., 2014).

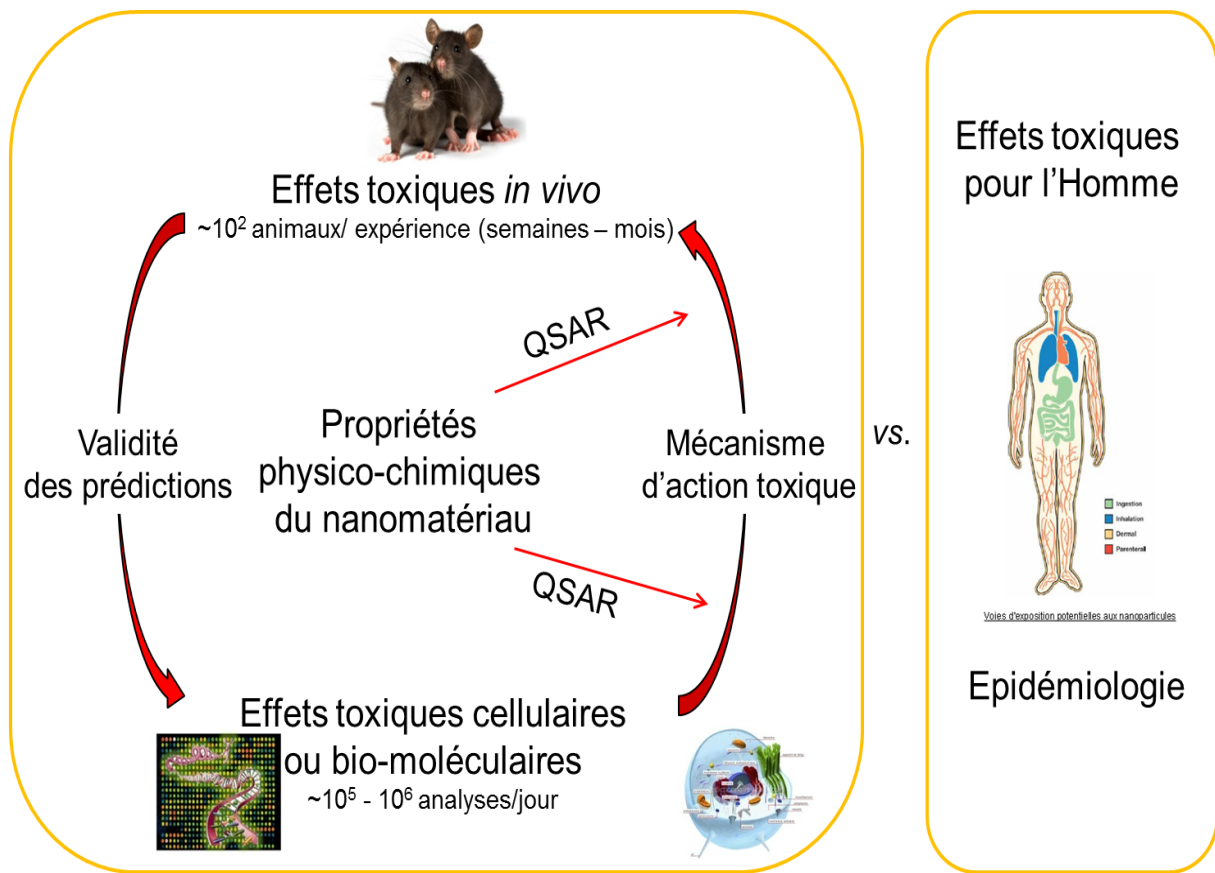


Figure 14: Toxicologie prédictive et évaluation des risques.

Pour identifier les effets toxiques d'une substance chez l'Homme, des études épidémiologiques peuvent être directement réalisées chez ce dernier. Cependant les résultats sont obtenus *a posteriori*. Dans le cadre d'une démarche de prévention, il est nécessaire de savoir si une substance représente un danger chez l'Homme avant qu'il ne soit exposé à cette dernière. La toxicologie systémique s'inscrit dans cette démarche de prévention et d'évaluation des risques. Il s'agit une discipline permettant de comprendre les mécanismes toxicologiques survenant suite à l'action de substances actives interagissant avec les systèmes vivants. Elle combine biologie systémique, toxicologie et chimie. Les approches de toxicologie conventionnelle sont ainsi intégrées à des approches moléculaires de criblage à haut-contenu ; permettant d'identifier et quantifier les changements moléculaires et fonctionnels se produisant à différents niveaux d'organisation biologique. Ce concept multidisciplinaire associe les principes de physique, chimie, informatique, ingénierie, mathématiques aux données expérimentales à haut-contenu obtenues au niveau moléculaire, cellulaire, de l'organe, de l'organisme ou de la population ; afin de caractériser et évaluer les interactions entre les composants d'un système biologique et d'éventuels dangers. Le but est de développer une compréhension mécanistique, quantitative et dynamique détaillée des processus toxicologiques ; afin de prédire et simuler des événements indésirables complexes. D'après (Meng et al., 2009, Nel et al., 2006, Sturla et al., 2014).

4.2. Etat des lieux de la littérature

La majorité des études toxicologiques s'intéressant aux effets cellulaires et moléculaires de NP chez l'animal, est réalisée sur des périodes relativement courtes, principalement des périodes post-exposition de 30 jours (Bourdon et al., 2012, Bourdon et al., 2013, Halappanavar et al., 2011, Halappanavar et al., 2015, Husain et al., 2013, Liao and Liu, 2012, Nikota et al., 2016, Poulsen et al., 2015b, Yang et al., 2010). Néanmoins, certaines études s'intéressant aux effets à long terme chez l'animal, ont été publiées (Guo et al., 2012, Husain et al., 2015, Rahman et al., 2017).

D'autre part, la majorité des études utilisent une approche de type « omique » unique (Costa and Fadeel, 2016). Ainsi Nikota et coll. ont évalué *in vivo* la toxicité pulmonaire d'une gamme de nanomatériaux comprenant les nanotubes de TiO₂ et de carbone, à l'aide d'une analyse transcriptomique (Nikota et al., 2016). Toutefois, des études combinant des techniques de toxicologie conventionnelle et des technologies « omiques », se développent, notamment dans le domaine des nanomatériaux (Chen et al., 2012, Costa and Fadeel, 2016, Halappanavar et al., 2011, Halappanavar et al., 2015, Husain et al., 2013, Nuwaysir et al., 1999, Poulsen et al., 2015b, Rahman et al., 2017). De plus, certains auteurs ne se contentent pas d'utiliser une seule techniques de criblage à haut-contenu mais en associent plusieurs. Ainsi Tilton et coll. en 2014, ont étudié la toxicité de NP de TiO₂ *in vitro* sur 3 types de cellules humaines : macrophages THP-1, cellules épithéliales SAE et intestinales Caco-2/HT29-MTX, à l'aide de stratégies de transcriptomique et protéomique (Tilton et al., 2014). De même, Pisani et coll. ont évalué en 2015, les effets toxicologiques de NP de fumées de silice sur la lignée cellulaire épithéliale alvéolaire humaine A549, au moyen d'une approche de transcriptomique couplée à une approche de protéomique (Pisani et al., 2015).

4.3. Techniques de criblage à haut-contenu

Différentes techniques de criblage à haut-contenu sont disponibles actuellement afin d'obtenir une grande quantité d'information à différents niveaux, concernant la réponse cellulaire et/ou tissulaire suite à l'exposition à une substance (Figure 15).

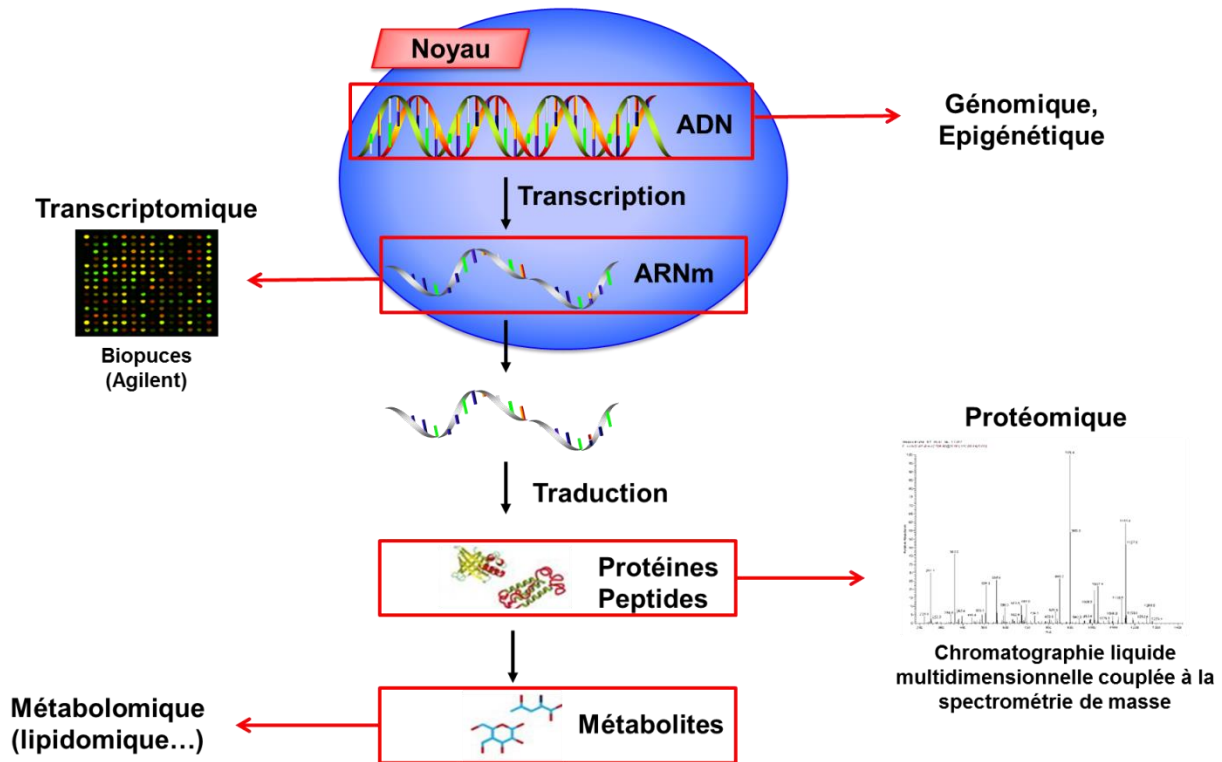


Figure 15: Techniques de criblage à haut-contenu ou "omiques".

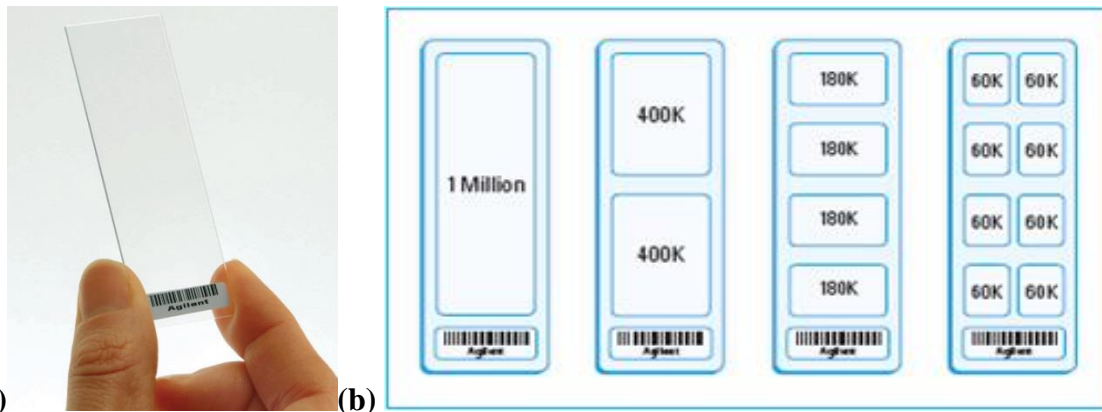
La génomique et l'épigénétique sont des disciplines s'intéressant à la molécule d'ADN, la transcriptomique à l'ARN messager (ARNm), la protéomique aux protéines et peptides ; enfin la métabolomique aux métabolites produits.

4.3.1. Transcriptomique

La transcriptomique mesure simultanément, le niveau d'expression de dizaines de milliers de gènes (ARNm) présents à un instant donné, dans une population cellulaire, un organe ou un tissu. Il s'agit d'une des meilleures approches permettant d'analyser et identifier les voies biologiques altérées suite à l'exposition à un toxique (Halappanavar et al., 2011,

Halappanavar et al., 2015, Nuwaysir et al., 1999, Poulsen et al., 2015b). À ce jour, la transcriptomique reste largement utilisée en toxicologie. Cette analyse fait intervenir la technologie des puces à ADN ainsi que le séquençage nouvelle génération ou NGS, développé plus récemment (Chen et al., 2012, Costa and Fadeel, 2016). La plupart des études de transcriptomique se concentrent uniquement sur la toxicité aiguë des particules.

Les puces à ADN représentent l'avancée technologie majeure de la dernière décennie en transcriptomique. Cette technologie permet d'étudier le transcriptome, en identifiant et quantifiant simultanément le niveau d'expression de l'ensemble des gènes d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme. Elle repose sur le principe d'hybridation, précisant que 2 fragments d'acides nucléiques complémentaires vont s'associer et se dissocier, de manière réversible et spécifique, sous l'effet de la chaleur ou de la concentration saline du milieu. Concrètement, une puce à ADN est un support rigide (verre ou nylon) de petite taille (quelques cm²), sur lequel sont déposées au préalable des milliers de copies d'une même sonde correspondant à de courtes séquences d'ADN simple brin, spécifiques d'un ARN donné et donc d'un gène donné (Figure 16). Les ARN extraits des échantillons à analyser ou cibles, sont marqués par des fluorochromes (cyanine 3 et/ou 5), puis déposés sur les puces à ADN, où ils vont se fixer de manière spécifique sur le fragment d'ADN complémentaire par hybridation en formant des hétéroduplex. Ensuite un logiciel d'analyse d'image va permettre de mesurer l'intensité de la fluorescence et de la convertir en valeur numérique, afin de quantifier le niveau d'expression des gènes (Figure 17). Après normalisation et analyse statistique des données, l'interprétation biologique est réalisée à l'aide de diverses bases de données disponibles telles que David, IPA, Panther, GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). Ainsi une compréhension des mécanismes moléculaires altérés suite à l'exposition à un toxique pourra être réalisée, en comparaison avec un témoin non exposé (Oleksiak, 2008, Sturla et al., 2014).



(a) Photo d'une lame de verre (Agilent) pouvant contenir jusqu'à 8 puces à ADN. **(b)** Représentation des différents modèles de lames Agilent disponibles : à gauche, la lame de verre contient une seule puce sur laquelle est déposé 1 million de sondes, en 2^{ème} position, la lame comprend 2 puces de 400 000 sondes chacune ; en 3^{ème} position, 4 puces de 180 000 sondes chacune ; et enfin la dernière lame possède 8 puces de 60 000 sondes chacune.

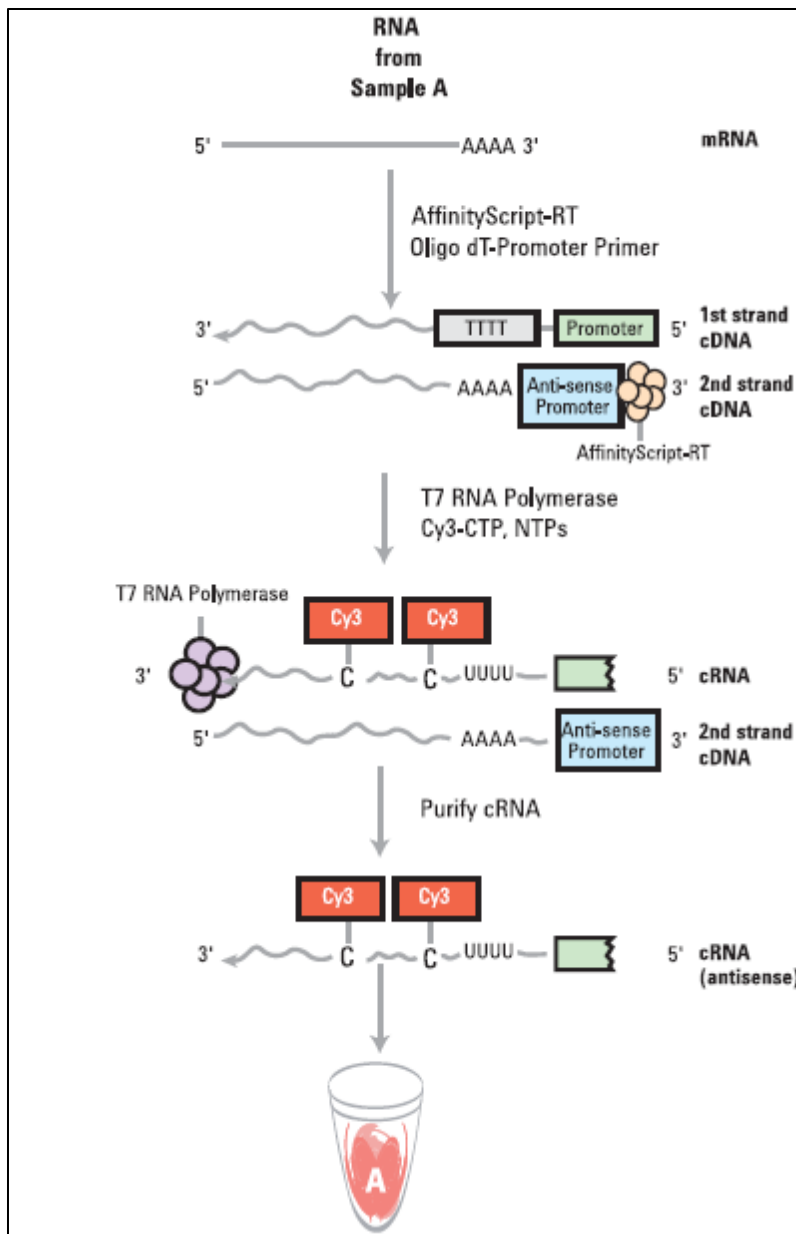


Figure 17 : Principe des puces à ADN (technologie une couleur).

Les ARNm sont extraits des échantillons témoins et exposés, suite à l'ajout d'un promoteur oligo dT. Les ADN complémentaires (ADNc) correspondant sont synthétisés grâce à l'enzyme AffinityScriptRT. Puis l'enzyme T7 polymérase et la Cyanine 3 sont ajoutées dans le milieu réactionnel pour permettre la synthèse, l'amplification et le marquage des ARNc complémentaires. Ces ARNc sont ensuite purifiés et déposés sur des puces à ADN, sur lesquelles se trouvent au préalable des milliers de copies d'une même sonde, spécifique d'un ARN donné et donc d'un gène donné. Les ARN marqués vont alors se fixer de manière spécifique sur le fragment d'ADN complémentaire par hybridation. Ensuite un scanner va permettre la lecture de la fluorescence. Un logiciel d'analyse de données permettra de convertir l'image en valeur numérique afin de quantifier le niveau d'expression de l'ensemble des gènes présents dans les échantillons témoins d'une part et dans les échantillons exposés d'autre part. Ainsi, en faisant le rapport des niveaux d'expression témoins/exposés, on peut ainsi identifier les gènes dont l'expression est modifiée.

La seconde technologie utilisée en transcriptomique est le séquençage nouvelle génération NGS ou séquençage à haut-débit. Le NGS est la révolution biotechnologique de ces dernières années. Il consiste à séquencer de grandes quantités d'ADN en des temps record. Son développement doit permettre de remplacer les technologies de puces à ADN grâce à une plus grande précision dans l'analyse. En effet, le NGS permet de calculer le nombre exact de transcrits dans un échantillon, avec une précision proche de celle obtenue avec la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) quantitative. De plus, cette technologie est plus flexible ; elle permet de séquencer l'ADN de n'importe quel organisme, y compris ceux pour lesquels les puces à ADN n'existent pas. Il peut en outre s'effectuer sur le génome entier ou uniquement sur des régions ciblées (Sturla et al., 2014). En revanche, le NGS est coûteux et chronophage. Le terme NGS désigne différentes technologies modernes de séquençage telles que celles développées par Illumina (Solexa), Roche 454, Ion torrent et SOLiD. Ces différentes technologies comprennent 3 étapes communes. La 1^{ère} étape consiste à préparer des banques d'ADN en fragmentant de l'ADN (ou ARN) d'intérêt (par sonication ou en utilisant des enzymes de restriction), puis en réalisant une ligation des fragments aux 2 extrémités à l'aide de petites séquences spécifiques ou adaptateurs. Ensuite les fragments sont amplifiés par des méthodes d'amplification clonale et de PCR. Puis l'ADN est séquencé à l'aide de différentes approches dépendant de la technologie utilisée (Figure 18) (Voelkerding et al., 2010).

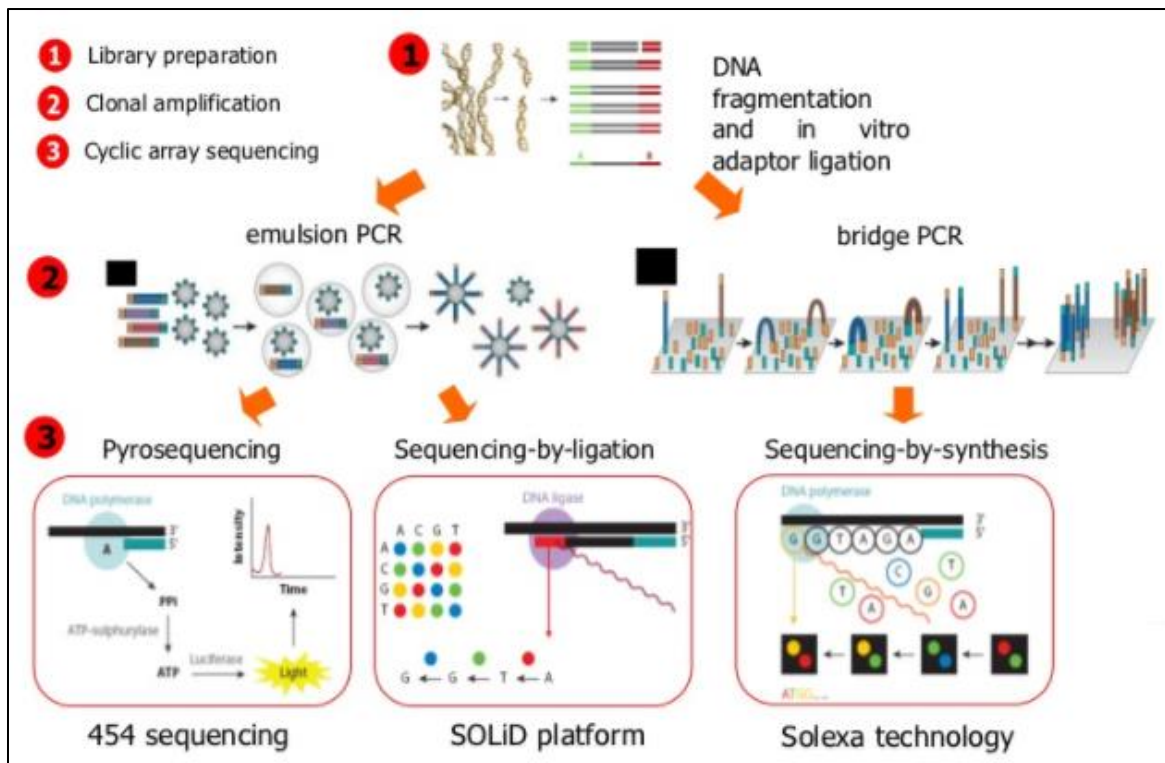


Figure 18: Séquençage nouvelle génération (NGS).

Les différentes technologies disponibles pour le séquençage nouvelle génération présentent des étapes communes. La 1^{ère} étape consiste à fragmenter de l'ADN ou ARN (par sonication ou en utilisant des enzymes de restriction). Après réparation des extrémités des fragments générés, une ligation d'adaptateurs est réalisée (aux 2 extrémités). Ces fragments vont constituer une bibliothèque d'ADN (library). Une amplification clonale de chaque fragment est ensuite effectuée. Puis l'ADN est séquençé à l'aide de différentes approches : signal lumineux, fluorescent ou variation de pH.

Adapté d'Alex Sanchez (<http://ueb.ir.vhebron.net/NGS>).

4.3.2. Protéomique

Si l'ARN représente le phénotype intermédiaire d'une cellule, la protéine en représente son phénotype terminal. En effet, l'analyse transcriptomique est insuffisante pour comprendre le mécanisme d'action complet d'une substance active (toxique). Il est nécessaire de s'intéresser au protéome, correspondant à l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, un tissu ou un organisme, à un instant donné, dans des conditions données. L'analyse du protéome ou protéomique, permet de mesurer simultanément le taux d'expression de milliers de protéines, en tenant compte des modifications traductionnelles telles que la phosphorylation ou la glycation. Cette technique est importante en toxicologie systémique, car

elle permet d'identifier les réactions biologiques altérées suite à l'exposition à un toxique, et de comprendre comment ces modifications affectent les fonctions cellulaires et protéiques (Hamadeh et al., 2002). Ainsi, des augmentations ou diminutions de l'expression de protéines peuvent être directement corrélées à des modifications de l'expression de gènes ou transcrits, ou peuvent résulter de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation.

Cette approche nécessite d'isoler, séparer, identifier et caractériser la fonction de protéines d'intérêt. L'étape de séparation repose sur différentes techniques électrophorétiques ou chromatographiques. L'électrophorèse bidimensionnelle permet la séparation de protéines d'un mélange complexe, selon leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire. Cependant, cette technique est peu adaptée à la séparation de protéines de masse moléculaire élevée, de petits peptides, de protéines hydrophobes ou basiques, ainsi que de protéines membranaires. La chromatographie liquide multidimensionnelle s'est alors développée pour palier ces désavantages, permettant une identification plus fiable des peptides/protéines.

L'étape suivante est l'identification des protéines, principalement réalisée par spectrométrie de masse (MS). Cette technique permet la séparation en phase gazeuse, de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La spectrométrie de masse permet de déterminer la masse de chaque peptide provenant de l'hydrolyse trypsique des protéines de départ. Le spectromètre de masse est constitué : (i) d'un système d'introduction de l'échantillon à savoir la chromatographie en phase liquide ou gazeuse, ou l'électrophorèse capillaire, (ii) d'une source d'ionisation : électronique (EI) ou chimique (CI), électronébulisation ou électrospray (ESI), couplage plasma inductif (ICP), désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), (iii) d'un analyseur à basse résolution comme le quadripôle (Q), le piège à ions 3D (IT) ou à haute résolution comme le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR), Orbitrap, et (iv) d'un détecteur (Figure 19a). La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) consiste à sélectionner

un ion par une 1^{ère} spectrométrie de masse, à le fragmenter, puis à réaliser une 2^{nde} spectrométrie de masse sur les fragments générés. Cette technique combine 2 analyseurs, et permet ainsi de déterminer la masse des peptides ionisés associée à une séquence partielle (Figure 19b). Les analyses MS/MS sont réalisées à l'aide de nombreux appareils tels que le triple quadripôle, piège à ions quadripolaire, ou une association de plusieurs types d'analyseurs comme les quadripôle-temps de vol (Q-TOF), quadripôle/piège à ions quadripolaire, piège à ions/FT-ICR ou piège à ions/Orbitrap (Hamadeh et al., 2002, Pineau, 2006, Sturla et al., 2014).

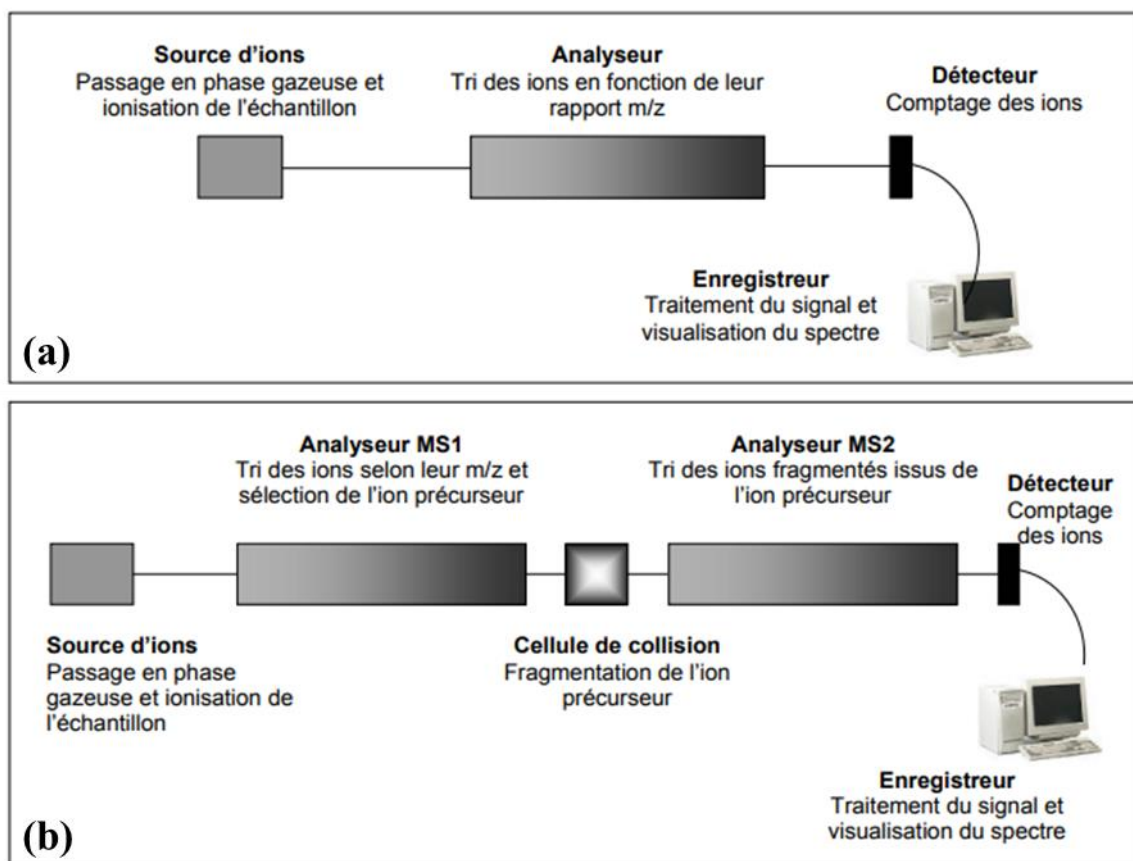


Figure 19. Principe de la spectrométrie de masse (a) et de la spectrométrie de masse en tandem (b).

D'après (Brosson, 2006)

Le marquage isotopique iTRAQ (*Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification*) est une méthode de quantification basée sur la spectrométrie de masse. Cette

approche, utilisée en toxicologie systémique, permet une quantification non ciblée de protéines provenant de différents échantillons, par marquage d'isotope stable (Sturla et al., 2014, Wiese et al., 2007).

4.3.3. Autres techniques

La métabolomique est une approche plus récente, qui comprend une analyse quantitative complète de l'ensemble des métabolites présents dans des organites, des cellules, des tissus, des organes, des organismes, des biofluides ou des échantillons environnementaux. Le terme « métabolite » désigne des composés chimiques de petite taille, de masse moléculaire comprise entre 50 et 2000 Dalton, endogènes ou exogènes comme les xénobiotiques. Cette technique est complémentaire à la transcriptomique et protéomique car elle permet de connaître le statut métabolique dynamique d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme.

En toxicologie, la métabolomique permet de caractériser de manière globale et non ciblée, les perturbations biologiques liées à l'exposition à une substance chimique donnée, résultant d'altérations au niveau de l'expression des gènes et des protéines. Elle représente simultanément l'exposition chimique par la mesure de la quantité de substances chimiques xénobiotiques internalisées, ou de leur produits de biotransformation/dégradation et l'effet biologique résultant par la mesure de la quantité de biomarqueurs d'effet sur- ou sous-exprimés.

Sur le plan technique, la métabolomique implique l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN), ainsi que de la spectrométrie de masse (Misra, 2018, Nicholson et al., 1999, Sturla et al., 2014).

Le lipidome, un sous-ensemble du métabolome, correspond au profil lipidique complet d'un système biologique. La lipidomique permet de caractériser et quantifier les lipides présents dans des échantillons biologiques. Cette approche est importante en toxicologie. En effet, des perturbations de l'homéostasie lipidique sont fréquemment impliquées dans les tableaux pathologiques tels le diabète, l'obésité, les maladies cardio-vasculaires. La lipidomique implique, tout comme la métabolomique, l'utilisation des techniques de RMN et de spectrométrie de masse.

L'épigénétique correspond à l'étude des modifications de l'expression des gènes induites par des mécanismes qui n'altèrent pas la séquence primaire d'ADN. Les modifications épigénétiques sont réversibles et héréditaires, c'est-à-dire qu'elles peuvent être transmises au cours des divisions cellulaires.

Le terme « épigénétique » décrit 3 principaux mécanismes ; la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, et les ARN non codant intervenant dans la régulation de l'expression des gènes par leur induction ou répression.

Des variations environnementales tel que l'exposition à des substances ou des toxiques, peuvent induire des modifications épigénétiques. Ces dérégulations sont impliquées dans des pathologies telles que les cancers, maladies cardio-vasculaires, neurodégénératives ou auto-immunes. Récemment, des études ont montré que les nanomatériaux pouvaient affecter des processus épigénétiques, notamment en altérant l'expression de gènes impliqués dans des réactions de méthylation de l'ADN (Ho et al., 2012, Kim et al., 2009, O'Reilly, 2017, Shyamasundar et al., 2015, Smolkova et al., 2015, Stocco et al., 2013).

De nombreuses techniques permettent de détecter des mécanismes épigénétiques, notamment le séquençage au bisulfite, le pyroséquençage et le profil de méthylation sur puces s'intéressant à la méthylation de l'ADN ; l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), des

techniques de chromatographie et de spectrométrie de masse concernant les modifications post-traductionnelles des histones ; et enfin la technologie des puces à ADN grâce à des sondes spécifiques de miARN, ou le séquençage NGS concernant les ARN non codant (Chantepie et al., 2012, Collas, 2010, Stoccoro et al., 2013).

4.4. Traitements des données et bioinformatique

Les technologies de criblage à haut-contenu génèrent une quantité considérable de données à analyser, ce qui constitue un véritable défi pour les scientifiques. Divers outils, logiciels et bases de données ont été développés pour permettre de simplifier la gestion, l'intégration et le traitement de ces données. Ceci s'insère dans le champ de recherche multidisciplinaire que constitue la bioinformatique. Ce terme décrit l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation informatique de l'information biologique. En 2000, le *National Institute of Health* (NIH) a défini la bioinformatique, comme étant la recherche, le développement, ou l'application d'outils informatiques permettant d'étendre l'utilisation des données biologiques, médicales, comportementales ou sanitaires, y compris les outils et approches permettant d'acquérir, entreposer, organiser, archiver, analyser ou visualiser de telles données (Smith, 2010).

L'analyse statistique et l'interprétation biologique des données en vue de l'identification de gènes/protéines différentiellement exprimés), est réalisée à l'aide de divers logiciels et programmes (Tableau V).

Tableau V: Exemples de différents logiciels pour l'analyse et l'interprétation biologique de données de « omiques ».

Logiciel	Domaine d'application	Principales caractéristiques
MAANOVA <i>Microarray analysis of variance</i> (logiciel dans R)	Gènes	-analyse statistique des données d'expression génique obtenues lors d'expériences de biopuces à ADN 2 couleurs
GSEA <i>Gene set enrichment analysis</i>	Gènes	-méthode alternative permettant d'identifier des signatures moléculaires -déterminer si un ensemble défini de gènes est important dans une étude -visualiser les différences statistiquement significative entre deux états biologiques pour un ensemble de gènes
GeneSpring (payant) (Agilent)	Gènes Protéines Métabolites	-analyse, compréhension et visualisation de données de transcriptomique, génomique, protéomique, métabolomique, NGS, dans un contexte biologique
DAVID <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i> (NCBI)	Gènes Protéines	-outils analytique permettant d'extraire systématiquement la signification biologique de grandes listes de gènes / protéines
IPA® (payant) <i>Ingenuity® Pathway Analysis</i> (Qiagen)	Gènes Protéines	-logiciel d'analyse, d'intégration et d'interprétation de données de « omics » -identifier de nouvelles cibles ou de nouveaux biomarqueurs candidats dans le contexte des systèmes biologiques
String <i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>	Gènes Protéines	-interactions protéine-protéine connues et prédites - associations directes (physiques) et indirectes (fonctionnelles) obtenues à partir de prédiction informatique, du transfert de connaissance entre organismes et des interactions provenant d'autres bases de données
IP2 <i>Integrated Proteomics Pipeline</i> (équipe de Yates)	Protéines	-identification et la quantification de protéines analysées par spectrométrie de masse
Uniprot <i>Universal Protein Resource</i>	Protéines	-informations sur les séquences de protéines, leurs fonctions et leurs structures -liens vers une multitude de bases de données -combinaison de données des bases Swiss-Prot, TrEMBL et Protein Information Resource (PIR)

Une des principales limites observées avec le développement des technologies de criblage à haut-contenu, a été l'absence de normes et de standardisation, concernant la présentation et l'interprétation des données générées. Ainsi, en transcriptomique, des lignes directrices regroupées sous le terme de MIAME ou *Minimum information about a microarray*

experiment, ont été développées (Brazma et al., 2001). Elles décrivent le minimum d'informations indispensables à fournir lors de la réalisation d'une expérience de puces à ADN, afin de permettre une interprétation claire et simple des résultats ; leur vérification par la communauté scientifique et éventuellement la reproduction de l'expérience décrite. Ainsi, ce document est devenu la norme concernant les données déposées dans des bases de données publiques : GEO (*Gene Expression Omnibus*) du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ou ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). Une norme similaire a également été développée pour les expériences de protéomiques dénommée MIAPE ou *Minimum information about a proteomics experiment* (Sturla et al., 2014, Taylor et al., 2007).

Chapitre 2 : Objectifs de l'étude

L'Institut national de recherche et de sécurité (INRS) pour la prévention des maladies professionnelles et des accidents du travail est une association loi de 1901, créée en 1947 sous l'égide de la Sécurité Sociale. Cet institut est au cœur du dispositif de prévention en santé et sécurité au travail. Il est constitué de 11 départements dont le département de Toxicologie et biométrie, qui a pour vocation la recherche en toxicologie, dans le domaine de l'évaluation des risques liés à l'exposition aux polluants en milieu professionnel ; notamment les nanoparticules.

Dans ce contexte, le TiO_2 un des nanomatériaux les plus utilisés actuellement en France, présente un intérêt majeur. Il est utilisé dans une large gamme d'industries et de produits, comme détaillé précédemment (p23-24). Les travailleurs particulièrement exposés sont ceux exerçant dans les secteurs de la chimie, du bâtiment notamment lors de la pose d'enduits de signalisation routière, de l'automobile, de la formulation des encres, peintures et vernis, de la pharmacie, des cosmétiques ou de l'alimentaire (INRS, 2012). L'inhalation représente la principale voie d'exposition professionnelle. En effet, lors des processus de transformation, les NP de TiO_2 peuvent être manipulées sous forme de nanopoudres et conduire à la génération d'aérosols nanométriques. Ainsi il est indispensable de mesurer de manière précoce le danger représenté par ces NP, en réalisant des études de toxicologie expérimentale par inhalation à l'aide de modèles animaux.

Dans notre étude, nous avons combiné des approches de toxicologie conventionnelle et moléculaire afin d'étudier les propriétés pulmonaires toxicologiques d'un aérosol nanostructuré de TiO_2 P25 (10 mg/m^3) ; chez des rats Fischer 344 exposés par inhalation 6 heures / jour, 5 jours / semaine pendant 4 semaines (OECD, 2017). Les échantillons biologiques ont été collectés immédiatement, 3, 28, 90 et 180 jours suivant la fin de l'exposition, afin d'étudier les effets à court et long-terme de cette exposition.

Le TiO₂ P25 provenant de la société Evonik, est une des nanoparticules les plus étudiées *in vitro* et *in vivo* (OECD, 2015). L'aérosol nanostructuré a été généré à l'aide d'une brosse tournante à la concentration cible de 10 mg/m³. En tenant compte des différences inter-espèces en termes de paramètres respiratoires et de dose pulmonaire déposée, cette concentration et le temps d'exposition correspondent à une exposition professionnelle moyenne pondérée d'un travailleur pendant 8 h, à la concentration de 0,3 mg/m³ soit la valeur limite d'exposition recommandée par le NIOSH pour le TiO₂ ultrafin (NIOSH, 2011), tout au long de sa carrière.

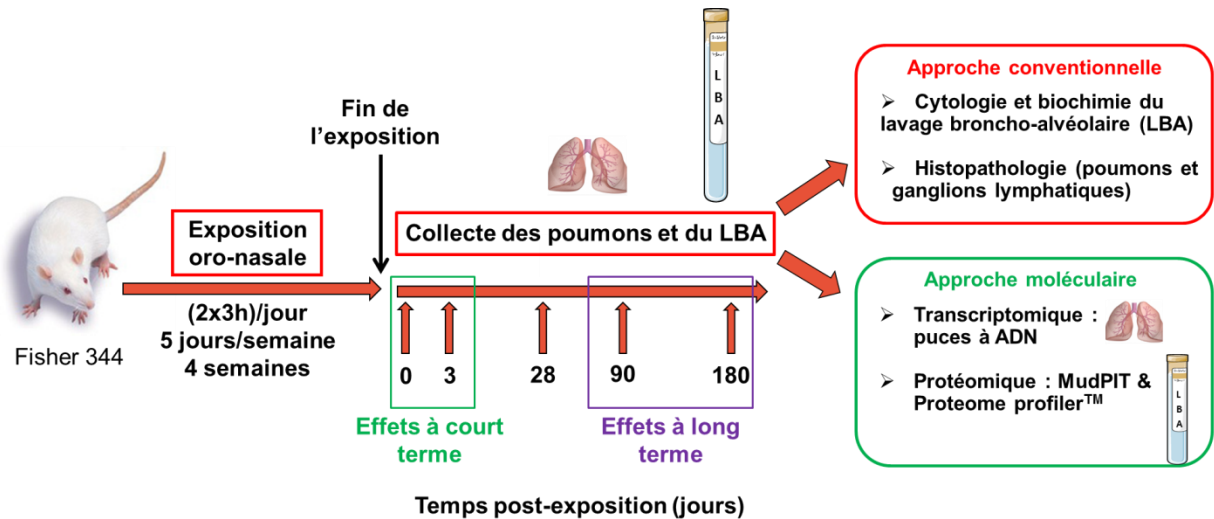
La première partie de l'étude s'intéresse à la caractérisation du dispositif d'inhalation utilisé (NanoTirex, *Nanomaterial Toxicology Inhalation system for Rodent Exposure*) ainsi que de l'aérosol généré, la détermination de la dose déposée dans les poumons et la cinétique d'élimination du TiO₂ au cours du temps.

La deuxième partie est consacrée à l'analyse des propriétés toxicologiques pulmonaires de l'aérosol de TiO₂. Cette partie comprend l'approche conventionnelle d'une part et l'analyse moléculaire d'autre part. L'approche conventionnelle consiste à analyser les modifications physiopathologiques induites par le TiO₂ inhalé chez le rat. Elle comprend différentes analyses décrites dans les lignes directrices de l'OCDE n°412 concernant la toxicité subaiguë par inhalation (OECD, 2017) : la détermination de la masse pulmonaire des rats, des analyses biochimiques dont la détermination de l'activité LDH et des protéines totales, et cytologiques du LBA ; une analyse histopathologique des poumons et ganglions associés afin de détecter d'éventuelles modifications de leur architecture ainsi que la présence éventuelles de NP.

En complément, une approche moléculaire de transcriptomique et protéomique consiste à analyser la réponse du génome et du protéome suite à l'exposition des rats à cet aérosol. L'analyse transcriptomique est réalisée sur les ARN totaux extraits des poumons des rats immédiatement, 3, 28, 90 et 180 jours suivant la fin de l'exposition. Elle comprend

l'utilisation de la technologie des puces à ADN simple couleur développée par Agilent. Cette technologie permet d'observer de manière globale, l'ensemble des gènes dérégulés dans les poumons, suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ P25.

L'analyse protéomique est effectuée sur les surnageants de LBA des rats immédiatement, 3 et 180 jours suivant la fin de l'exposition, à l'aide de la technologie d'identification multidimensionnelle des protéines (MudPIT), ainsi que d'une technique de criblage de protéines impliquées dans l'inflammation à l'aide du système Proteome ProfilerTM de R&D biosystems. L'analyse MudPIT permet d'observer de manière globale l'ensemble des protéines différentiellement exprimées chez les rats exposés à l'aérosol de TiO₂ en comparaison avec les rats témoins, tandis que le criblage protéique ciblera l'expression de 29 protéines impliquées dans l'inflammation dont une majorité de cytokines et chimiokines présentes chez le rat et intervenant dans des voies biologiques variées (Figure 20).



OCDE : « Essai n°412 : Toxicité subaiguë par inhalation : étude sur 28 jours »

Figure 20 : Protocole expérimental de l'étude

Des rats Fisher 344 ont été exposés 6h par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines à un aérosol nanostructuré de TiO_2 P25 (10 mg/m^3). A la fin de la période d'exposition, les poumons, ganglions lymphatiques et le LBA ont été collectés à différents temps d'analyse afin d'étudier les propriétés toxicologiques pulmonaires de cet aérosol à court et long terme, selon les lignes directrices de l'OCDE n°412 (toxicité subaiguë par inhalation). L'approche conventionnelle a consisté à déterminer la masse pulmonaire des rats, réaliser des analyses biochimiques dont la détermination de l'activité LDH et des protéines totales, des analyses cytologiques du LBA ainsi qu'une analyse histopathologique des poumons et ganglions lymphatiques associés. En parallèle, une approche moléculaire de transcriptomique réalisée sur les poumons de rats (technologie des puces à ADN) et protéomique sur les surnageants de LBA (technologie d'identification multidimensionnelle des protéines (MudPIT) et technique de criblage de protéines impliquées dans l'inflammation) a permis d'analyser la réponse du génome et du protéome suite à l'exposition des rats à cet aérosol.

L'intérêt de cette étude est de développer une méthodologie combinant des approches de toxicologie conventionnelle et moléculaire associant analyses transcriptomique et protéomique. Or actuellement, la plupart des études de toxicologie n'utilise qu'une technique de type « omique », comme mentionné en introduction (p88). Cette méthodologie doit permettre en complément de l'étude des modifications anatomo- et physiopathologiques induites, d'évaluer la perturbation du profil d'expression de milliers de gènes et de protéines. L'approche moléculaire, plus mécanistique que l'étude classique, peut permettre d'identifier

des modifications moléculaires nouvelles induites par les NP de TiO₂, et d'orienter les recherches vers des mécanismes peu étudiés. D'autre part, elle peut également aider à caractériser de manière plus précise les voies biologiques altérées à court et long terme suite à l'exposition aux NP de TiO₂, et à comprendre comment ces modifications affectent les fonctions cellulaires et protéiques. Ceci dans le but de préciser le mode d'action de ces dernières. Enfin, elle peut orienter vers l'identification éventuelle dans le poumon de biomarqueurs de toxicité prédictifs liés à l'exposition aux NP. Ces biomarqueurs pourraient ensuite être utilisés dans les études de biométrie chez les salariés exposés.

Le deuxième avantage de cette étude est la durée de la période post-exposition : 180 jours. En effet, comme précisé ci-avant, la plupart des études de toxicologie combinant des approches de toxicologie conventionnelle et moléculaire, s'intéresse uniquement aux effets à court terme (30 jours post-exposition). Dans notre étude, nous pouvons ainsi, évaluer les modifications précoces et tardives induites par les nanoparticules de TiO₂ et ainsi d'appréhender la dynamique d'expression des gènes et protéines au cours du temps.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Génération et caractérisation de l'aérosol

La génération et caractérisation de l'aérosol ont été réalisées avant mon arrivée en thèse, par le laboratoire GCAT (Génération et caractérisation des atmosphères de travail) de l'INRS sous la direction de Frédéric Cosnier. Une description détaillée du système de génération (NanoTIREx) ainsi que des techniques utilisées pour caractériser précisément l'aérosol généré, a fait l'objet d'une publication (Cosnier et al., 2016). Cependant, pour une meilleure compréhension des données de toxicologie obtenues au cours de ce travail de thèse, il est essentiel de disposer des informations relatives à la génération et la caractérisation de l'aérosol. Ainsi, ce paragraphe est consacré à leur présentation.

1.1. Système d'inhalation oro-nasale NanoTIREx

Le dispositif NanoTIREx (Figure 21) est constitué d'un système de génération d'aérosol et de tours d'inhalation pour permettre une exposition oro-nasale des animaux (EMMS, Electro-Medical Measurement System, Bordon, UK). Les tours sont en acier inoxydable et en aluminium anodisé pour minimiser les pertes électrostatiques et réduire le risque de contamination. Ce dispositif comprend 2 types de tours : les tours d'exposition d'une part, constituées d'un seul niveau de 9 orifices (Figure 22(a)), destinées aux rats exposés à un aérosol nanostructuré ; les tours témoins d'autre part, constituées de 3 niveaux de 9 orifices chacun, destinées aux rats exposés à de l'air filtré exempt de particules. Les rats sont placés dans des tubes de contention fixés sur les tours, et sont ainsi exposés à l'aérosol uniquement par le nez (Figure 22(b)). Sur chaque tour, un orifice est réservé pour la connexion d'une sonde de prélèvement (figure 22(c)) utilisée pour le prélèvement de l'aérosol en vue de sa caractérisation. Cette approche présente l'avantage de collecter l'aérosol dans la

zone de respiration du rat et donc d'être le plus représentatif de l'aérosol inhalé par les animaux.

La capacité totale d'exposition de ce système est supérieure à 100 rats : 50 rats exposés à des nanomatériaux (6 tours de 9 orifices) et 50 rats témoins (2 tours x 3 niveaux x 9 orifices).

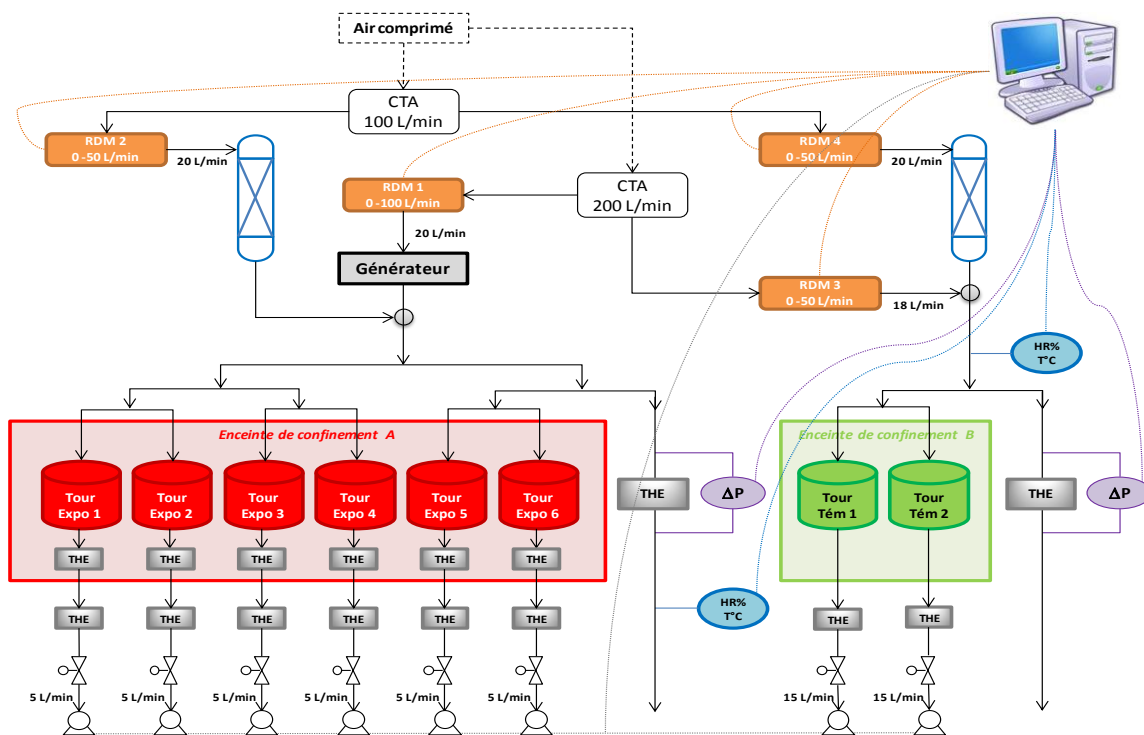


Figure 21: Description du système d'inhalation oro-nasale NanoTIREx.

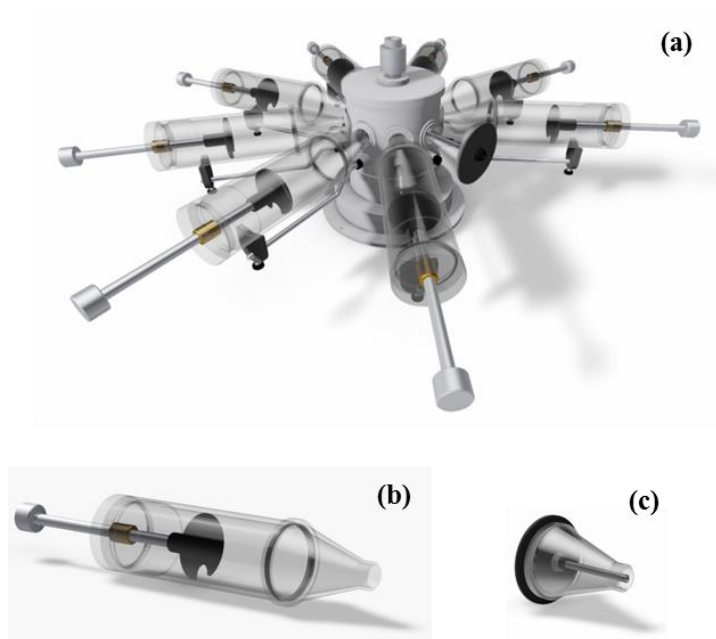


Figure 22: Tour d'inhalation simple niveau (EMMS, Bordon, UK) (b) tubes de contention réalisés sur mesure (c) une sonde d'échantillonnage.

1.2. Génération de l'aérosol

L'aérosol est obtenu à partir d'une poudre de TiO₂ P25 (Aeroxide® P25, Evonik®) provenant de chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), une poudre nanocristalline composée de 80 % d'anatase et de 20 % de rutile, avec un diamètre moyen des particules primaires de $21,5 \pm 7,2$ nm.

L'aérosol de TiO₂ P25 a été généré à une concentration cible de 10 mg/m^3 . Compte tenu des différences inter-espèces en termes de paramètres respiratoires et de dose déposée pulmonaire, cette concentration et ce temps d'exposition de 4 semaines sont comparables à l'exposition professionnelle moyenne pondérée de 8 h d'un travailleur à $0,3 \text{ mg/m}^3$, limite d'exposition recommandée par le NIOSH pour le TiO₂ ultrafin; tout au long de sa carrière (Annexe 3). Brièvement, l'aérosol a été produit à l'aide d'une brosse tournante ((RBG1000, diamètre du réservoir 7 mm, Palas, Karlsruhe, Allemagne), placée sous une Sorbonne a1-

Safetech (a1-envirosciences,). De l'air comprimé sec et filtré (Donaldson Ultrafilter 4812) a été utilisé comme gaz porteur. L'aérosol a été administré simultanément à 30 animaux maintenus dans des tubes de contention placés dans quatre chambres d'inhalation à 9 orifices (EMMS, Electro-Medical Measurement System, Bordon, Royaume-Uni). Simultanément, 30 rats témoins ont été exposés à de l'air filtré en utilisant la même configuration d'exposition (Cosnier et al., 2016). L'aérosol et l'air filtré ont été conditionnés à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et à une humidité relative de $55 \pm 10 \%$, conformément à la ligne directrice OCDE essai n°412 (OECD, 2017) et aux exigences en termes de bien-être animal (Décret 2013-118 du 1 février 2013).

1.3. Surveillance de l'aérosol pendant l'inhalation

Un compteur optique de particules (OPC FIDAS mobile, Palas, Qaerosol = 1,4 L/min) a été utilisé pour surveiller les caractéristiques de l'aérosol généré en temps réel, en continu. Cet appareil mesure la concentration totale en nombre de particules et la distribution granulométrique en nombre de particules (0,18 - 18 μm) en temps réel (1 Hz). Afin de ne pas saturer les capacités d'analyse de l'appareil, l'aérosol prélevé dans les chambres d'inhalation a été dilué environ 15 fois en ajoutant un flux d'air filtré (Brooks 5051S).

Pour déterminer la concentration en masse, les aérosols ont été échantillonnés en utilisant une cassette fermée de 25 mm (Merck-Millipore) contenant des filtres à membrane en PVC (GLA-5000, taille des pores de 5 μm). Les mesures gravimétriques ont été réalisées à l'aide d'une microbalance (Mettler XP6U, résolution de 0,1 μg) placée dans une pièce dédiée où la température ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) et l'humidité relative ($50 \pm 10 \%$) ont été contrôlées. Des échantillons ont été prélevés de deux fois à quatre fois quotidiennement pendant environ 90 minutes.

La distribution granulométrique des particules en suspension dans l'air, a été mesurée à l'aide d'un impacteur en cascade (SIOUTAS). Des échantillons ont été prélevés deux fois par semaine pendant environ 90 minutes. Tous les filtres ont été pesés en utilisant la microbalance décrite ci-dessus (Tableau VI).

1.4. Caractérisation approfondie de l'aérosol

En amont de l'exposition des animaux, une caractérisation poussée de l'aérosol a été réalisée. En raison du nombre d'équipements utilisés, de la lourdeur des procédures mises en œuvre, il n'est pas possible de réaliser de telles analyses au cours de la phase d'exposition des animaux. Une caractérisation allégée permettant cependant de s'assurer de la qualité et la stabilité de l'aérosol généré tout au long de l'exposition (granulométrie, concentration en masse et en nombre) est réalisée comme décrit ci-dessus. L'aérosol a été caractérisé en détail en prenant diverses mesures couvrant un large éventail de tailles et de propriétés de particules. En particulier, la distribution granulométrique du nombre de particules a été mesurée dans le domaine sub-micrométrique (10 nm à 1000 nm) en utilisant un analyseur de mobilité à balayage (SMPS + C, Grimm, composé d'un analyseur de mobilité différentielle et d'un compteur de particules de condensation). Les données dans la gamme du micromètre (0,52 μm à 20 μm) ont été acquises avec un calibreur de particules aérodynamique (TSI APS). De plus, la distribution granulométrique des particules sur une large gamme de tailles de 0,03 μm à 10 μm , a été obtenue avec un impacteur basse pression (ELPI, Dekati, Qaerosol = 10 L/min) (Tableau VI).

Tableau VI : Stratégie de mesurage et instruments de mesure utilisés.

Paramètre	Instrument
Concentration en masse (mg/m^3)	Echantillonnage gravimétrique
Concentration en nombre ($\text{particules}/\text{cm}^3$)	CNC
Distribution en taille (f[nombre])	FIDAS – ELPI – SMPS – APS
Distribution en taille (f[masse])	SIOUTAS
Morphologie	Microscopie électronique

2. Exposition des animaux

Les expérimentations animales ont été réalisées conformément aux réglementations européennes et françaises relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Directive européenne 2010/63/UE et Décret 2013-118 du 1^o février 2013), au sein d'une animalerie agréée par les services vétérinaires de la Direction départementale de la protection des populations (*DDPP*) de Meurthe et Moselle (Agrément D54-547-10). Le projet a été évalué par le Comité d'éthique Lorrain en Matière d'Expérimentation animal (C2EA-66,) et autorisé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (autorisation n°00692.01).

Des rats Fisher F344 mâles de treize semaines (Charles River Laboratories, France) ont été hébergés dans des cages ventilées individuellement (Tecniplast) avec des conditions environnementales standard (humidité relative: 55 ± 10 %, température: 22 ± 2 ° C et cycle lumière / obscurité 12/12h). Pendant les phases d'hébergement, les animaux avaient un accès libre à de l'eau et de la nourriture pour rats de laboratoire standard (A04 Safe diet). Deux semaines avant l'exposition à l'aérosol de TiO₂, les rats ont été progressivement acclimatés aux tubes de contention. Les animaux ont ensuite été exposés soit à de l'air filtré (animaux témoins) ; soit à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ à une concentration de 10 mg/m³ (animaux exposés), 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines.

3. Collecte des échantillons et histopathologie

3.1. Mise à mort des animaux

Immédiatement après les 6 dernières heures d'exposition, puis 3, 28, 90 et 180 jours post-exposition (J0, J3, J28, J90 et J180 respectivement), 5 animaux de chaque groupe (témoin et exposé) ont été anesthésiés avec une injection intrapéritonéale de pentobarbital (60 mg / kg), puis exsanguinés au niveau de l'aorte abdominale. La trachée a été sectionnée et les poumons ont été collectés.

3.2. Traitement du poumon et lavage broncho-alvéolaire

Le poumon droit a été ligaturé, le lobe accessoire a été prélevé par section après ligature puis stocké dans du RNA later en vue de l'analyse transcriptomique.

Le LBA a été effectué sur le poumon gauche en injectant et aspirant 4 mL de Phosphate Buffer Saline (PBS) froid. Le liquide collecté a été transféré dans un premier tube conique placé dans la glace. Quatre lavages supplémentaires de 4 mL ont été réalisés avec du PBS froid et transférés dans un second tube conique placé dans la glace. Les deux tubes ont été centrifugés pendant 5 min à 400 x g et 4°C.

Le surnageant du premier tube a été recueilli pour réaliser les analyses biochimiques (activité LDH et protéines totales) en utilisant un appareil Rx Daytona (Randox Laboratories, France) ; ainsi que l'analyse protéomique (MudPIT et Proteome Profiler[®]).

Le surnageant provenant du deuxième tube a été jeté, les deux culots cellulaires ont été regroupés puis remis en suspension dans du PBS froid pour le comptage des cellules et la préparation de cyto-centrifugations. Les cellules du LBA ont été comptées en utilisant un Cellometer[®] vision (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) après coloration à l'acridine

orange / iodure de propidium. Des numérations cellulaires différentielles de LBA ont été effectuées sur des préparations de cyto centrifugation après coloration de May-Grünwald Giemsa.

Le lobe caudal pulmonaire droit et les ganglions lymphatiques associés aux poumons (médiastinaux) ont été fixés avec du formol à 10 % neutre tamponné (Sigma Aldrich). Dans le cadre de la fixation du poumon, le formol a été directement introduit via la trachée dans l'organe par gravité grâce à un réservoir situé 20 cm au-dessus de l'organe. Après fixation, les tissus ont été traités en vue de l'analyse histopathologique.

3.3. Coloration de May-Grunwald Giemsa

La coloration de May Grünwald (éosinate de bleu de méthylène) Giemsa (éosinate d'azur de méthylène) permet, après fixation au méthanol, solvant des colorants ; l'action successive des deux colorants dilués. Chaque colorant, après dissociation, contient alors des ions colorés acides (éosine) et basiques (bleu et azur de méthylène), qui se fixeront sur les structures cellulaires complémentaires leur donnant leur couleur. Les structures cellulaires basiques captent les ions éosinates, et donnent des teintes allant du beige rosé des hématies et des cytoplasmes des granulocytes ; à l'orangé des granulations du granulocyte éosinophile. Les structures cellulaires acides captent le bleu de méthylène, et apparaissent d'un bleu plus ou moins soutenu comme les cytoplasmes des mononucléaires et des plaquettes. Les granulations du granulocyte basophile PB ont, quant à elles, une teinte violet noir. Certaines structures cellulaires peuvent capter à la fois les ions acides et basiques, comme les chromatines (noyau) des cellules nucléées et les granulations du granulocyte neutrophile. Les granulations des monocytes, grand lymphocytes et thrombocytes ont une teinte rouge pourpre car elles captent l'azur de méthylène.

Les lames de cyto centrifugation sont séchées à l'air libre, puis sont soumises aux étapes suivantes :

- Fixation dans le méthanol (3 min)
- Coloration au May-Grunwald (Merck) (3 min)
- Coloration au May-Grunwald dilué au 1/2 dans du tampon de phosphate de sodium pH6,8 à 0,1M (1 min)
- Coloration au Giemsa (Merck) dilué au 1/10 dans du tampon phosphate (20 min)
- Rinçage au tampon phosphate (30 sec sous agitation)
- Egouttage et séchage des lames
- Montage d'une lamelle à l'Entellan (Merck) avant observation au microscope optique

Le comptage différentiel est réalisé sur 500 cellules de LBA par animal.

3.4. Enrobage en paraffine et coloration Hématoxyline-Eosine et Trichrome de Masson

Une fois les tissus fixés dans le formol, ils sont déshydratés dans un automate de déshydratation de type carrousel STP-120 (Microm-Microtech, France) selon la séquence suivante :

- Formol 1h30
- Ethanol 70 % 1h00
- Ethanol 80 % 1h00
- Ethanol 100 % 1h00
- Ethanol 100 % 1h00
- Ethanol 100 % 1h00

- Ethanol 100 % 1h30
- Ethanol 100 % 1h30
- Xylène 1h30
- Xylène 1h30
- Paraffine 2h00
- Paraffine 2h00

Une fois déshydratés, les tissus ont été inclus en bloc de paraffine puis envoyés à un prestataire extérieur (Covance laboratories) pour la coupe, la coloration et la lecture des lames par un histopathologiste confirmé.

La coloration hématoxyline-Eosine permet une coloration différentielle des noyaux et des cytoplasmes. L'hématoxyline est un colorant nucléaire. Il colore notamment les noyaux en bleu/violet. L'éosine est un colorant cytoplasmique. Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge. En microscopie optique, on peut observer les noyaux en bleu/violet ; le cytoplasme acidophile en rouge ; les muscles en rose foncé ; les érythrocytes en rouge cerise et le collagène en rose pâle.

La coloration Trichrome de Masson est utilisée pour différencier les fibres de collagène et le tissu. Elle est principalement utilisée pour la recherche de dépôt de collagène lors du processus de fibrose pulmonaire. Cette coloration associe trois colorants. L'hématoxyline qui colore notamment les noyaux en violet ; la fuchsine ponceau un colorant cytoplasmique qui colore le cytoplasme en rouge, et le vert lumière un colorant fibrillaire qui colore les fibres conjonctives de collagène en vert.

4. Toxicologie moléculaire

4.1. Transcriptomique

4.1.1. Extraction d'ARN total et purification

Les lobes accessoires de poumons de rats (n=5 rats par groupe, témoin et exposé, à chacun des 5 temps post-exposition) ont été broyés à l'aide d'un gentleMACS™ (Miltenyi Biotech). Les ARN totaux ont été extraits et purifiés en utilisant un kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel). La pureté et l'intégrité de tous les échantillons d'ARN a été vérifiée : tous les ARN possédaient un rapport A260 / A280 compris entre 2 et 2,2, et un RIN (RNA integrity number) supérieur à 7,0.

Les ARN totaux ont été stockés à -80 ° C jusqu'à analyse.

4.1.2. Hybridation sur puces

Un aliquot (100 ng) d'ARN de chaque échantillon a été marqué avec de la Cyanine 3-CTP en utilisant le kit Low Input Quick Amp Labeling kits (Agilent Technologies). Les ARNc marqués ont été purifiés puis hybridés sur les puces Agilent G4853A SurePrint G3 Rat GE 8*60K microarrays (Agilent Technologies) qui couvrent la totalité du transcriptome du rat. Les lames ont ensuite été lavées et scannées à l'aide du scanner de puces à ADN Agilent G2505C avec une résolution de 3 µm. Les données ont été extraites en utilisant la version 11.0 du logiciel Feature Extraction (Agilent) (Figure 17).

Les expériences ont été réalisées selon les normes MIAME (Brazma et al., 2001). Les données de puces à ADN ont été déposées dans la base de données GEO (Gene Expression Omnibus) du NCBI (Edgar and Barrett, 2006), où elles sont accessibles sous le numéro d'accès GSE99997 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

4.1.3. Analyses statistiques, fonctionnelles, et des voies de signalisation sur données de puces

Les données obtenues à l'aide du logiciel Feature Extraction (Agilent) ont ensuite été normalisées en utilisant le logiciel Solo (IGBMC, Strasbourg, <http://www-microarrays.u-strasbg.fr/Solo/index.html>). A chaque temps post-exposition, les gènes différentiellement exprimés entre les rats témoins et exposés, ont été identifiés à l'aide du test FCROS (Fold change rank ordering statistics) (Dembele and Kastner, 2014). Les gènes pour lesquels le fold change (FC) correspondant au rapport de l'intensité de fluorescence d'un gène chez un rat exposé sur l'intensité de fluorescence du même gène chez un rat témoin ; était soit inférieur à 1/1,5 soit supérieur à 1,5 et possédant une f-value $\leq | 0,01 |$; ont été considérés comme significativement différentiellement exprimés. Ainsi des listes de gènes potentiellement d'intérêt, c'est-à-dire différentiellement exprimés chez les rats exposés en comparaison aux témoins, ont été obtenues immédiatement, 3, 28, 90 et 180 jours post-exposition.

Ces listes de gènes ont ensuite été injectées dans la base de données DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) version 6.7, pour analyse fonctionnelle en sélectionnant l'espèce *Rattus norvegicus* (<https://david.ncifcrf.gov/>). Il est important de noter que seuls les noms des gènes différentiellement exprimés sont injectés dans la base de données. Aucune valeur numérique (fold change) n'est prise en compte. Il s'agit d'avantage d'une procédure exploratoire que statistique (Huang et al., 2009). DAVID permet ainsi d'extraire la signification biologique de longues listes de gènes différentiellement exprimés, afin d'identifier les fonctions biologiques altérées ; dans notre cas, suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂.

Cette base de données bioinformatique propose plusieurs types d'analyse notamment une classification fonctionnelle des gènes (« Gene functional classification ») qui permet de

regrouper les gènes de la liste d'intérêt partageant des fonctions similaires en famille de gènes, ainsi qu'une annotation fonctionnelle comprenant 3 sous-parties : « Functional annotation chart », « table » and « cluster ». L'outil d'annotation fonctionnelle permet de classer les gènes de la liste d'intérêt sous forme d'annotations biologiques, et propose une analyse statistique du contenu en annotation.

Concernant l'annotation fonctionnelle, la sous-partie « Functional annotation chart » permet d'associer les gènes de la liste avec les annotations biologiques correspondantes (ex : termes d'ontologie génique ou GO term), et de mettre ainsi en évidence la/les annotation(s) biologique(s) surreprésentées (enrichies).

DAVID utilise divers systèmes de classification pour les annotations biologiques : (Gene Ontology (GO) ; KEGG ; SMART ; InterPro, UniProt). Gene Ontology (GO) est un projet bioinformatique permettant de structurer la description des gènes et de leurs produits dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces. Ainsi, le consortium GO définit un vocabulaire contrôlé décrivant les gènes et leurs produits (l'ontologie) afin d'unifier les nombreux termes utilisés, gère les annotations correspondant aux informations rattachées aux gènes et à leurs produits, distribue une classification qui est l'une des références en génomique, et permet d'augmenter la communicabilité entre bases de données. Dans le cadre de ce consortium, les gènes et leurs produits sont décrits selon 3 axes :

- « Cellular Component » (CC) : le produit d'un gène est adressé à un ou plusieurs compartiments cellulaires (plus de 3000 termes)
- « Molecular Function » (MF) : le produit d'un gène remplit une ou plusieurs fonctions moléculaires (plus de 9000 termes)
- « Biological Process » (BP) : le produit d'un gène participe à un ou plusieurs processus biologiques (plus de 20 000 termes).

Un terme GO est défini par un nom de terme (mot unique ou suite de mot, par exemple « inflammatory response »), un numéro d'accèsion unique (préfixe « GO ») : « 0006954 », une « ontologie » : « Biological Process », une définition dont les sources sont citées, des commentaires sur la signification ou l'utilisation du terme.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés principalement aux processus biologiques (GO BP) significativement enrichis ($p < 0,05$) (Huang et al., 2009).

L'analyse d'enrichissement est une stratégie prometteuse pour identifier les processus biologiques les plus pertinents en lien avec le phénomène étudié. L'importance de l'enrichissement est examinée à l'aide d'un test exact de Fisher qui permet de déterminer une p-value également appelée EASE score, pour chaque annotation biologique identifiée. Les p-values sont classées par ordre croissant ; les plus petites traduisant les enrichissements les plus significatifs. Le principe est le suivant : le pourcentage (proportion) de gènes de notre liste associés à une annotation biologique donnée (GO BP) est comparé au pourcentage de gènes du génome entier du rat associés à cette même annotation. Par exemple, 10 % des gènes de l'utilisateur sont des kinases, tandis que 1 % des gènes du génome humain (population de fond) sont des kinases. Ainsi, la p-value (EASE score) est $< 0,05$, ce qui suggère que les kinases sont significativement enrichies pour cet exemple particulier.

L'analyse « Functional annotation cluster » permet suite à l'identification des annotations présentes et enrichies au sein de notre liste (« Functional annotation chart»), de regrouper les annotations qui partagent des fonctions similaires sous forme de cluster. Ces groupes (cluster) d'annotations sont classés par importance, du plus enrichi au moins enrichi, à l'aide d'un score d'enrichissement : Z-score. Ce Z-score est calculé à partir de la moyenne géométrique des p-values de chaque annotation présente dans le groupe donné, à laquelle une

transformation - log est appliquée. Dans notre étude, nous nous intéressés plus particulièrement aux Z-score > 1,3 (correspondant à $-\log 0,05$) (Huang et al., 2009).

Enfin, l'analyse « Functional annotation table » fait un récapitulatif de toutes les annotations associées à chacun des gènes présents dans notre liste. En effet, un même gène peut intervenir dans différents GO BP.

En résumé, nous nous sommes principalement intéressés dans cette étude, aux processus biologiques (GO BP) significativement enrichis ($p < 0,05$), ou aux GO BP appartenant à des clusters d'annotations possédant un Score d'Enrichissement (Z-score) supérieur à 1,3 (Huang et al., 2009).

Les informations obtenues suite à l'analyse fonctionnelle de chaque liste, ont ensuite permis de construire des graphes tel que celui obtenu en Figure 31 (p146) présentant en ordonnées les processus biologiques (GO BP) enrichis ($p\text{-value} < 0,05$ ou $Z\text{-score} > 1,3$) chez les rats exposés en comparaison aux témoins à chacun des temps d'analyse, et en ordonnée le nombre de gènes présents / impliqués dans chaque GO BP.

D'autre part, nous avons également examiné les voies métaboliques KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) significativement enrichies ($p < 0,05$), une collection de cartes qui représentent les connaissances sur les réseaux et interactions moléculaires présents au sein de voies de signalisation biologiques.

4.2. Protéomique

4.2.1. Analyse MudPIT des surnageants de LBA

Les surnageants de LBA (n=5 rats par groupe, témoin et exposé, immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition) ont été hydrolysés par la trypsine. Les peptides obtenus ont été dessalés puis séchés avant d'être chargés sur une nano-colonne chromatographique constitué de 2 parties : une partie phase inverse de 10 cm Polaris C18 5µm (Hichrom) ; et une partie échangeuse de cations de 4 cm Partisphere 5 SCX (Whatman). La colonne a ensuite été directement connectée à une source d'ionisation par électronébulisation, montée sur un spectromètre de masse à piège d'ions linéaires LTQ (Thermo-Fisher).

La séparation chromatographique des peptides a été réalisée à un débit de 300 nL / min délivré par le système HPLC (chromatographie liquide haute performance) Agilent 1200 équipé d'un diviseur de flux. Les peptides ont été élués en utilisant une procédure d'identification multidimensionnelles des protéines (MudPIT) en 10 étapes (Fuchs et al., 2011). Les expériences ont été réalisées selon les normes MIAPE (Taylor et al., 2007).

Ensuite, les données ont été analysées à l'aide de la plateforme intégrée IP2 en utilisant le programme ProLuCID (Xu et al., 2015). Les protéines différentiellement exprimées entre le groupe témoin et le groupe exposé ont été identifiées à chacun des 3 temps post-exposition, en utilisant une ANOVA ($p < 0,05$), disponible dans le programme « Identification Stat Compare » de la plateforme IP2. Les échantillons ont été comparés statistiquement en fonction des comptages de spectres.

Puis, les protéines différentiellement exprimées chez les rats exposés, ont été identifiées en utilisant la base de données Uniprot Knowledge Base (Uniprot KB). Cette liste

des protéines différentiellement exprimées a ensuite été analysée à l'aide des bases de données GeneCards[®] et DAVID v6.7. Dans notre étude, DAVID a permis d'identifier les fonctions biologiques modifiées suite à l'exposition des rats à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ ; et de comparer les données de protéomique avec celles de transcriptomique. Les protéines qui partagent des fonctions similaires ont ainsi été regroupées en termes de GO BP, GO CC et GO MF. Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressés aux GO BP significativement enrichis ($p < 0,05$), ou appartenant à des groupes d'annotations avec un Score d'Enrichissement (Z score) supérieur à 1,3 ; de la même manière que pour l'analyse transcriptomique détaillée ci-avant (Huang et al., 2009).

Les informations obtenues suite à l'analyse de chaque liste, nous ont ensuite permis de construire des graphes tel que celui en Figure 33 (p152) présentant en ordonnées les processus biologiques (GO BP) enrichis ($p\text{-value} < 0,05$ ou $Z\text{-score} > 1,3$) chez les rats exposés en comparaison aux témoins à chacun des temps d'analyse, et en ordonnée le nombre de protéines présentes / impliquées dans chaque GO BP.

Nous avons également examiné les voies métaboliques KEGG significativement enrichies ($p < 0,05$).

Enfin, les réseaux d'interactions protéine-protéine (PPIN ou « Protein-Protein Interaction Networks ») présents parmi les protéines différentiellement exprimées identifiées dans les surnageants de LBA, ont été étudiées immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition, en utilisant la base de données STRING v10.5 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (Szklarczyk et al., 2015). Cette base de données permet de prédire les associations entre protéines *via* des interactions directes ou indirectes.

Ces réseaux d'interactions sont des graphes dont les nœuds (sommets) correspondent aux protéines/gènes, et les arêtes représentent une interaction entre les protéines / gènes qu'elles

relient. Ces interactions peuvent être directes (physiques) ou indirectes (fonctionnelles, participation au même processus cellulaire ou à la même voie métabolique). La couleur des arêtes indique le type d'interaction, notamment les interactions connues (en bleu-clair : interactions mentionnées dans des bases de données et validées manuellement par des scientifiques, en fuchsia : interactions déterminées expérimentalement en laboratoire et référencées dans des bases de données) ou les interactions prédites en vert, rouge et bleu foncé (Szklarczyk et al., 2015, Szklarczyk et al., 2017).

Une analyse statistique des résultats est obtenue pour chaque réseau d'interactions et permet de renseigner sur un éventuel enrichissement statistique, notamment *via* le calcul d'une p-value. Plus la p-value est faible et plus le réseau est enrichi, ce qui indique que les interactions protéine-protéine sont significatives et ne sont pas dues au hasard.

4.2.2. Expression de cytokines dans le LBA

Un criblage protéique ciblant l'expression de 29 protéines impliquées dans l'inflammation dont une majorité de cytokines et chimiokines, a été effectué sur les surnageants de LBA collectés immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition, à l'aide d'un kit Proteome Profiler™ Rat Cytokine Array, Panel A (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Brièvement, les surnageants (pool de 5 animaux par groupe exposé ou témoin pour chacun des 3 temps d'analyse) ont été incubés avec un cocktail d'anticorps de détection biotinylés, puis le mélange échantillon/anticorps a été appliqué sur des membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont immobilisés au préalable, des anticorps spécifiques de 29 cytokines et chimiokines présentes chez le rat : CINC-1 (Cxcl1), CINC-2 α / β (Cxcl3), CINC- 3 (Cxcl2), CNTF, Fractalcine (Cx3cl1), GM-CSF, sICAM-1, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL- 6, IL-10, IL-13, IL-17, IP-10 (Cxcl10), LIX (Cxcl5), L-sélectine, MIG (Cxcl9), MIP-1a

(Ccl3), MIP-3a (Ccl20), RANTES (Ccl5), Thymus chimiokine (Cxcl7), TIMP-1, TNF-a et VEGF. Les complexes « cytokine/anticorps de détection » présents se sont fixés spécifiquement sur les anticorps de capture correspondants. Les membranes ont ensuite été lavées (afin d'éliminer ce qui ne s'est pas fixé), incubées avec le mélange streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) et le réactif de détection Chemi Reagent Mix™ ; afin de révéler chaque spot correspondant à la quantité de cytokine liée à l'aide de l'appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Les données obtenues ont été analysées en utilisant un test de Student (t-test). Les changements ont été considérés statistiquement significatifs à $p < 0,05$.

5. Analyse statistique des données de cytologie et biochimie du

LBA

L'analyse statistique des données de cytologie et biochimie du LBA a été réalisée en utilisant un test ANOVA à 2 facteurs (temps et traitement). Les changements ont été considérés statistiquement significatifs à $p < 0,05$.

Chapitre 4 : Résultats

1. Caractérisation de l'aérosol et mesures diverses

La partie génération et caractérisation de l'aérosol a été réalisée avant mon arrivée en thèse, par le laboratoire GCAT (Génération et caractérisation des atmosphères de travail) de l'INRS, sous la direction de Frédéric Cosnier ; comme indiqué ci-avant. Les caractéristiques physiques et chimiques de l'aérosol ont été publiées précédemment (Cosnier et al., 2016). Ses principales caractéristiques sont présentées dans le tableau VII.

Tableau VII : Principales caractéristiques de l'aérosol nanostructuré de TiO₂ généré. DAMN: Diamètre aérodynamique médian en nombre ; DAMM: Diamètre aérodynamique médian en masse ; GSD: Ecart-type géométrique (Geometric standard deviation) ; ELPI : impacteur basse pression à détection électrique ; SIOUTAS : impacteur en cascade.

Taille des particules (nm)	Surface spécifique (m ² /g)	Concentration de l'aérosol en masse (mg/m ³)	Concentration de l'aérosol en nombre (particules/cm ³)	DAMN (nm) (ELPI)	DAMM (nm) (SIOUTAS)
21.5 ± 7.2	51	10.17 ± 3.29	24000 ± 6400	269 (GSD : 2.22)	905 (GSD : 2.19)

1.1. Surveillance de l'aérosol

1.1.1. Concentration en masse (mg/m³)

L'aérosol de TiO₂ P25 a été généré à une concentration cible de 10 mg/m³. Compte tenu des différences interspécifiques en termes de paramètres respiratoires et de dose déposée pulmonaire, cette concentration et ce temps d'exposition concernent l'exposition professionnelle moyenne pondérée de 8h d'un travailleur à 0,3 mg/m³, la limite d'exposition recommandée par le NIOSH pour le TiO₂ ultrafin; tout au long de sa carrière (Annexe 3).

La concentration massique réelle de notre campagne d'exposition, mesurée par échantillonnage gravimétrique était de 9,91 ± 3,35 mg/m³ ; proche de la concentration cible (10 mg/m³) (Tableau VII).

1.1.2. Concentration en nombre (particules/cm³)

Les profils de concentration en nombre ont été mesurés avec un compteur à noyaux de condensation (CPC) modèle 3007 de TSI. Les CPC mesurent le nombre total de particules fines et ultrafines dans un milieu gazeux. Les particules prélevées sont grossies par condensation sur leur surface d'une vapeur d'un fluide dit « fluide de condensation ». Les particules ainsi grossies peuvent être facilement détectées optiquement.

Les profils de concentration obtenus étaient similaires tout au long de la période de génération, avec chaque lot de poudre. La concentration moyenne en nombre de particules ayant un diamètre supérieur à 10 nm, était de 24 000 particules / cm³ (\pm 6400 écart-type) (diamètre > 10 nm) (Tableau VII).

1.2. Caractérisation de l'aérosol

1.2.1. Distribution en taille (f(masse))

L'utilisation d'un impacteur en cascade en routine, a permis une caractérisation robuste de la distribution granulométrique des particules en suspension dans l'air. La distribution granulométrique mesurée par analyse gravimétrique à l'aide de l'impacteur en cascade SIOUTAS a révélé que près de 80 % de la masse totale de particules en suspension dans l'air correspondait à des particules de 250 nm à 2500 nm de diamètre. Le diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) a été déterminé comme étant de 0,905 μ m, avec un écart-type géométrique (GSD) de 2,19 (Tableau VII, Figure 23).

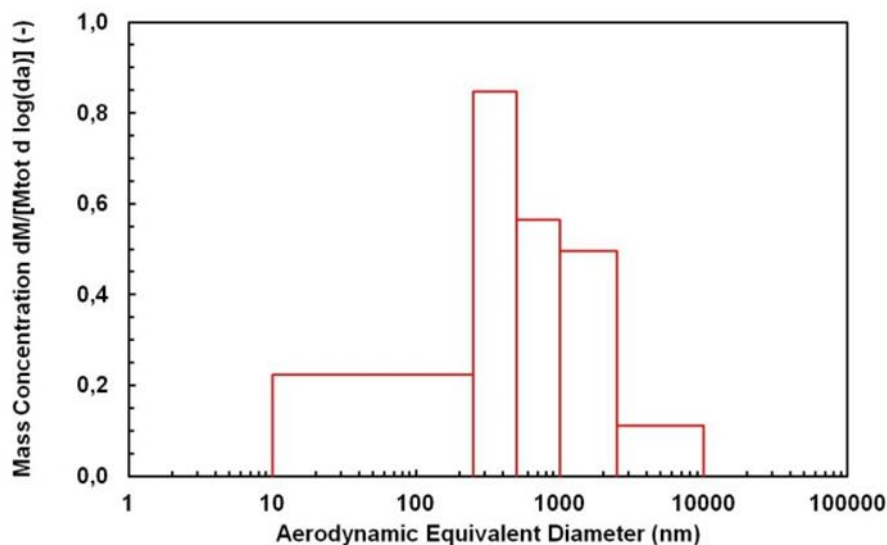


Figure 23 : Diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) de l'aérosol nanostructuré de TiO₂ déterminé à l'aide de l'impacteur en cascade SIOUTAS.

1.2.2. Distribution en taille (f(nombre))

Le diamètre aérodynamique médian en nombre (DAMN) a été déterminé comme étant de 269 nm, avec un GSD de 2,22 ; à l'aide d'un impacteur basse pression de détection électrique (ELPI) (Figure 24).

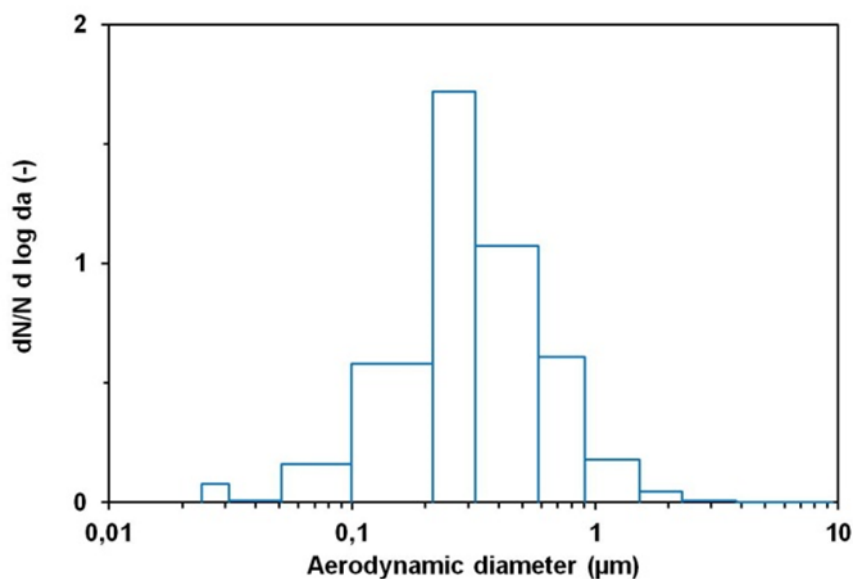


Figure 24 : Diamètre aérodynamique médian en nombre (DAMN) de l'aérosol nanostructuré de TiO₂ déterminé à l'aide de l'impacteur basse pression de détection électrique ELPI.

1.2.3. Microscopie électronique

L'aérosol a été directement collecté sur des grilles de microscopie électronique à transmission (MET) à l'aide d'un mini-échantillonneur de particules, MPS ECOMESURE ; afin de caractériser la morphologie des particules. Les photos en Figure 25 montrent que les particules (taille primaire d'environ 25 nm) sont sous la forme d'agglomérats mesurant plusieurs centaines de nanomètres à quelques micromètres. Les agglomérats sont principalement constitués de la forme cristallographique anatase du TiO₂, en accord avec les observations de la poudre à partir de laquelle l'aérosol a été généré (Disdier et al., 2015).

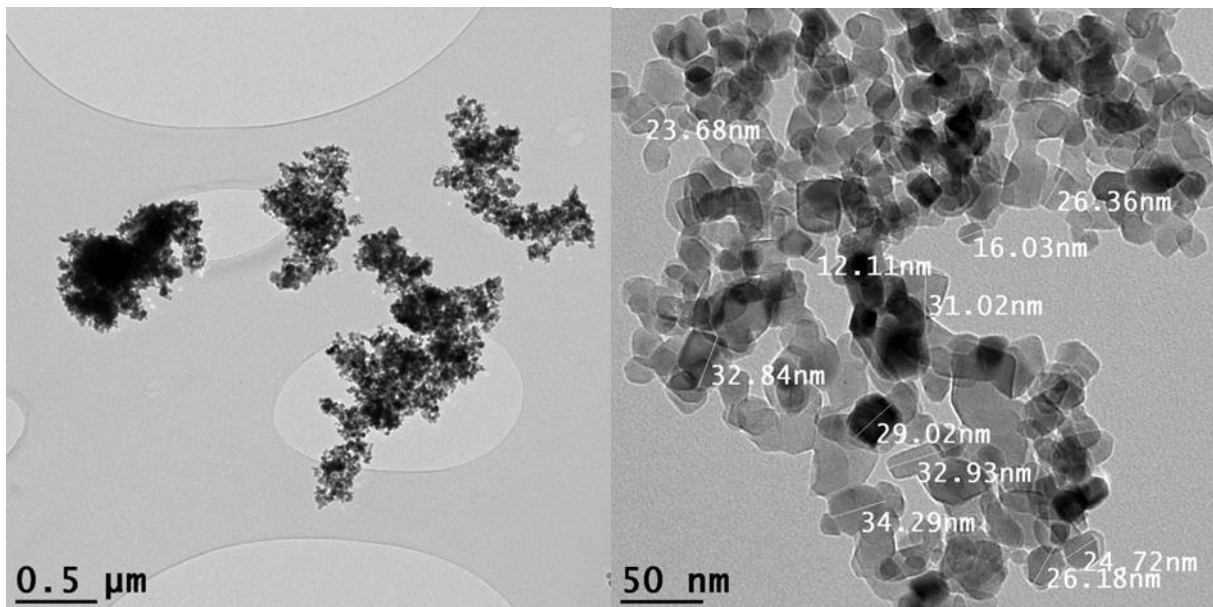


Figure 25 : Images en microscopie électronique à transmission (TEM) d'un échantillon d'aérosol nanostructuré de TiO₂.

1.3. Rétention et élimination du titane pulmonaire

Après une exposition de 1 mois, les mesures par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) ont détecté $2086 \pm 94 \mu\text{g}$ (moyenne \pm écart type) de titane dans les poumons de rats ($n = 6$). En supposant que les rats ont un volume respiratoire de

228 mL/min (= volume courant \times fréquence respiratoire = $1,9 \times 120$), cela correspond à une fraction déposée de 0,212 (Figure 26). La demi-vie d'élimination pulmonaire du titane est d'environ 98 jours (Gate et al., 2017).

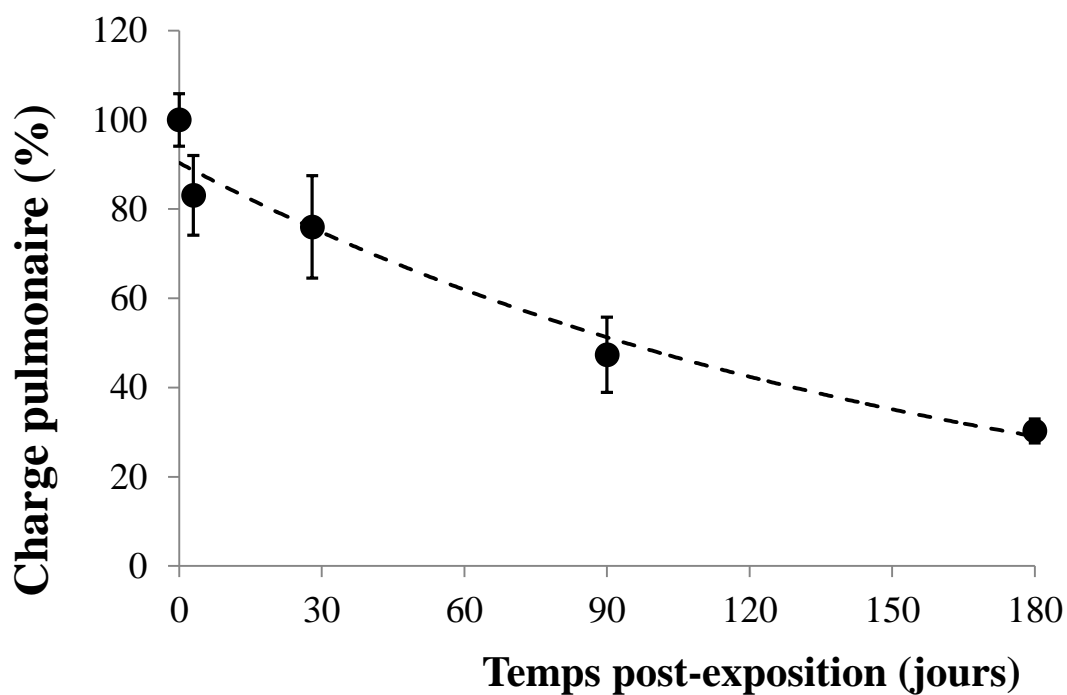


Figure 26 : Charge pulmonaire et élimination du titane après exposition subaiguë des rats à l'aérosol nanostructuré de TiO₂.

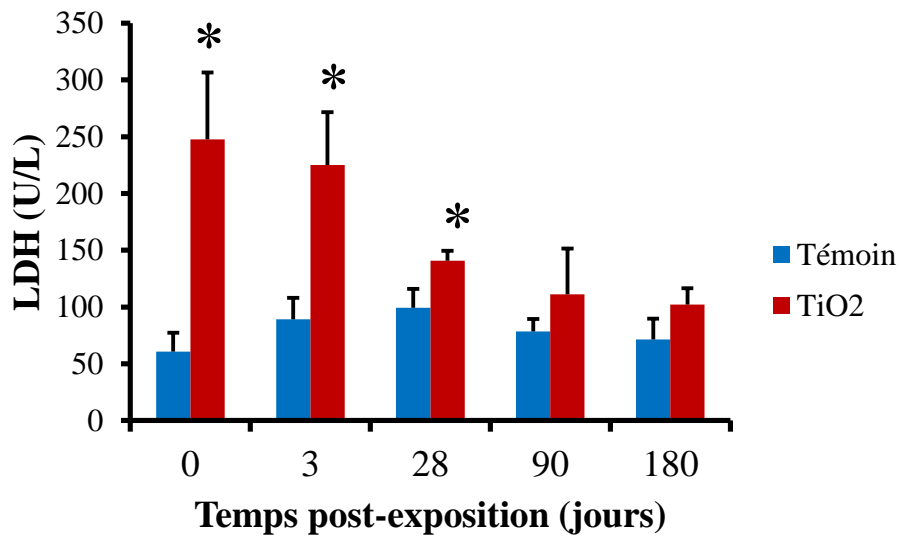
Mesure de l'élimination du titane dans les poumons de rats (n = 6 animaux).

2. Analyse du LBA

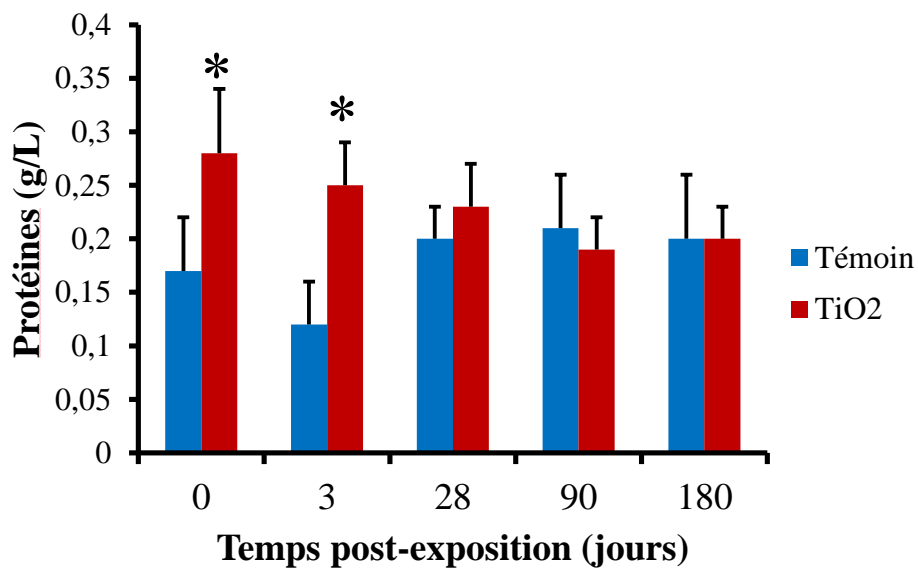
2.1. Analyse biochimique du lavage broncho-alvéolaire et morphométrie du poumon

Suite à la période d'exposition de 4 semaines à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, l'activité LDH était fortement augmentée dans le LBA à court terme (témoins *vs* rats exposés): $60,7 \pm 16,6$ *vs* $247,7 \pm 58,9$ U / L à J0, et $89,2 \pm 19,0$ *vs* $225,2 \pm 46,6$ U / L à J3. Cette activité était encore significativement plus élevée chez les animaux exposés à J28 ($p < 0,05$), mais elle a ensuite diminué pour revenir au niveau de celle des témoins à long terme (Figure 27A). En parallèle, une augmentation significative de la concentration en protéines totales dans le LBA a été observée à court terme ($p < 0,05$): $0,17 \pm 0,05$ *vs* $0,28 \pm 0,06$ g / L à J0 et $0,12 \pm 0,04$ *vs* $0,25 \pm 0,04$ g / L à J3, dans les groupes témoins *vs* exposés. A plus long terme, les niveaux de protéines totales n'étaient pas significativement différents entre les groupes témoins et exposés (Figure 27B). D'autre part, la masse pulmonaire était augmentée à court terme: $1,23 \pm 0,06$ *vs* $1,48 \pm 0,09$ g à J0 et $1,28 \pm 0,09$ *vs* $1,45 \pm 0,08$ g à J3, dans les groupes témoins *vs* exposés. De manière similaire, aucune différence n'a été détectée à plus long terme (Figure 27C).

A



B



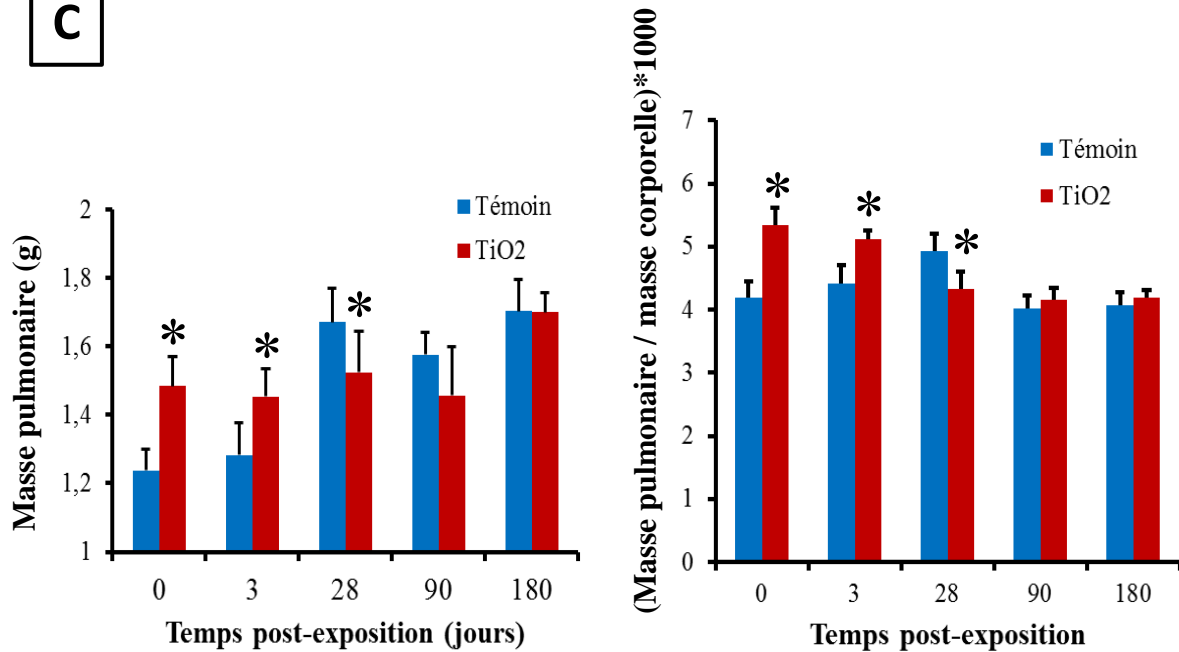
C

Figure 27 : Mesure de l'activité LDH et du contenu protéique dans le LBA ; ainsi que de la masse pulmonaire chez les rats témoins et exposés.

A. Activité LDH chez les rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ (n = 6 animaux par groupe). *Significativement différent du témoin (p < 0,05).

B. Contenu en protéines totales chez les rats témoins et exposés à l'aérosol de TiO₂ (n = 6 animaux par groupe). *Significativement différent du témoin (p < 0,05).

C. A gauche : masse pulmonaire chez les rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ (n = 6 animaux par groupe). A droite : masse pulmonaire normalisée par la masse corporelle (n = 6 animaux par groupe). *Significativement différent du témoin (p < 0,05).

2.2. Cytologie du lavage broncho-alvéolaire

L'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ a entraîné un afflux considérable de granulocytes neutrophiles dans l'espace alvéolaire du poumon gauche à court terme: $0,01 \pm 0,005 \times 10^6$ vs $1,06 \pm 0,24 \times 10^6$ à J0 et $0,03 \pm 0,01 \times 10^6$ vs $1,07 \pm 0,4 \times 10^6$ à J3, dans les groupes témoins et exposés. Cet afflux a diminué au cours du temps, tout en restant significatif (p < 0,05) jusqu'à J180: $0,22 \pm 0,11 \times 10^6$ à J28; $0,08 \pm 0,03 \times 10^6$ à J90 et $0,09 \pm 0,03 \times 10^6$ à J180. Le nombre de macrophages alvéolaires était augmenté dans les échantillons recueillis à J3 et J28: $0,85 \pm 0,08 \times 10^6$ vs $1,45 \pm 0,41 \times 10^6$ à J3 et $0,72 \pm 0,06 \times 10^6$ vs $1,14 \pm 0,13 \times 10^6$ à J28 dans les groupes témoins vs exposés. En revanche, le nombre de lymphocytes

alvéolaires était similaire au cours du temps chez les animaux témoins et exposés (Figure 28, Annexe 4).

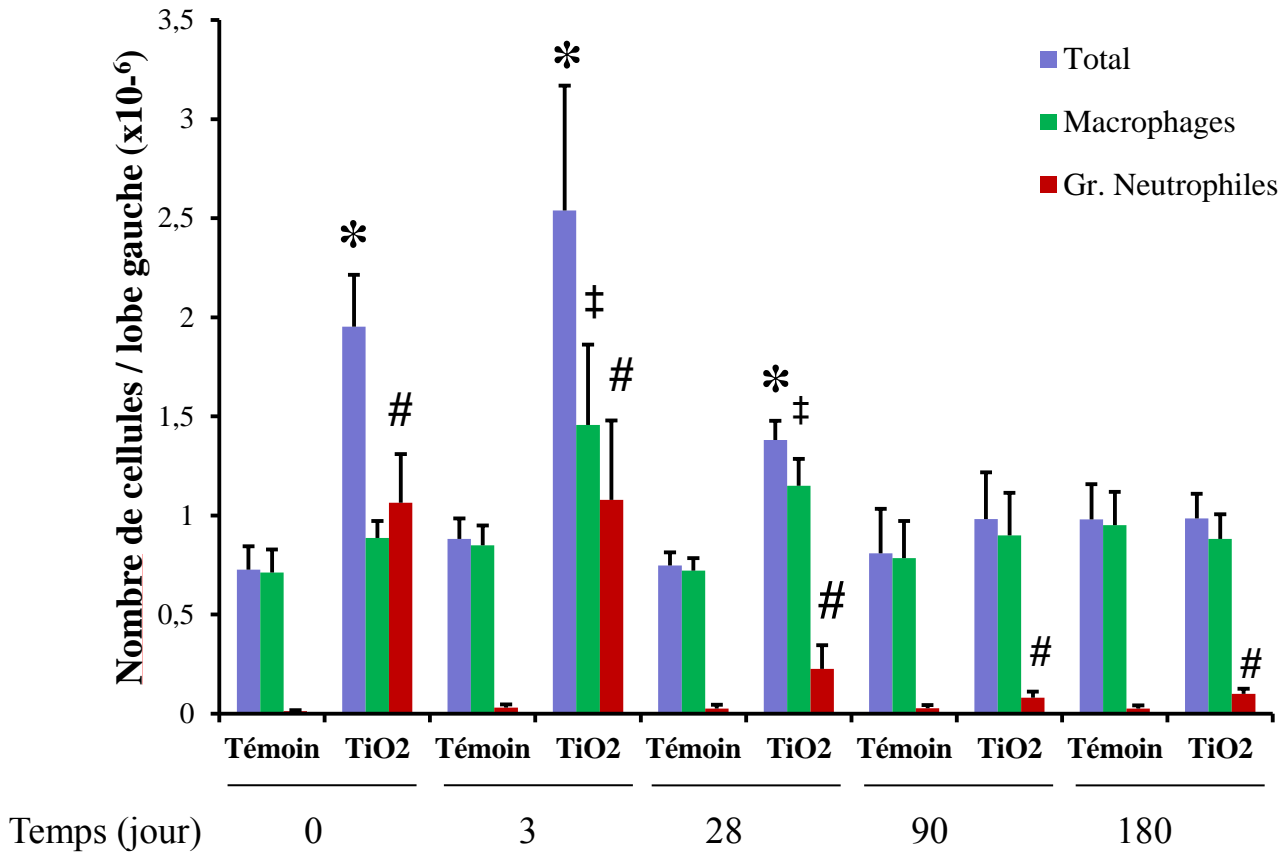


Figure 28 : Cytologie du LBA chez les rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ (n = 6 animaux par groupe).

Le diagramme représente le nombre total de cellules présentes dans le LBA (violet) chez les rats témoins et exposés, déterminé à l'aide du Cellometer[®] vision (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) après coloration à l'acridine orange / iodure de propidium. Parmi ces cellules, les macrophages sont représentés en vert et les granulocytes neutrophiles en rouge.

Gr : Granulocytes. *Significativement différent du témoin (p < 0,05).

3. Histopathologie pulmonaire et des ganglions lymphatiques associés aux poumons

Immédiatement et 3 jours suivant la fin de l'exposition, des macrophages chargés de particules ont été détectés dans la lumière alvéolaire des animaux exposés. De plus, la prolifération des pneumocytes de type II a entraîné une épithélialisation minimale des parois alvéolaires. Des foyers d'inflammation granulomateuse ont été observés dans les alvéoles chez certains animaux exposés (Figures 29). Dans le tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT) et les ganglions lymphatiques, des particules intracellulaires à distribution multifocale ont été détectées chez les animaux exposés. Des particules ont également été observées dans quelques cellules ressemblant à des macrophages et cellules dendritiques (Figures 30). À J180, des macrophages chargés de particules ont été observés dans la lumière des alvéoles pulmonaires et des bronches ; ainsi qu'une épithélialisation alvéolaire ; chez tous les animaux exposés (Figures 29). La plupart des macrophages chargés en particules était regroupé sous forme d'agrégats, généralement situés à côté des canaux alvéolaires et des bronchioles terminales. Une épithélialisation minimale a été observée au niveau de la paroi alvéolaire entourant ces agrégats. Des particules intracellulaires modérément diffuses ont été détectées dans les ganglions lymphatiques de tous les animaux exposés (Figure 30). De plus, des particules ont été observées dans plusieurs cellules dispersées ressemblant à des macrophages et cellules dendritiques. Aucun autre résultat pertinent n'a été mis en évidence dans les sections pulmonaires colorées avec le trichrome de Masson pour la recherche de fibres de collagène.

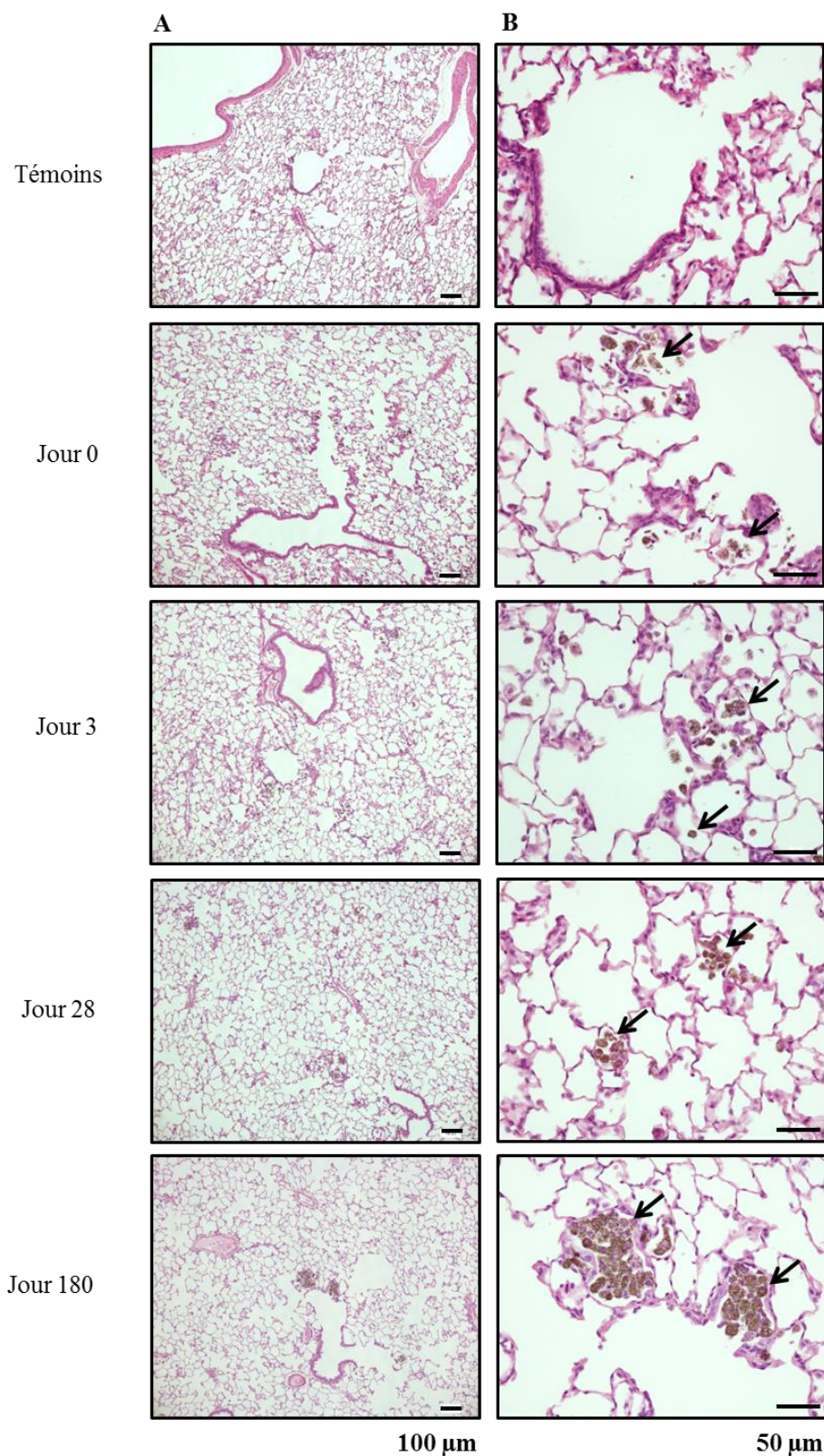


Figure 29 : Coupes de tissus pulmonaires de rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, colorées à l'hématoxyline-éosine.

Poumons de rats témoins (A), et exposés (B) immédiatement, 3, 28 et 180 jours suivant la fin de l'exposition. Les flèches noires indiquent la présence de macrophages chargés de particules.

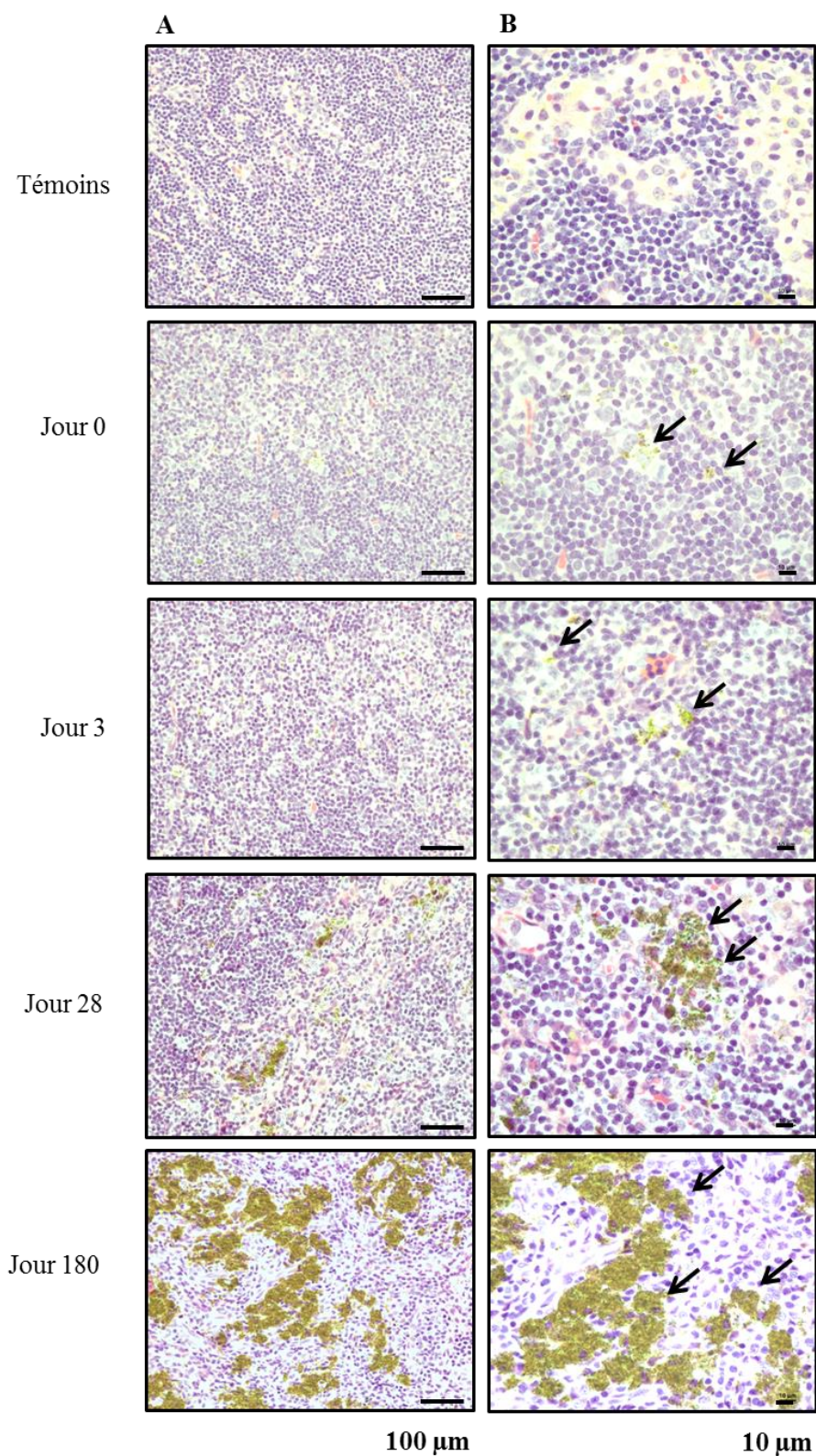


Figure 30 : Coupes de tissus ganglionnaires lymphatiques de rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, colorées à l'hématoxyline-éosine.

Ganglions lymphatiques de rats témoins (A) et exposés (B) immédiatement, 3, 28 et 180 jours suivant la fin de l'exposition. Les flèches noires indiquent la présence de particules intracellulaires.

4. Analyse transcriptomique

L'analyse des échantillons recueillis à J0 a mis en évidence un total de 350 transcrits différentiellement exprimés dans les poumons. Le nombre de gènes dérégulés a diminué avec le temps. En effet, à J3, J28, J90 et J180, respectivement, un total de 226, 209, 120 et 92 transcrits étaient exprimés de manière différentielle (Tableau VIII): $FC \geq |1,5|$, $f\text{-values} \leq |0.01|$.

Tableau VIII : Résultats de transcriptomique.

Nombre de gènes différentiellement exprimés dans les poumons de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, immédiatement, 3, 28, 90 et 180 jours après la fin de l'exposition.

*Fold Change $\geq |1.5|$, $f\text{-value} \leq |0.01|$.

Temps post-exposition	Nombre de sondes différentiellement exprimées	Nombre de transcrits sur / sous-exprimés*	Nombre de transcrits sur-exprimés	Nombre de transcrits sous-exprimés
J0	372	350	267	83
J3	238	226	137	89
J28	227	209	124	85
J90	132	120	69	51
J180	102	92	57	35

A J0, 350 transcrits uniques représentés par 372 sondes, étaient différentiellement exprimés dans les poumons de rats exposés.

A J3, 226 transcrits uniques représentés par 238 sondes, étaient différentiellement exprimés dans les poumons de rats exposés.

A J28, 209 transcrits uniques représentés par 227 sondes, étaient différentiellement exprimés dans les poumons de rats exposés.

A J90, 120 transcrits uniques représentés par 132 sondes, étaient différentiellement exprimés dans les poumons de rats exposés.

A J180, 92 transcrits uniques représentés par 102 sondes, étaient différentiellement exprimés dans les poumons de rats exposés.

Les principaux processus biologiques (GO BP) dérégulés au niveau des poumons, enrichis (Z score > 1,3 ou p < 0,05) et communs aux différents temps post-exposition, étaient liés à l'inflammation notamment « inflammatory response », « immune response », « neutrophil chemotaxis » (Figure 30). A J0, J3, J28, J90 et J180, respectivement, 33, 24, 11, 10 et 6 gènes différentiellement exprimés étaient liés à la réponse inflammatoire (Figure 30, Annexe 5), notamment *Saa4* (sérum amyloïde A4, une apolipoprotéine de la phase aiguë de l'inflammation), des chimiokines et cytokines (*Cxcl1*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl7*, *Spp1*), certains composants du complément (*C3*, *C4bpa*), le fibrinogène (*Fgg*) ou la prothrombine (facteur II ; *F2*). Les modifications de l'expression des gènes ont été principalement observées jusqu'à J3 (réponse à court terme). De manière intéressante, les gènes codant des chimiokines notamment *Ccl2*, *Cxcl3*, *Cxcl2* et *Tnf* étaient d'abord surexprimés jusqu'à J28, puis sous-exprimés à J90, pour finalement revenir à un niveau d'expression basal à J180, (réponse à long terme). D'autres GO BP enrichis et communs, modifiés dans le poumon jusqu'à J180, tels que « response to organic substance », « regulation of transcription from RNA polymerase II promotor », « polysaccharide metabolic process » ; sont présentés dans la Figure 31.

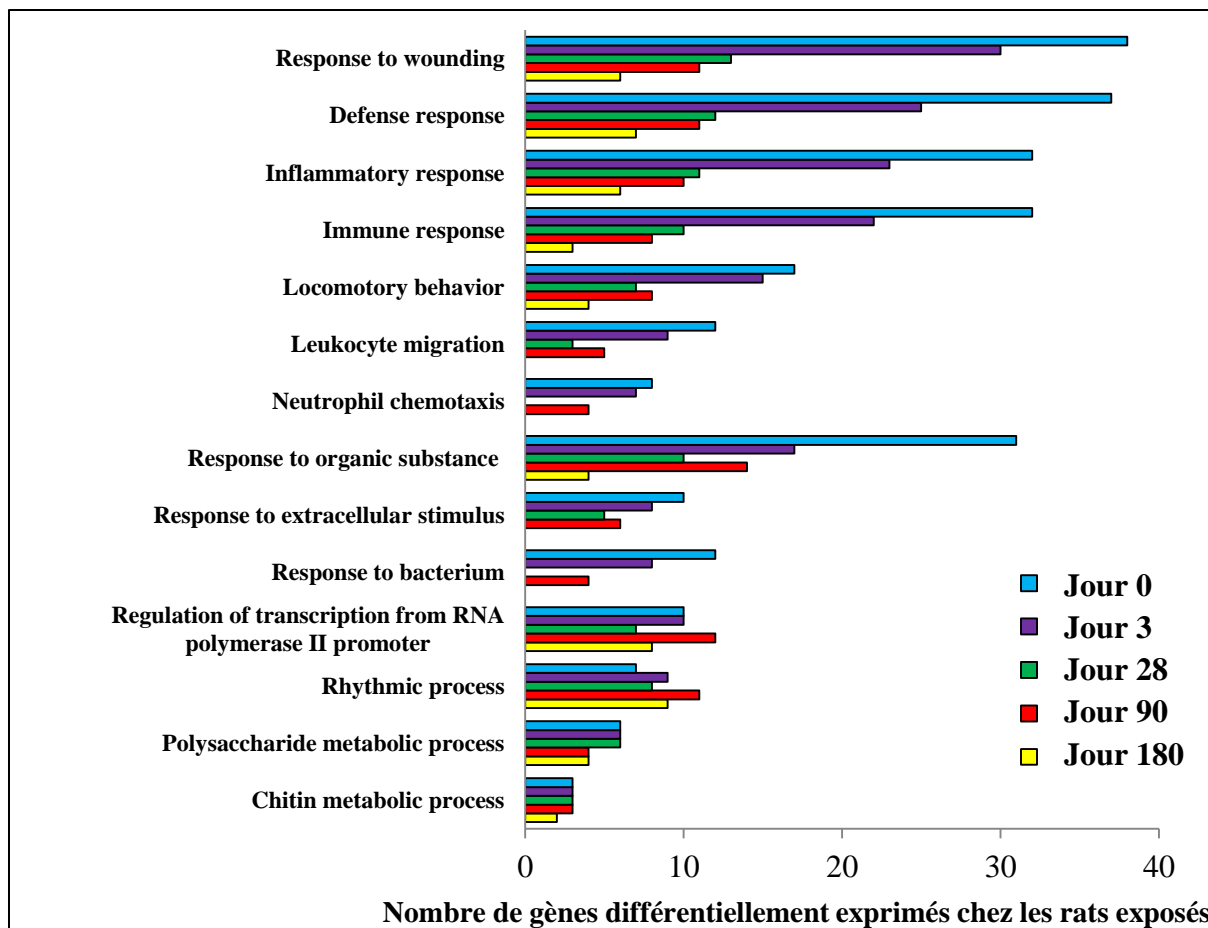


Figure 31 : Processus biologiques (GO BP) enrichis et communs, modifiés dans les poumons de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, jusqu'à 180 jours post-exposition (déterminés à l'aide de la base de données DAVID version 6.7). Z-score > 1,3 ou p < 0,05.

Quatorze GO BP modifiés et significativement enrichis au niveau des poumons de rats exposés, sont communs aux temps courts et longs. Ces principaux GO BP sont liés à l'inflammation notamment « inflammatory response », « immune response », « neutrophil chemotaxis ». D'autres GO BP notamment « response to organic substance », « regulation of transcription from RNA polymerase II promoter », « polysaccharide metabolic process » sont également modifiés et significativement enrichis jusqu'à J180.

En parallèle, 10 voies biologiques KEGG étaient significativement enrichies (p < 0,05) immédiatement après l'exposition (Annexe 6). Ce nombre diminuait ensuite au cours du temps. Comme les GO BP, les voies KEGG affectées suite à l'inhalation de l'aérosol nanostructuré de TiO₂ à court terme, étaient principalement liées à des réponses immunitaires ou

inflammatoires notamment « complement and coagulation cascades » et « chemokine signaling pathway ».

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux GO BP enrichis, modifiés uniquement à court ou long terme. Ces GO BP sont présentés dans la Figure 32. Par exemple, les GO BP « protein maturation », « vasodilatation » et « DNA packaging » étaient spécifiquement modifiés à court terme (Figure 32A). Le niveau d'expression de gènes impliqués dans le GO BP « blood circulation », un processus biologique lié à la vasodilatation, sont listés en Annexe 7. Ainsi, les gènes suivant : *Kininogen 1 (Kng1)* et *Kininogen 1-like 1 (Kng1l1)* étaient surexprimés jusqu'à J180 ; contrairement au gène *Natriuretic peptide receptor 3 (Npr3)* sous-exprimé. D'autre part, les GO BP « protein stimulus », « response to cold » et « gland morphogenesis » étaient spécifiquement modifiés à long terme (Figure 32B). Il est intéressant de noter que 3 processus biologiques sont modifiés et significativement enrichis à long terme (J90) chez les rats exposés à l'aérosol, bien que le TiO₂ soit considéré comme une particule faiblement toxique. Toutefois, même si un enrichissement statistique a été observé, il faut être prudent sur l'interprétation biologique de ces données principalement à long terme, en raison du faible nombre de gènes impliqués dans ces processus.

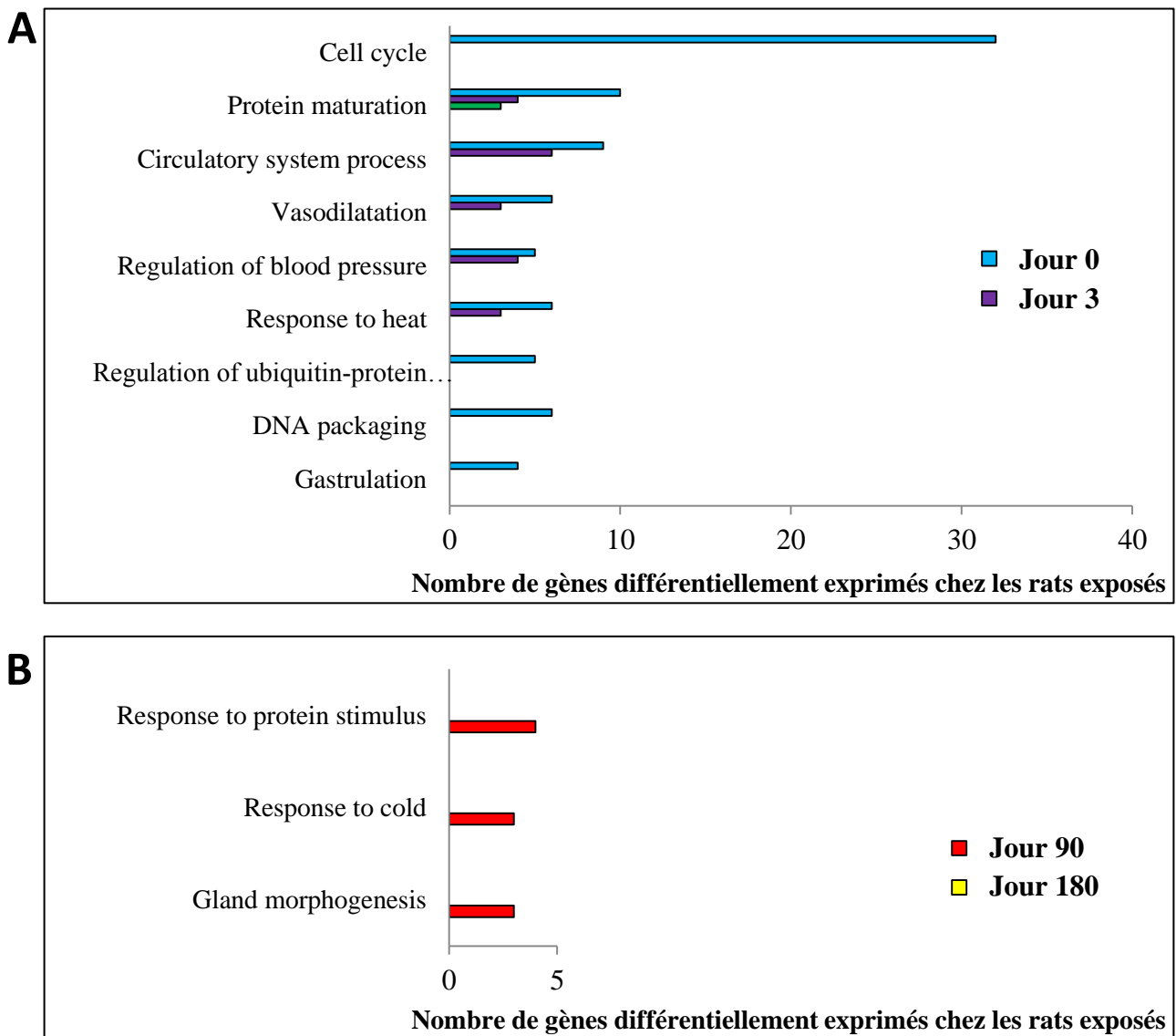


Figure 32 : Processus biologiques (GO BP) enrichis, modifiés dans les poumons de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, uniquement à court ou long terme (déterminés à l'aide de la base de données DAVID version 6.7). Z-score > 1,3 ou p < 0,05.
A. Neuf GO BP sont spécifiquement modifiés et significativement enrichis à court terme notamment « protein maturation », « vasodilatation » et « DNA packaging ».
B. Trois GO BP sont spécifiquement modifiés et significativement enrichis à long terme (J90) : « protein stimulus », « response to cold » et « gland morphogenesis ».

D'autre part, le niveau d'expression des gènes impliqués dans le GO BP « oxidation reduction » était modifié jusqu'à J180. Parmi ces gènes, *Sod2* était surexprimé à J0, *Dual oxydase 1 (Duox1)* jusqu'à J28 (Annexe 8). Les gènes *NADPH oxydase organizer 1 (NoxO1)*

et *NADPH oxidase activator 1 (NoxA1)*, impliqués dans la formation d'ERO notamment d'ions superoxydes, étaient surexprimés à J0 et J3.

Enfin, quelques gènes impliqués dans les GO BP « DNA repair » et « response to DNA damage stimulus » ; étaient différentiellement exprimés dans les poumons de rats exposés à J0: *Kif22*, *Pttg1*, *Sod2*, *Bard1*, *Top2a* et *Rad51* surexprimés ; ainsi que *Hspa1b* sous-exprimé. Ces 7 gènes sont ensuite revenus à un niveau d'expression basal à partir de J3.

5. Analyse protéomique

5.1. Analyse MudPIT des surnageants de LBA

La technologie d'identification multidimensionnelle des protéines (MudPIT), basée sur une analyse chromatographique, a été réalisée sur les surnageants de LBA immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition. L'analyse statistique des données a révélé que 137, 78 et 51 ENSRNOP (*Ensembl Protein identifiers*) étaient différentiellement exprimés de manière significative ($p < 0,05$) à J0, J3 et J180, respectivement. Immédiatement après la fin de l'exposition, 116 des 137 ENSRNOP ont été associés avec succès à 107 *UniprotKB identifiers* (base de données Uniprot). Trois jours post-exposition, 58 ENSRNOP sur 78 ont été associés avec succès à 50 *UniprotKB identifiers*. Cent quatre-vingts jours post-exposition, 45 des 51 ENSRNOP ont été associés avec succès à 45 *UniprotKB identifiers*.

L'analyse fonctionnelle biologique a été réalisée à l'aide de la base de données DAVID version 6.7. Les principaux GO BP dérégulés dans les surnageant de LBA, enrichis (Z score $> 1,3$ ou $p < 0,05$) et communs aux 3 temps post-exposition, étaient liés à l'inflammation, la protéolyse, l'organisation du cytosquelette, ainsi que la réponse à divers stimuli (Figure 33).

Une surexpression majoritaire des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire a été observée à court terme, notamment C4a, C4b, C4bpa, S100a8 (S100 Calcium Binding Protein A8), et Prdx2 (Peroxiredoxin 2). En revanche, une sous-expression majoritaire des protéines associées à l'inflammation notamment Kng1, les facteurs de coagulation II et XII (F2, F12), C8b, et Serpina3n (Serpina family A member 3) a été mise en évidence à J180.

Concernant les protéines impliquées dans la protéolyse, un processus biologique connu pour être activé au cours de l'inflammation, les cathepsines S et D (Ctss, Ctsd), certains

membres du protéasome notamment Psma3, Psma4; étaient surexprimés à court terme. En revanche, d'autres protéines protéolytiques telles que C8b, F2, F12, Ctsb, Ctsc, Napsa (Napsin A aspartic peptidase) et Myh9 (Myosin heavy chain 9) étaient sous-exprimées à court terme.

Un autre processus biologique commun, altéré suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ était lié à l'organisation du cytosquelette. Ainsi, une surexpression de diverses protéines telles que la vimentine (Vim); l'actine (Actn4, Actr3); Cap1 (CAP Adenylate cyclase-associated protein 1); Coro1A (Coronin 1A); Lcp1 (Lymphocyte cytosolic protein 1), la tubuline (Tuba3a, Tuba8, Tubb4); ainsi qu'une sous-expression de Gsn (Gelsolin) et de Cfl2 (Cofilin 2), ont été observées à court terme. A J180, une sous-expression des protéines Capza1 (Capping actin protein of muscle Z-line alpha subunit 1), Gsn, Lcp1, Myh9 et la superoxyde dismutase 1 (Sod1), a été mise en évidence.

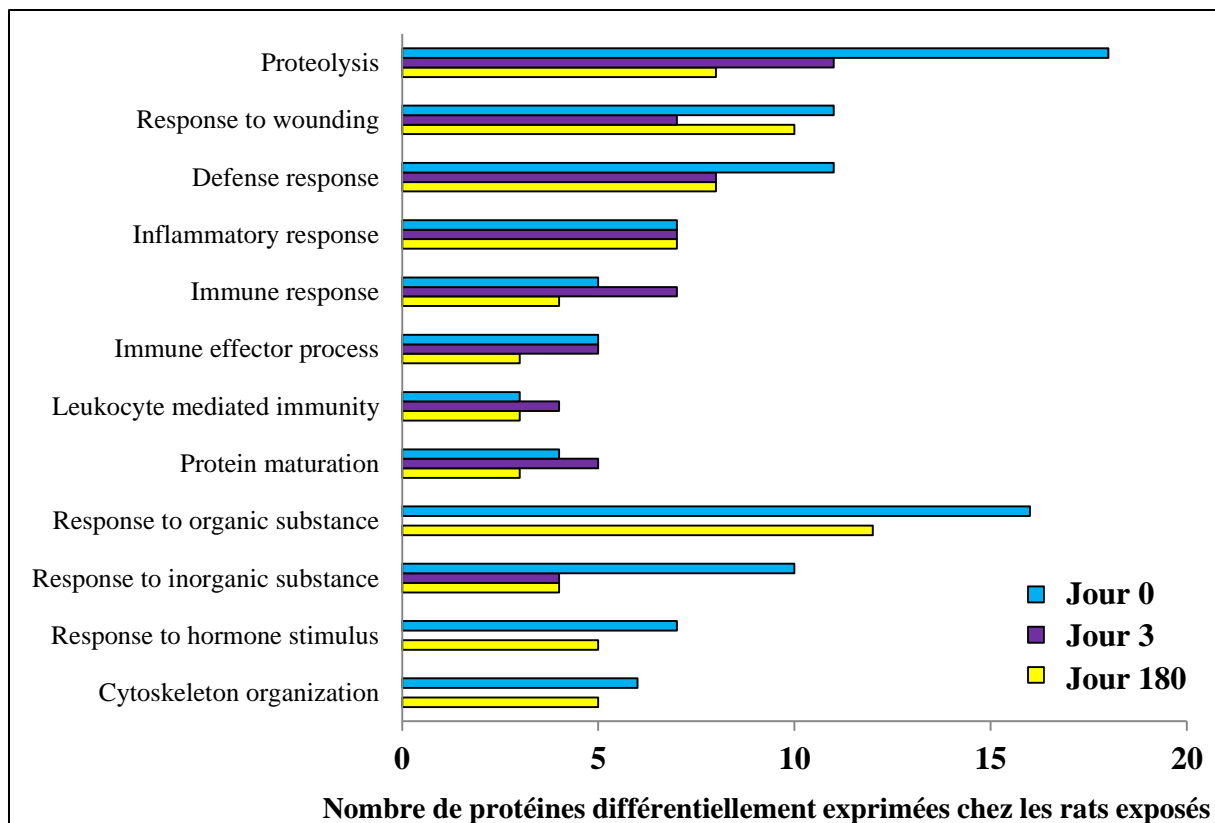


Figure 33 : Processus biologiques (GO BP) enrichis et communs, modifiés dans les surnageants de LBA de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition (déterminés à l'aide de la base de données DAVID version 6.7). Z-score > 1,3 ou p < 0,05.

Douze GO BP modifiés et significativement enrichis dans les surnageants de LBA de rats exposés, sont communs aux temps courts et longs. Ces principaux GO BP sont liés à l'inflammation notamment « inflammatory response », « immune response », la protéolyse, l'organisation du cytosquelette, ainsi que la réponse à divers stimuli.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux GO BP enrichis, modifiés uniquement à court ou long terme. Ces GO BP sont présentés dans la Figure 34. Par exemple, les GO BP « proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process » (sur-expression de Psma3, Psma4, Psma6, Psmb4), « cell cycle » (sur-expression de Psma3-6, Psmb4, Psmb5, Psmb10, Ppp1ca-c, Tubb3), « glucose metabolic process » (sur-expression de Mdh2, Pgam1, Rpia, Pygl) étaient spécifiquement modifiés à court terme (Figure 34A).

A long terme, 4 GO BP étaient spécifiquement altérés suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂; « response to drug » « regulation of blood coagulation » « response to cytokine stimulus » « lipid transport » (Figure 34B). Il est intéressant de noter que 4 processus biologiques sont modifiés et significativement enrichis à long terme (J180) chez les rats exposés à l'aérosol, bien que le TiO₂ soit considéré comme une particule faiblement toxique. Toutefois, même si un enrichissement statistique a été observé, il faut être prudent sur l'interprétation biologique de ces données principalement à long terme, en raison du faible nombre de protéines impliqués dans ces processus.

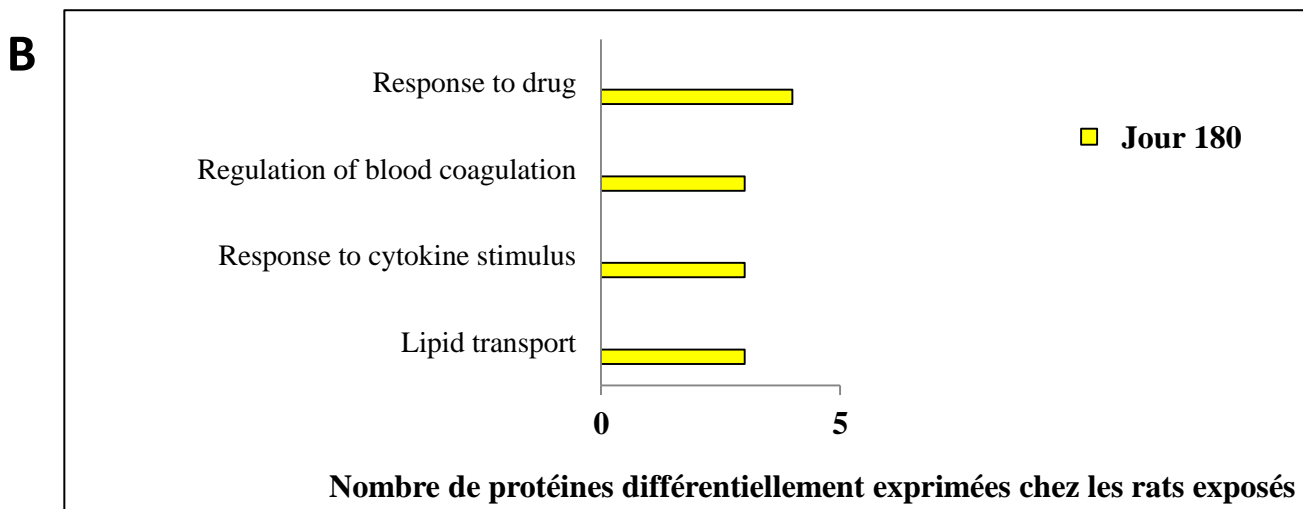
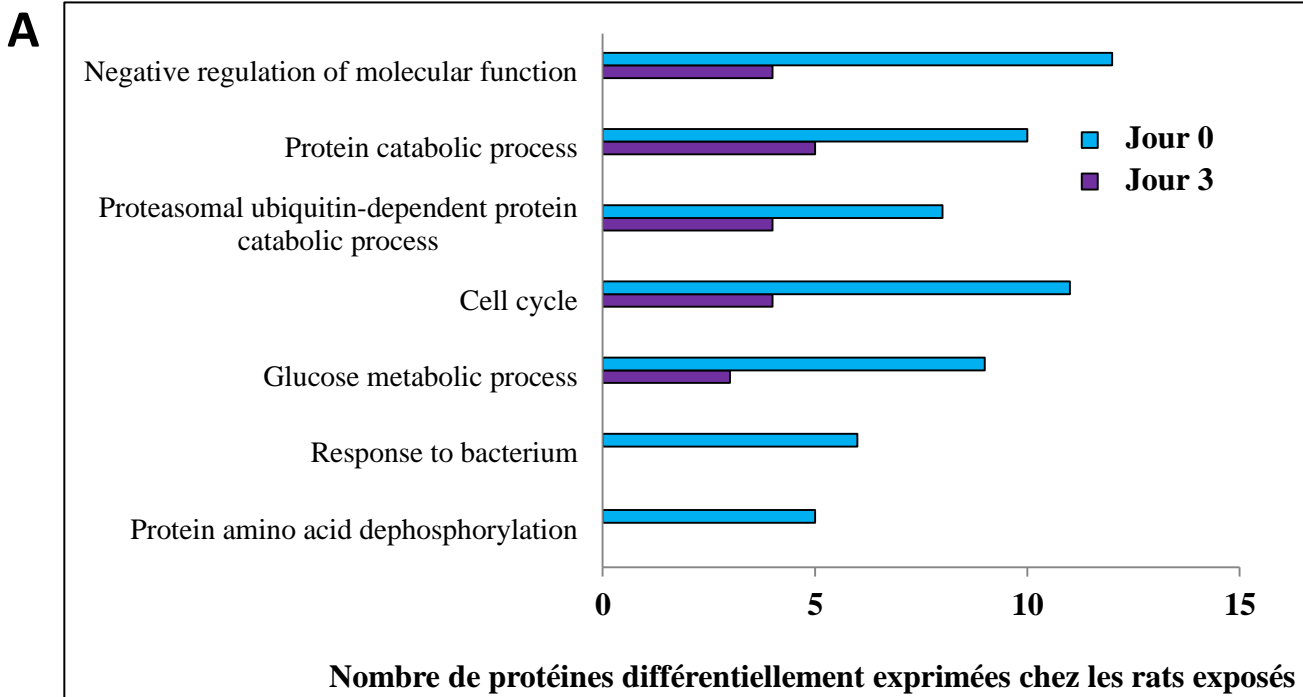


Figure 34 : Processus biologiques (GO BP) enrichis, modifiés dans les surnageants de LBA de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, uniquement à court ou long terme (déterminés à l'aide de la base de données DAVID version 6.7). Z-score > 1,3 ou p < 0,05.

A. Sept GO BP sont spécifiquement modifiés et enrichis à court terme notamment « proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process », « cell cycle » et « glucose metabolic process ».

B. Quatre GO BP sont spécifiquement modifiés et enrichis à long terme (J180) : « response to drug », « regulation of blood coagulation », « response to cytokine stimulus » et « lipid transport ».

D'autre part, les protéines impliquées dans le GO BP « oxidation reduction » telles que Prdx5, Lpo, Mpo, Xdh et Vat1, étaient principalement surexprimées chez les rats exposés à court terme, tandis qu'à J180, d'autres protéines telles que Sod1, Akr1a1 et Pdia3 étaient sous-exprimées.

De plus, une augmentation du niveau d'expression de diverses histones notamment H1, H2A, H2B, H3 et H4, impliqués dans l'assemblage de la chromatine, a été observée à court terme.

A J0, J3 et J180, respectivement 7, 3 et 3 voies biologiques KEGG étaient significativement enrichies ($p < 0,05$) (Tableau IX). Comme les GO BP, les voies KEGG affectées suite à l'inhalation de l'aérosol nanostructuré de TiO₂ à court terme, étaient principalement liées à la protéolyse (« proteasome pathway »), l'inflammation (« complement and coagulation cascade pathway ») et l'organisation du cytosquelette (« regulation of actin cytoskeleton »; « gap junction pathways » incluant des membres de la famille des tubulines α et β). A J180, la voie KEGG « complement and coagulation cascade » était toujours enrichie, mais les protéines impliquées dans cette voie étaient sous-exprimées chez les rats exposés.

Tableau IX : Voies métaboliques KEGG significativement enrichies dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, immédiatement, 3 et 180 jours suivant la fin de l'exposition (p-value < 0,05).

A J0, J3 et J180, respectivement 7, 3 et 3 voies biologiques KEGG étaient significativement enrichies (p < 0,05). La voie biologique KEGG « complement and coagulation cascades » est enrichie aux 3 temps.

Voies métaboliques KEGG	Nombre de protéines	p-value (< 0.05)	Protéines
Jour 0			
Proteasome	8	3.345E-7	PSMB10, PSMB5, PSMB4, PSMA6, PSMA5, PSMA4, PSMA3, RGD1564425
Complement and coagulation cascades	6	4.799E-4	CFB, C4B, C3, SERPINA1, C4BPA, PLG
Glutathione metabolism	5	0.001	GSS, LAP3, GPX1, GSTM2, GSTM4
Systemic lupus erythematosus	6	0.001	ACTN4, HIST1H4B, C4B, C3, HIST2H2BE, HIST3H2BA
Regulation of actin cytoskeleton	8	0.003	PPP1CA, ACTN4, GSN, CFL2, ARPC4, ARPC5, PPP1CC, PPP1CB
Oocyte meiosis	5	0.020	PPP1CA, PPP2CA, PPP2CB, PPP1CC, PPP1CB
Gap junction	4	0.041	TUBA8, TUBA3A, TUBA4A, TUBB3
Jour 3			
Proteasome	4	3.474E-4	PSMB4, PSMA6, PSMA4, PSMA3
Complement and coagulation cascades	4	9.371E-4	CFB, C4B, C1S, C4BPA
Systemic lupus erythematosus	3	0.027	HIST1H4B, C4B, C1S
Jour 180			
Complement and coagulation cascades	6	2.704E-6	KNG1, C8B, F12, C4B, F2, SERPINC1
Prion diseases	4	0.006	C8B, HSPA1A, HSPA1B, SOD1
Antigen processing and presentation	4	0.035	PDIA3, HSPA1A, CTSB, HSPA1B

D'autre part, afin de mieux comprendre les interactions entre les protéines différentiellement exprimées et identifiées dans les surnageants de LBA des rats exposés, les réseaux protéine-protéine ont été visualisés à J0, J3 et J180 à l'aide de la base de données STRING v10.5 (Figures 35, 36 et 37).

A J0, 5 réseaux principaux d'interaction protéine-protéine ont été identifiés, en lien avec les voies métaboliques KEGG enrichies « proteasome » comprenant notamment les protéines Psma3, Psma4, Psma5, Psma6, Psmb4, Psmb5, Psmb10; « complement and coagulation cascade » comprenant notamment les protéines C3, C4a, C4bpa, Plg, Serpina1 ;

« glutathione metabolism » comprenant notamment les protéines Gpx1, Gss, Gstm2, Gstm4, Lap3 ; « regulation of actin cytoskeleton » comprenant notamment les protéines communes : Actn4, Arpc4, Arpc5, Cfl2, Gsn, Ppp1ca, Ppp1cc, Ppp1cb ; « gap junction » comprenant notamment les protéines communes : Tuba3a, Tuba4a, Tuba8, Tubb3 (Figure 35). Nous avons également observé la présence d'un réseau d'interaction comprenant diverses histones (H1, H2 et H3) comme mentionné ci-dessus. Un réseau central est constitué de protéines impliquées dans la voie « Glucose metabolism » notamment Eno2, Pgam1, Pkm, Pygl, Txnrd2, ainsi que dans le processus biologique « oxidation-reduction » comme Gpx1, Mdh2, Prdx2, Prdx5, Pygl, Txnrd1 et Txnrd2. De manière intéressante, ces 7 réseaux interagissent directement les uns avec les autres, ou indirectement *via* d'autres protéines.

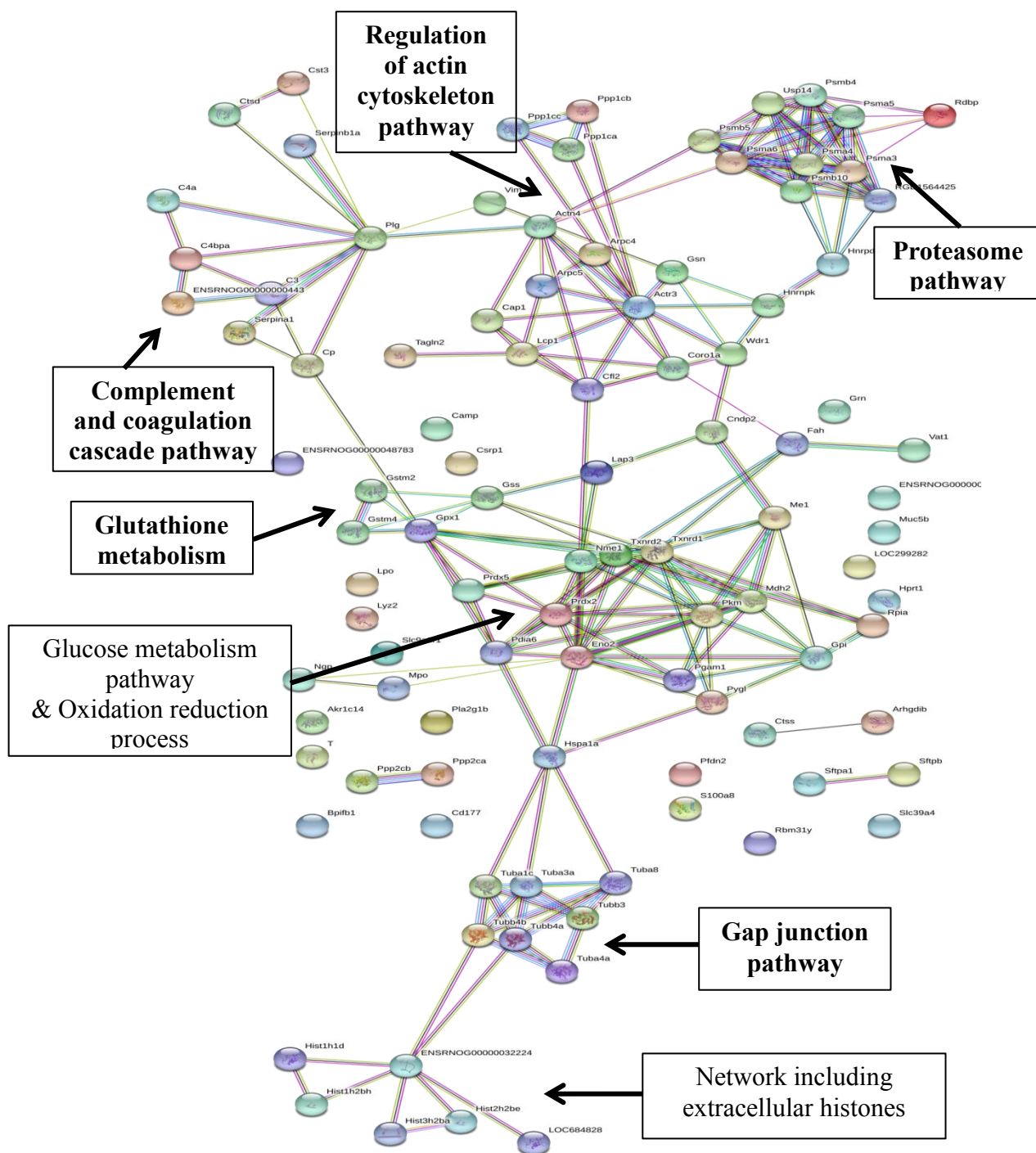


Figure 35 : Réseau STRING d'interactions protéine-protéine observées suite à l'analyse des protéines différentiellement exprimées dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition.

La liste comprenant l'ensemble des protéines différentiellement exprimées ($p < 0,05$) dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ obtenues à J0, a été téléchargée dans la base de données STRING v10.5. Les voies métaboliques KEGG significativement enrichies à J0 (obtenues à l'aide de la base de données DAVID) sont représentées en gras dans les encadrés. Légende : Les nœuds représentent les protéines, les arêtes correspondent aux interactions protéine-protéine. La couleur des arêtes indique le type d'interaction (connues en bleu-clair et fuchsia ou prédites en vert, rouge et bleu foncé).

A J3, 2 réseaux principaux d'interaction protéine-protéine ont été identifiés, en lien avec les voies métaboliques KEGG enrichies « proteasome » comprenant notamment les protéines Psma3, Psma4, Psma6, Psma8, Psmb4, et « complement and coagulation cascade » comprenant les protéines C1s, C4a, C4bpa (Figure 36). Ces 2 réseaux d'interactions protéiques sont indépendants, sans interaction directe ni indirecte.

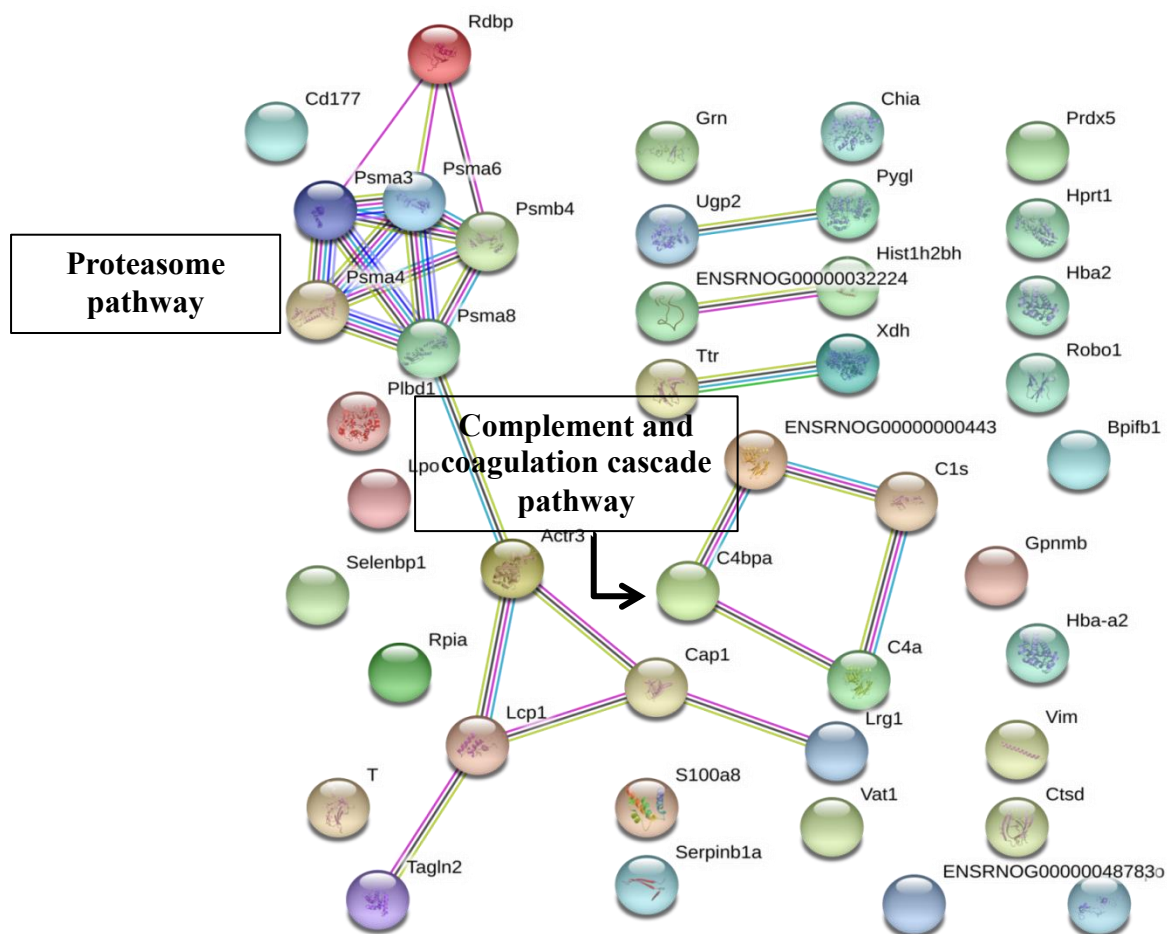


Figure 36 : Réseau STRING d'interactions protéine-protéine observées suite à l'analyse des protéines différentiellement exprimées dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, 3 jours suivant la fin de l'exposition.

La liste comprenant l'ensemble des protéines différentiellement exprimées ($p < 0,05$) dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ obtenues à J3, a été téléchargée dans la base de données STRING v10.5. Les voies métaboliques KEGG significativement enrichies à J3 (obtenues à l'aide de la base de données DAVID) sont représentées en gras dans les encadrés. Légende : Les nœuds représentent les protéines, les arêtes correspondent aux interactions protéine-protéine. La couleur des arêtes indique le type d'interaction (connues en bleu-clair et fuchsia ou prédites en vert, rouge et bleu foncé).

À J180, des interactions protéine-protéine sont toujours présentes même si elles sont moins nombreuses. Un réseau majeur d'interaction protéine-protéine a été observé, en lien à la voie métabolique KEGG enrichie « complement and coagulation cascade » comprenant notamment les protéines F2, F12, Kng1, Serpinc1 (Figure 37).

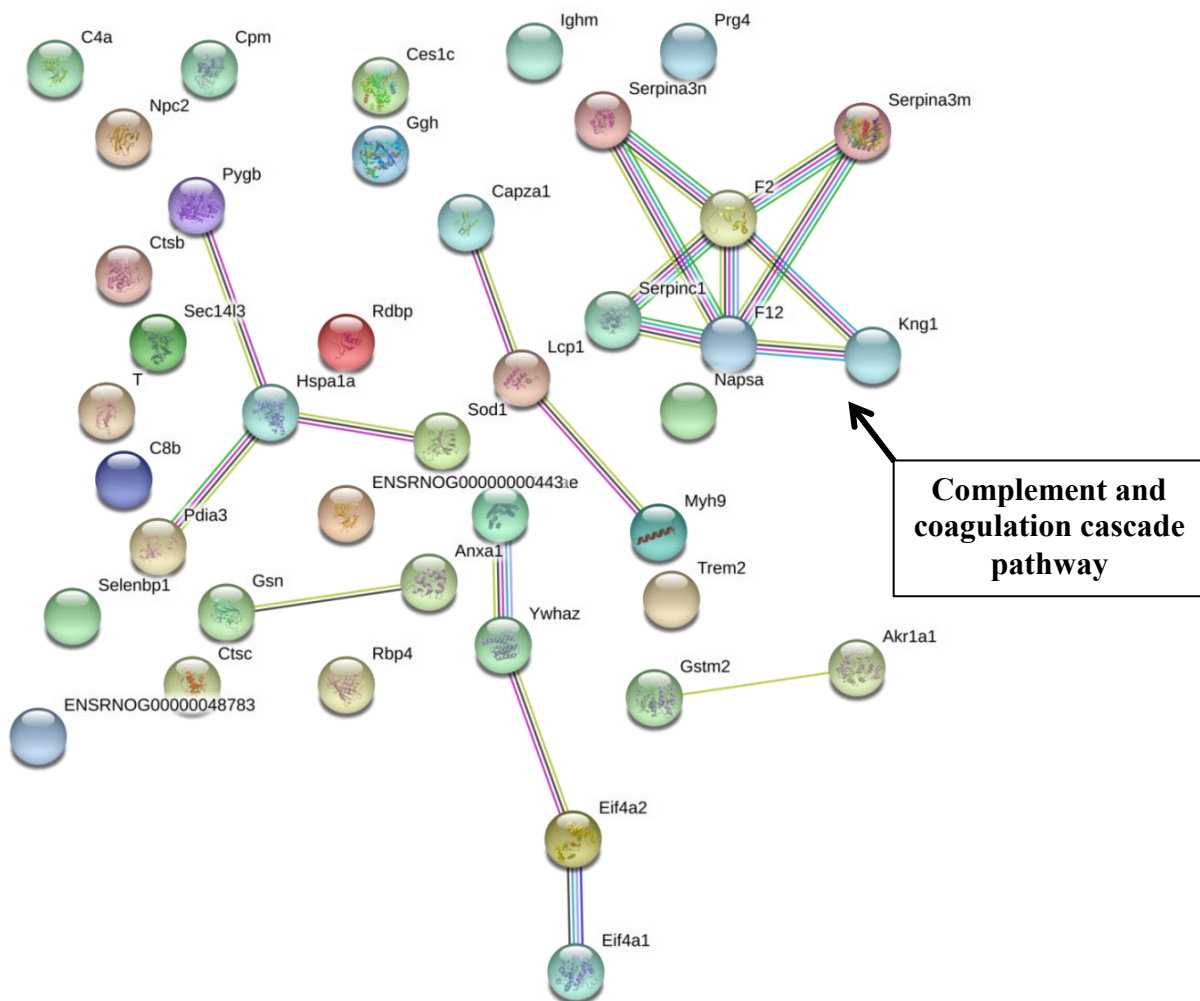


Figure 37 : Réseau STRING d'interactions protéine-protéine observées suite à l'analyse des protéines différentiellement exprimées dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, 180 jours suivant la fin de l'exposition.

La liste comprenant l'ensemble des protéines différentiellement exprimées ($p < 0,05$) dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ obtenues à J180, a été téléchargée dans la base de données STRING v10.5. Les voies métaboliques KEGG significativement enrichies à J180 (obtenues à l'aide de la base de données DAVID) sont représentées dans les encadrés. Légende : Les nœuds représentent les protéines, les arêtes correspondent aux interactions protéine-protéine. La couleur des arêtes indique le type d'interaction (connues en bleu-clair et fuchsia ou prédites en vert, rouge et bleu foncé).

Les données statistiques principales sur le réseau d'interactions notamment le nombre de nœuds et d'arêtes sont présentées dans le tableau X. A J0, J3 et J180, de faibles p-value ont été observées indiquant que les réseaux sont significativement enrichis, donc que les protéines interagissent entre elles de manière significative et non aléatoire.

Tableau X : Données statistiques principales calculées à partir des réseaux d'interactions protéine-protéine observées dans les surnageants de LBA des calculées à J0, J3 et J180 (String db v10.5).

Les nœuds représentent les protéines, les arêtes correspondent aux interactions existant entre ces protéines. Le degré moyen des nœuds correspond au nombre d'interactions qu'une protéine possède en moyenne au sein du réseau, ainsi les réseaux fortement connectés ont des valeurs élevées. La p-value renseigne sur l'enrichissement du réseau d'interaction. Plus la p-value est faible et plus le réseau est enrichi, ce qui indique que les interactions protéine-protéine sont significatives et ne sont pas dues au hasard.

	J0	J3	J180
Nombre de nœuds	101	43	40
Nombre d'arêtes	204	26	19
Degré moyen des noeuds	4.04	1.21	0.95
PPI enrichment p-value	< 1.0e-16	1.17e-12	1.57e-05

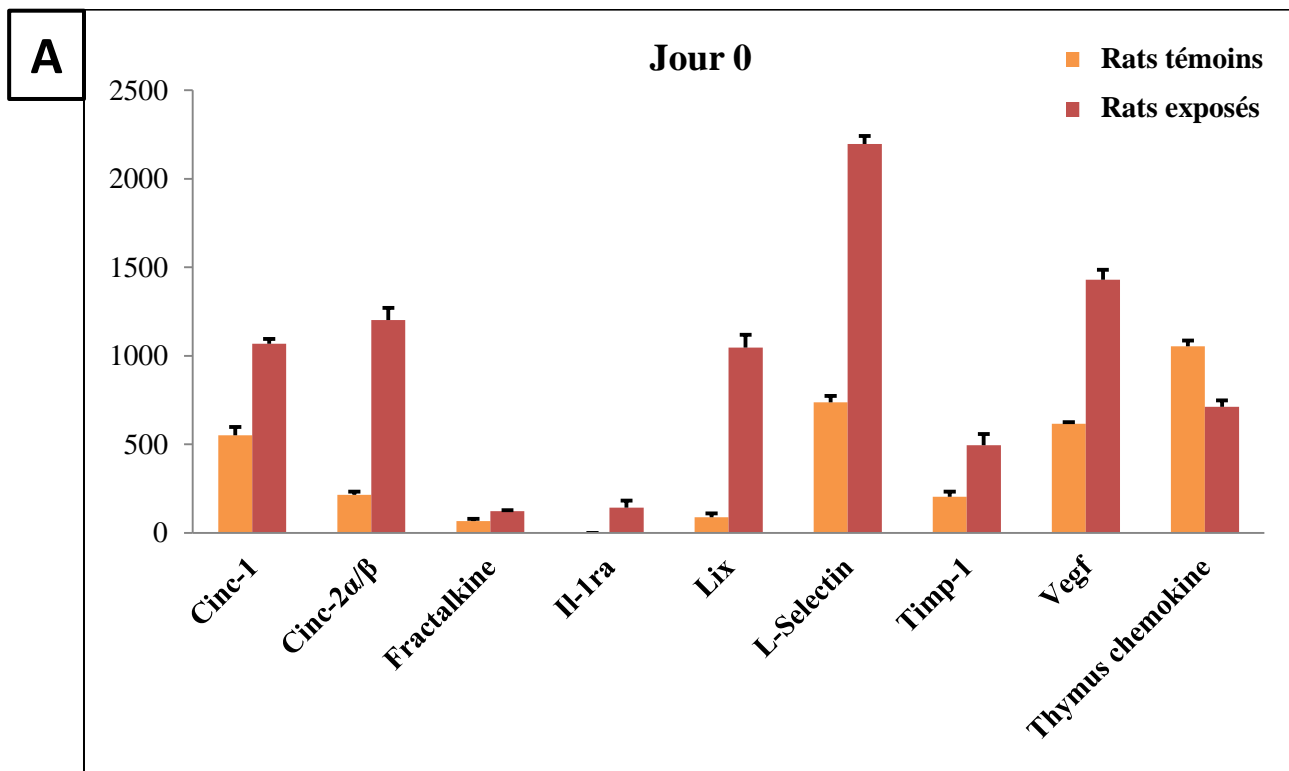
5.2. Niveaux d'expression de cytokines dans le lavage broncho-alvéolaire

L'expérience Proteome profiler[®] a indiqué que 9 des 29 cytokines analysées étaient différentiellement exprimées, de manière significative, dans les surnageants de LBA des rats exposés à J0 (p <0,05). Parmi ces 9 cytokines, 8 étaient surexprimées dont Cinc-1 (Cxcl1), Cinc-2 α / β (Cxcl3), Fractalkine (Cx3cl1), Lix (Cxcl5) ; tandis qu'une seule était sous-exprimée ; Thymus chemokine 1 (Cxcl7) ; chez les rats exposés (Figure 38A).

À J3, 9 cytokines étaient significativement surexprimées. Parmi ces protéines, 6 étaient déjà surexprimées à J0 : Cinc-1 (Cxcl1), Cinc-2 α / β (Cxcl3), Lix (Cxcl5), L-Selectine,

Timp-1 et Vegf. Thymus chemokine 1 (Cxcl7), sous-exprimée à J0, était ensuite surexprimée à J3 (Figure 38B).

À J180, 4 protéines étaient significativement sous-exprimées ($p < 0,05$): Cinc-2 α / β (Cxcl3), Fractalkine (Cx3cl1), Lix (Cxcl5) et Vegf, alors que comme mentionné ci-dessus, elles étaient surexprimées à court terme (Figure 38C).



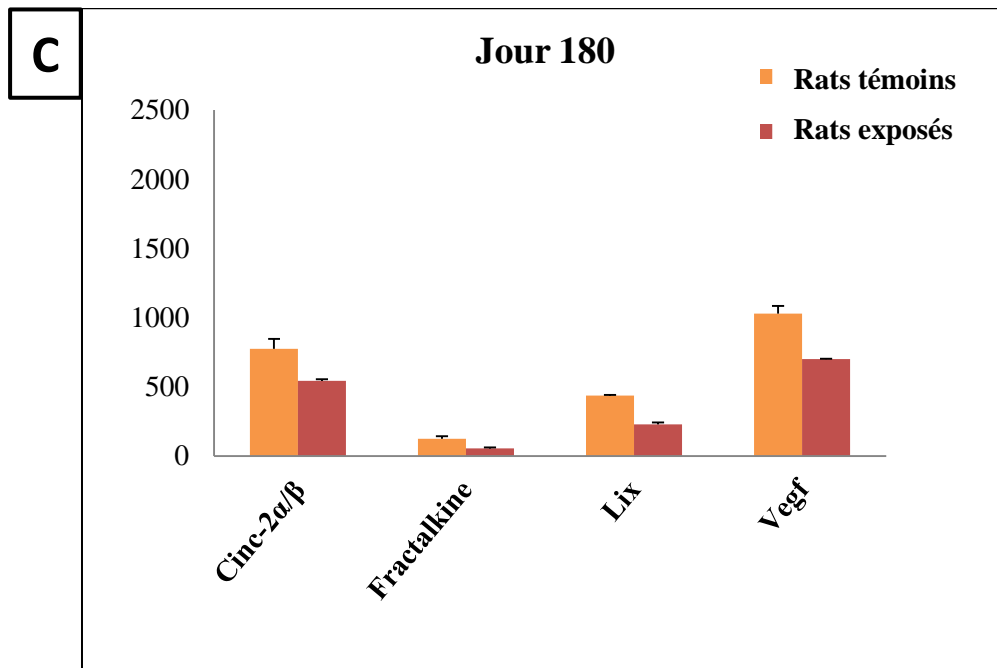
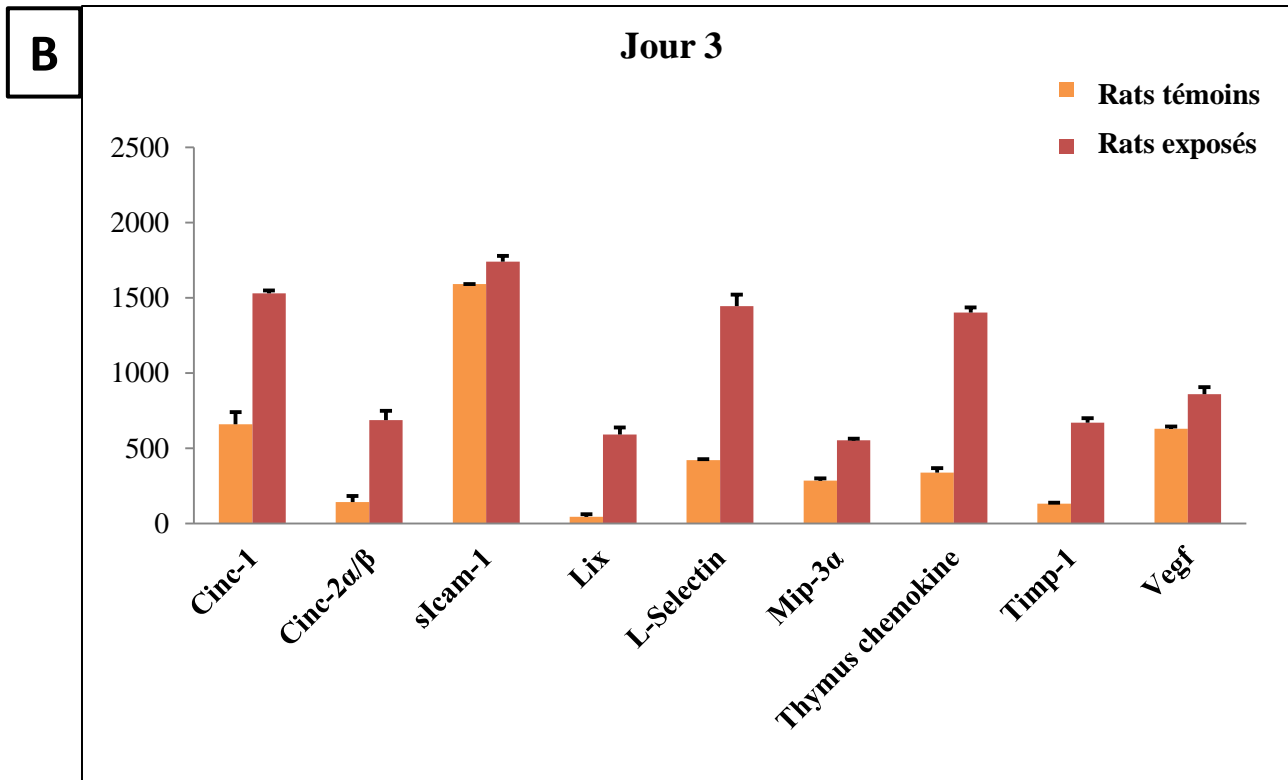


Figure 38 : Cytokines différenciellement exprimées, de manière significative, dans les surnageants de LBA des rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, immédiatement (A), 3 jours (B) et 180 jours (C) post-exposition (pool de 5 animaux par groupe témoin et exposé pour chacun des 3 temps d'analyse).

Le niveau d'expression de 29 cytokines a été analysé chez les rats témoins et exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition. Seules les protéines différenciellement exprimées ($p < 0,05$) sont représentées sur les graphiques.

Chapitre 5 : Discussion

1. Discussion méthodologique

Cette étude *in vivo* apporte de nouvelles informations sur les effets pulmonaires à long terme jusqu'à 6 mois post-exposition, résultant de l'inhalation d'un aérosol nanostructuré de NP de TiO₂. Pour cela, une approche multi-omique combinant transcriptomique et protéomique, associée à une approche de toxicologie conventionnelle ont été utilisées.

1.1. Modèle *in vivo* utilisé

Le rat représente un modèle de choix pour étudier la toxicologie des nanomatériaux. En effet, la majorité des travaux dans ce domaine, utilisent cette espèce (Bermudez et al., 2002, Bermudez et al., 2004, Ferin et al., 1992, Geiser et al., 2005, IARC, 2010, Lee et al., 1985, Oberdorster et al., 1994).

Dans notre étude, nous avons utilisé des rats F344 mâles âgés de 13 semaines au début de l'expérimentation. En effet, la ligne directrice OCDE n°412 « permettant de caractériser pleinement la toxicité par inhalation du produit chimique testé suite à une exposition subaiguë (28 jours), et de fournir des données fiables pour l'estimation quantitative des risques liés à l'inhalation » ; préconise l'utilisation « de jeunes rongeurs adultes, en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, l'emploi d'autres espèces devra être justifié » (OECD, 2017).

De plus, la détermination des VLEP du TiO₂ chez l'homme par le NIOSH est basée sur les données obtenues chez le rat. Actuellement, la pertinence du rat en tant que modèle pour l'évaluation chez l'homme, des dangers et des risques d'une exposition répétée aux particules faiblement solubles et faiblement toxiques; est encore remise en question par un certain nombre d'évaluations critiques notamment le développement de tumeurs pulmonaires suite à

la présence d'une surcharge pulmonaire (Morrow, 1988). Toutefois, le NIOSH a conclu, suite à l'évaluation des études expérimentales par inhalation et épidémiologiques disponibles, que les meilleures données à l'appui d'une évaluation quantitative des risques pour le TiO₂ proviennent d'études chroniques et subchroniques par inhalation chez le rat. Ces études ont fourni des données sur l'inflammation et le pouvoir cancérigène en fonction des expositions, utilisables comme base pour l'évaluation quantitative des risques (Binet et al., 2017, NIOSH, 2011).

D'autre part, les données de la littérature sont majoritairement obtenues à partir de rats mâles (Cullen et al., 2000, Geiser et al., 2005, Ma-Hock et al., 2009, Oberdorster et al., 1994, Tran et al., 2000, Warheit et al., 1997, Warheit et al., 1996a). Quelques études se sont également intéressées aux rats femelles, sans montrer de grandes différences par rapport aux résultats obtenus avec les rats mâles (Bermudez et al., 2002, Bermudez et al., 2004, Borm et al., 2000, Heinrich et al., 1995, Pott and Roller, 2005, Warheit et al., 2015).

Enfin, les rats mâles étaient âgés de 13 semaines au début de l'expérimentation. Nous avons choisi des rats jeunes puisque notre étude porte sur les conséquences à court et long terme (jusqu'à 6 mois post-exposition) d'une exposition par inhalation à un aérosol nanostructuré de TiO₂.

1.2.Exposition oro-nasale

Dans cette étude, les animaux ont été exposés par inhalation car il s'agit de la voie majeure d'exposition professionnelle. Nous avons choisi l'exposition oro-nasale en raison de ses nombreux avantages. Elle permet notamment de s'affranchir d'éventuelles contaminations par voies orale ou dermique, et respecte les voies naturelles et physiologiques de pénétration des aérosols.

Cependant, afin de réduire l'éventuel stress lié à la contention ; pouvant modifier certains paramètres respiratoires et biologiques, comme mentionné précédemment, une période d'acclimatation des rats aux tubes de contention a été nécessaire avant de les exposer à l'aérosol nanostructuré. De manière à ne créer aucun biais expérimental, les animaux témoins ont été manipulés et maintenus dans des tubes de contention de la même manière que les animaux exposés au nanoaérosol, mais ont été uniquement exposés à de l'air filtré.

1.3. Particules et dose utilisées

Le TiO₂ est un des nanomatériaux les plus utilisés actuellement en France. Il est retrouvé dans de nombreux domaines notamment en cosmétique, dans l'industrie agro-alimentaire, dans le secteur pharmaceutique, ainsi que dans le BTP et est largement utilisé comme photocatalyseur, comme agent stérilisant et comme agent bloquant les ultraviolets.

Dans notre étude, les rats ont été exposés à un aérosol nanostructuré de particules de TiO₂ obtenu à partir d'une poudre d'Aeroxide[®] TiO₂ P25 provenant de la société Evonik. Actuellement, le TiO₂ P25 Evonik est une des nanoparticules les plus étudiées *in vitro* et *in vivo* (OECD, 2015). Ce composé est également un matériau de référence standard du NIST et représente donc un candidat potentiel en tant que nanoparticule toxicologique de référence. Le TiO₂ P25 est une poudre nanocristalline sèche, composée d'une combinaison unique de structure cristalline anatase (80 %) et rutile (20 %) ; possédant un diamètre moyen de particule primaire d'environ 21 nm.

L'aérosol a été généré à l'aide d'une brosse tournante, à une concentration cible de 10 mg/m³. Comme décrit dans la partie résultats, en tenant compte des différences inter-espèces en termes de paramètres respiratoires et de dose pulmonaire déposée, cette concentration et le temps d'exposition correspondent à une exposition professionnelle

moyenne pondérée d'un travailleur pendant 8 h, à la concentration de $0,3 \text{ mg/m}^3$, valeur limite d'exposition recommandée par le NIOSH pour le TiO_2 ultrafin (NIOSH, 2011), tout au long de sa carrière (Annexe 3).

A la fin de la période d'inhalation, la concentration en titane dans les tissus pulmonaires était d'environ 2 mg/poumon chez les rats exposés. La demi-vie d'élimination pulmonaire du titane chez les rats étaient d'environ 90 jours (Gate et al., 2017). Ainsi, nous avons observé une légère augmentation de la biopersistance pulmonaire par rapport à la demi-vie d'élimination des particules faiblement solubles, médiée par les macrophages alvéolaires d'environ 60-70 jours (ECETOC, 2013, Oberdorster, 1995). La surface spécifique (BET) mesurée étant de $51 \text{ m}^2/\text{g}$, elle correspond à une surface de particules déposée dans les poumons de rats d'environ 1000 cm^2 . Au niveau du poumon, après inhalation, les particules se déposent préférentiellement dans la région alvéolaire proximale (PAR). La surface de cette région est estimée à 300 cm^2 et ne représente qu'une partie de la surface totale du poumon (environ 4100 cm^2) (Donaldson et al., 2008). Dans notre étude, la surface de particules par unité de surface de PAR est d'environ $5 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ alors que la dose seuil pour l'apparition de l'inflammation est estimée à environ $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ (Donaldson et al., 2008). Ainsi la présence d'une forte inflammation pulmonaire à la fin de l'exposition qui décline avec le temps, est en accord avec ces données.

Enfin, la présence de macrophages chargés de NP de TiO_2 dans l'épithélium pulmonaire et les ganglions lymphatiques associés aux poumons, suggère une conservation des mécanismes d'élimination des particules, par l'escalator mucociliaire ou par translocation de la région alvéolaire vers les ganglions lymphatiques, et est en défaveur d'une paralysie macrophagique par surcharge.

1.4. Analyses transcriptomique et protéomique

L'analyse transcriptomique a été réalisée sur la totalité du lobe accessoire pulmonaire, cela a permis d'analyser l'expression des gènes de l'ensemble des types cellulaires constituant le poumon (comprenant les pneumocytes I, II, macrophages, cellules endothéliales, neutrophiles...), sans cibler une population spécifique. Une telle approche permet d'observer la réponse pulmonaire globale induite par l'exposition au TiO₂, mais aussi les différentes interactions cellulaires se produisant tout au long de cette réponse.

Le traitement bioinformatique des données de transcriptomique et protéomique a été effectué en utilisant la base de données DAVID. Actuellement, de nombreuses bases de données de transcriptomique sont disponibles, notamment IPA[®] (Poulsen et al., 2013, Poulsen et al., 2015a), GSEA. La base de données DAVID a été utilisée dans de nombreuses études (Halappanavar et al., 2011, Halappanavar et al., 2015, Poulsen et al., 2015a, Rahman et al., 2017) et permet d'identifier de manière fiable les voies de transduction du signal et les processus biologiques modifiés par les nanoparticules (Huang et al., 2009).

2. Discussion des résultats

2.1. Réponse à court terme

2.1.1. Approche conventionnelle

Dans la région alvéolaire pulmonaire des rats exposés au TiO₂, nous avons observé une forte réponse inflammatoire à court terme, caractérisée par une augmentation dans le LBA du nombre de cellules totales, de neutrophiles, du contenu en protéines totales, et de l'activité LDH. A condition que la quantité de nanoparticules déposées dans les poumons est suffisante, les études s'intéressant à la réponse pulmonaire suite à l'inhalation/instillation de particules nanostructurées chez le rat ou la souris (Bermudez et al., 2002, Bermudez et al., 2004), ont toutes souligné la présence d'une inflammation pulmonaire caractérisée par une augmentation de ces mêmes paramètres dans le LBA (Bermudez et al., 2004, Halappanavar et al., 2011, Ma-Hock et al., 2009, Rahman et al., 2017, Warheit et al., 2007b).

La réponse inflammatoire aiguë est une réponse physiologique normale à l'exposition à des nanomatériaux, visant à mettre en place l'environnement cellulaire nécessaire à leur élimination, ainsi qu'à la protection du tissu pulmonaire

Les particules, au même titre que des bactéries, sont reconnues comme des corps étrangers qui vont interagir avec les cellules pulmonaires, macrophages ou cellules épithéliales. Ces cellules vont alors libérer des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires qui vont attirer des cellules inflammatoires principalement les granulocytes neutrophiles, sur le lieu de dépôt des particules (Figure 4) (Williams and Chambers, 2014). En 2016, Chen et coll. ont montré chez la souris que l'initiation de l'inflammation pulmonaire suite à une exposition de souris à des NP de carbone, n'impliquait pas les macrophages alvéolaires contrairement à ce qui est généralement admis, mais plutôt les cellules épithéliales (Chen et

al., 2016). Bien que ces données obtenues chez la souris avec un seul type de nanomatériaux, nécessitent d'être confirmées avec d'autres nanoparticules ainsi que d'autres modèles animaux ; elles démontrent la complexité des acteurs cellulaires impliqués dans l'apparition de la réponse inflammatoire. Comme évoqué précédemment, l'intensité de la réponse inflammatoire dépend de la quantité de particules déposées dans le poumon, et semble très bien corrélée pour les particules faiblement solubles et faiblement toxiques, à la surface de particules déposée.

Dans notre étude, cette réponse inflammatoire a été corrélée à la présence de macrophages chargés de particules observés en histologie dans les poumons et ganglions lymphatiques à court et long terme.

2.1.2. Profil d'expression de gènes et de protéines

2.1.2.1. Inflammation aiguë

L'analyse transcriptomique a mis en évidence une surexpression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation à court terme (J0 et J3). Il s'agit notamment de gènes codant diverses chimiokines : *Cxcl1*, *Cxcl5*, *Ccl2*, *Ccl7*, des composants du système du complément (*C3*, *C4bpa*), des facteurs de coagulation (*F2*) ; ainsi que d'autres protéines clés de la phase aiguë telles que *Calgranulin A (S100a8)* codant une protéine impliquée dans le psoriasis (Rihn et al., 2001), *Serum amyloid A4 (Saa4)*, *Mannose-binding protein (Mbl1)*, *Fibrinogen gamma chain (Fgg)*, *Secreted phosphoprotein 1 (Spp1)*. Ces observations sont conformes à celles réalisées par Halappanavar et Rahman, qui ont analysé la réponse pulmonaire suite à l'inhalation/instillation de NP de TiO₂ chez la souris (Halappanavar et al., 2011, Rahman et al., 2017). D'autres gènes impliqués dans la réponse inflammatoire aiguë tels que *Lcn2* un biomarqueur de l'inflammation ; *Orm1*, codant l'orosomucoïde, une des principales protéines

de la phase aiguë, et *Retnla* impliqué dans l'inflammation pulmonaire médiée par les lymphocytes Th2 ; sont parmi les gènes les plus dérégulés à J0 (Fan et al., 2015, Fournier et al., 2000, Moschen et al., 2017, Zhang et al., 2009). Seul un petit nombre de gènes comprenant *Tac1* impliqué dans la vasodilatation ainsi que les maladies inflammatoires, et *Ccl11* qui code une chimiokine spécifique des polynucléaires éosinophiles, sont dérégulés à court terme (Conroy and Williams, 2001, Page, 2004, Pennefather et al., 2004). *Ccl11* légèrement sous-exprimé 3 jours post-exposition, code une protéine chimiotactique pour les polynucléaires éosinophiles mais pas pour les polynucléaires neutrophiles ni les mononucléaires, monocytes et lymphocytes. Or dans notre étude, l'inflammation se traduit surtout par un afflux considérable de polynucléaires neutrophiles à court terme. De plus, la production de *Ccl11* est stimulée par IL4 et IL13 dont l'expression génique est inchangée au cours du temps dans notre étude.

D'autre part, la sous-expression à court terme de certains gènes impliqués dans l'inflammation et dans le processus d'oxydation-réduction notamment *Tac1*, *Cyp4b1*, *Cyp2f4*, *Nos3*, peut traduire la mise en place d'un mécanisme de régulation moléculaire de cette réponse inflammatoire, immédiatement après la fin de l'exposition des animaux, sans que cela ne possède un retentissement cellulaire. Cette régulation interviendrait pour permettre la résolution de l'inflammation à plus long terme.

L'analyse protéomique du LBA a également montré une surexpression de protéines impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire à court terme, notamment les protéines S100a8, Ctss, Mpo, Cd177, Bpifb1, ainsi que des membres du système du complément : C4a, C4b, Cfb and C4bpa. En addition, une analyse plus spécifique de protéines de l'inflammation (Proteome Profiler®) a confirmé la surexpression de protéines inflammatoires notamment de nombreuses chimiokines telles que Cxcl1, Cxcl3, Cxcl5, à

court terme (J0 et J3). De plus, cette expérience a mis en évidence des dérégulations à court terme, de protéines appartenant au protéasome (Psm3, Psm4, Psm6, Psmb4), impliquées dans le métabolisme du glucose (Pgam1, Pygl, Rpia, Eno2), dans l'assemblage de la chromatine (surexpression de divers histones à J0 et J3) ; dans l'organisation du cytosquelette (vimentine, actine, tubuline et cofiline) et dans le stress oxydant (Lpo, Mpo, Prdx5, Mdh). Différents auteurs s'intéressant aux NP de TiO₂ *in vivo* et *in vitro* ont également souligné la dérégulation de protéines impliquées dans ces différents processus biologiques (Armand et al., 2016a, Cha et al., 2007, Gao et al., 2011b, Ge et al., 2011, Vuong et al., 2016).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'analyse des voies métaboliques KEGG significativement enrichies ($p < 0.05$) suite à l'exposition à un aérosol nanostructuré de TiO₂ et des interactions protéines-protéines. A J0, 7 voies métaboliques enrichies et 5 principaux réseaux d'interactions en lien avec le protéasome, les cascades du complément et de la coagulation, le métabolisme du glutathion, la régulation du cytosquelette d'actine et les jonctions serrées, ont été identifiés. Ces différentes voies métaboliques sont en rapport avec la présence d'une inflammation. En effet, le système ubiquitine/protéasome, qui joue un rôle majeur dans la protéolyse intracellulaire, est impliqué dans la modulation de la réponse inflammatoire (Wang and Maldonado, 2006). D'autre part, l'inflammation et le stress oxydant sont 2 processus physiopathologiques interdépendants et étroitement liés (Figure 39) (Biswas, 2016). Or, le métabolisme du glutathion participe aux systèmes de défense antioxydants mis en place en réponse à un stress oxydant (Khansari et al., 2009). Enfin, le stress oxydant peut perturber la structure de l'actine ainsi que la formation des microtubules (Rogers et al., 1992).

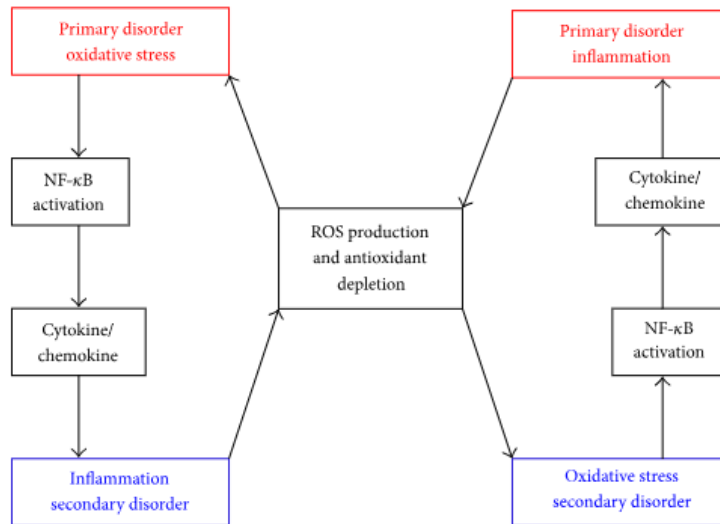


Figure 39: Vue d'ensemble de l'interdépendance entre inflammation et stress oxydant. Lorsque l'inflammation est le 1^{er} processus physiopathologique à se mettre en place, elle peut induire secondairement un stress oxydant, ce dernier amplifiant d'avantage l'inflammation. Inversement, lorsque le stress oxydant apparaît en 1^{er}, l'inflammation se développe secondairement, amplifiant le stress oxydant. D'après (Biswas, 2016).

Il est important de noter que de nombreuses voies métaboliques enrichies et interactions protéines-protéines ont été identifiées à J0, en corrélation avec l'importante réponse inflammatoire pulmonaire, caractérisée par l'afflux de granulocytes neutrophiles.

Malgré la présence de nombreuses cellules inflammatoires dans le LBA 3 jours après la fin de l'exposition, seules 3 voies métaboliques enrichies et 2 principaux réseaux d'interaction en rapport avec l'inflammation : protéasome, cascades du complément et de la coagulation, ont été mis en évidence.

Ces résultats peuvent s'expliquer par la mise en place, quelques jours suivant la fin de l'exposition des animaux, de boucles de rétroaction (rétrocontrôles) négatives sur l'inflammation dont le but est la résolution de ce processus, sans que cela ne se traduise déjà sur les cellules inflammatoires. Ces mécanismes de régulation détectés dans les protéines et dans une moindre mesure dans les transcrits, ne sont pas analysables par les méthodes cytologiques et histopathologiques, mais constituent des marqueurs précoces d'une résolution

de la réponse inflammatoire. Ceci est d'autant plus intéressant que la réponse inflammatoire persistante induit des effets physiopathologiques à long terme tel que le cancer ou la fibrose pulmonaire.

2.1.2.1.1. Rôle central des neutrophiles dans l'inflammation

2.1.2.1.1.1. Neutrophiles et inflammation aiguë

Les neutrophiles sont des cellules impliquées dans l'inflammation, possédant un rôle primordial de phagocytose dirigée vers les cellules étrangères ou infectées. Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires innées qui vont être recrutées et activées au site de l'infection ou de l'inflammation ; en réponse à la libération par les macrophages alvéolaires activés ainsi que les cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires, de cytokines pro-inflammatoires telles que $Il-1\beta$, *Tnf* dont le gène est surexprimé en transcriptomique à court terme et *Il-6*, ainsi que des chimiokines, notamment *Il-8* (*Cxcl8*) and *Ccl2* (*Mcp-1*) dont le gène est surexprimé de manière importante à court terme. Elles sont alors responsable du confinement et de l'élimination des particules étrangères ou infectieuses. Ensuite, elles vont à leur tour libérer diverses chimiokines, recrutant ainsi d'autres cellules immunitaires innées et amplifiant la réponse inflammatoire (Kumar and Sharma, 2010, Williams and Chambers, 2014).

Dans notre étude, *Tnf* et *Ccl2* codant des protéines impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes ; sont surexprimés de manière importante à J0 et J3. La cytokine *Tnfa* est principalement sécrétée par les macrophages, cellules dont le nombre augmente significativement dans le LBA 3 et 28 jours post-exposition.

Ccl2 aussi appelée « Monocyte chemoattractant protein 1 » (*Mcp-1*) est sécrétée par les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales, endothéliales, les lymphocytes T. Cette

protéine est une des chimiokines clés qui régulent la migration et l'infiltration des monocytes et macrophages (Deshmane et al., 2009).

Nous avons également observé que la réponse inflammatoire se caractérisait principalement par un important afflux de granulocytes neutrophiles jusqu'à 3 jours post-exposition. Cet afflux diminuait ensuite mais restait significatif jusqu'à 6 mois post-exposition. Concernant les macrophages, une augmentation significative a été observée uniquement à 3 et 28 jours post-exposition. Ainsi, il semblerait que les neutrophiles jouent un rôle central dans la réponse inflammatoire, suivant la fin de l'exposition des rats à l'aérosol nanostructuré de TiO₂.

De plus, nous avons évoqué la possible formation de NET à court terme en réponse à l'exposition au TiO₂, suite à la présence de diverses histones dans le LBA.

2.1.2.1.1.2. Libération d'histones extracellulaires

L'analyse protéomique du LBA à l'aide de la technique MudPIT, a mis en évidence de manière intéressante, une augmentation du niveau de différents isoformes d'histones à court terme : Histones H1.4, H2A, H2B and H4.

Les histones sont des protéines intracellulaires impliquées dans l'assemblage du nucléosome, l'unité de base d'organisation de la chromatine. Cependant, ces protéines peuvent être libérées dans l'espace extracellulaire par les neutrophiles participant à la formation de « pièges extracellulaires des neutrophiles » ou NET (Daigo et al., 2016, Hirsch, 1958), ou lors de lésions et mort cellulaires médiées par les neutrophiles (Urban et al., 2009, Ward and Grailer, 2014). En effet, les neutrophiles sont recrutés au site de la lésion afin de reconnaître, phagocytter et éliminer les pathogènes via des mécanismes variés, tels que la production d'ERO, la libération de peptides antimicrobiens, ainsi que l'expulsion de leurs contenus nucléaires responsable de la formation de NET (Mayadas et al., 2014). La formation

de NET ou NETose, est considérée comme étant la principale source d'histones extracellulaires (Daigo et al., 2016).

Ces pièges se composent de fibres de chromatine décondensées, recouvertes de protéines antimicrobiennes granulaires, nucléaires et issues du cytoplasme telles que la neutrophile élastase, la myeloperoxydase (Mpo), et le lysozyme qui sont des protéines abondantes dans le cytoplasme des neutrophiles (Figure 40) (Cabon et al., 2013, Porto and Stein, 2016).

Une analyse protéomique réalisée en 2009, a permis d'identifier 24 protéines associées aux NET dans des neutrophiles de sang périphérique humain stimulés par du PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), parmi celles-ci nous pouvons retrouver de nombreuses histones (Urban et al., 2009). Dans notre étude, seulement 7 protéines parmi les 24 identifiées par Urban et al. ; étaient dérégulées dans le LBA des rats exposés: histones H2A, H2B, H4, Mpo, Lyz, S100a8 et Acnt4 (Daigo et al., 2016, Hirsch, 1958, Urban et al., 2009, Ward and Grailer, 2014). Ceci pourrait s'expliquer par la sensibilité de notre méthode et la manière dont les échantillons ont été préparés. En effet, la faible abondance ainsi que la petite taille de certaines protéines recherchées notamment les cytokines et chimiokines, nécessite notamment des techniques d'enrichissement pour permettre leur détection. En 2010, Bartneck et al., ont décrit *in vitro* la formation de pièges extracellulaires issus de cellules immunitaires primaires humaines, neutrophiles principalement, et dans une moindre mesure, monocytes et macrophages, exposées à des NP d'or (Bartneck et al., 2010). Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces pièges pouvaient être un nouveau mécanisme d'élimination des nanoparticules par le système immunitaire humain. Une autre étude a rapporté une perturbation de la NETose et des mécanismes de régulation du stress oxydant suite à l'exposition à des NPs de TiO₂ (Jovanovic et al., 2011), à la fois *in vivo* chez une espèce de

poisson (*Pimpehales promelas*) et *in vitro* en utilisant des cellules rénales de ces poissons adultes. Récemment, Liz et al. ont suggéré que des NP d'argent de 15 nm de diamètre induisaient la libération de NET par des neutrophiles isolés à partir de sang veineux de volontaires sains (Liz et al., 2015).

La formation de NET participe aux fonctions de défense de l'hôte par les granulocytes neutrophiles. Cependant, une libération excessive de NET peut provoquer des lésions tissulaires par la stimulation de réactions immunitaires indésirables ; elle est associée à des maladies pulmonaires variées, notamment la pneumopathie aiguë, l'asthme, la mucoviscidose, la BPCO (Porto and Stein, 2016). Dans notre étude, la présence éventuelle de NET est associée à une forte réponse inflammatoire à court terme ; toutefois, elle ne semble pas induire de modifications histopathologiques majeures. En effet, nous n'avons pas observé de lésions tissulaires majeures, ni de fibrose des voies aériennes. De plus, la disparition de ces marqueurs de NETose à long terme, suggère que ce mécanisme coïncide avec la réponse inflammatoire.

Des expériences complémentaires sont nécessaires pour identifier l'origine des histones extracellulaires retrouvées dans le LBA à court terme, et confirmer la présence de structures NET (Bartneck et al., 2010, Liz et al., 2015, Mayadas et al., 2014, Urban et al., 2009). En effet, les NET sont définis par la co-localisation de la chromatine avec des protéines granulaires, notamment la myéloperoxydase, visualisée par immunomarquage dans un réseau présent à l'extérieur de la cellule (Mayadas et al., 2014, Papayannopoulos et al., 2010). Cependant notre design expérimental et l'absence d'échantillons dédiés à l'étude de la NETose ne nous a pas permis de réaliser de tels essais

Toutefois, ces différentes observations pourraient suggérer une induction de la formation de NET suite à une exposition par voie oro-nasale à un aérosol nanostructuré de TiO_2 ; mécanisme qui n'a jamais été décrit auparavant à notre connaissance. A l'avenir, il semblerait intéressant d'étudier plus précisément la relation entre la formation de NET et la présence de NP, et surtout les conséquences physiopathologiques en cas de persistance de ce phénomène. En tout état de cause, le neutrophile semble se comporter dans l'espace alvéolaire, comme le suggère notre étude, de la même manière envers les nanoparticules qu'envers les bactéries : cela participe de son déterminisme cellulaire.

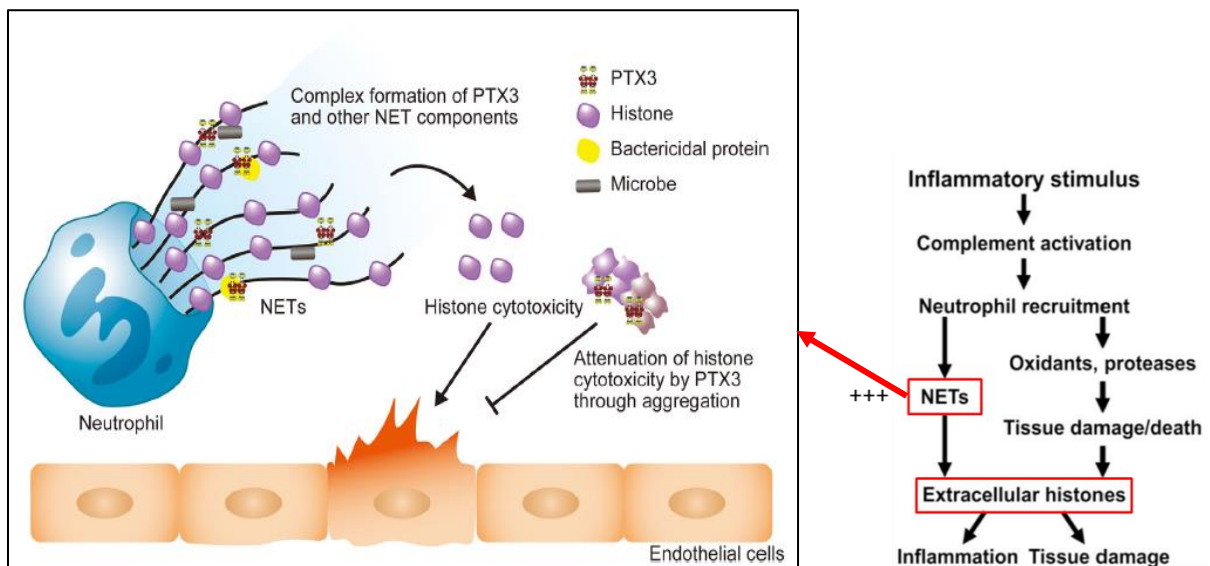


Figure 40: NETose.

Les pièges extracellulaires NET sont constitués de fibres de chromatine décondensées, recouvertes de protéines antimicrobiennes granulaires, nucléaires et issues du cytoplasme de neutrophiles, telles que la neutrophile élastase, la myéloperoxydase (Mpo), le lysozyme, la pentaxine (Ptx3). La formation de NET ou NETose, est considérée comme étant la principale source d'histones extracellulaires. Elle participe aux fonctions de défense de l'hôte par les granulocytes neutrophiles, en réponse à des agents pathogènes. Cependant, une libération excessive de NET peut provoquer des lésions tissulaires, la stimulation de réactions immunitaires indésirables, et est associée avec des maladies pulmonaires variées. Adapté de (Daigo et al., 2016, Grailer and Ward, 2014).

2.1.2.1.2. Rôle des macrophages dans la réponse inflammatoire

Au cours de l'inflammation, les macrophages provenant de la différenciation de monocytes, sont impliqués dans la phagocytose de débris cellulaires et agents pathogènes, mais également dans la présentation de l'antigène au système immunitaire, et dans l'immunomodulation médiée par la production de diverses cytokines et facteurs de croissance. Ainsi, ces cellules immunitaires innées sont essentielles à l'initiation, au maintien ainsi qu'à la résolution de l'inflammation (Fujiwara and Kobayashi, 2005).

En dehors d'un contexte inflammatoire, des macrophages résidents sont présents à divers endroits stratégiques, notamment les poumons, le foie, les tissus nerveux, les os, la rate et les tissus conjonctifs. Ils possèdent ainsi un rôle de sentinelle, prêts à phagocyter et éliminer toutes particules étrangères et agents pathogènes se présentant, et recrutant si besoin d'autres cellules immunitaires tel que les granulocytes neutrophiles et les monocytes circulant qui se différencieront en macrophages tissulaires (Williams and Chambers, 2014). Les macrophages alvéolaires résidents représentent alors la première ligne de défense contre les particules et agents pathogènes en suspension dans l'air.

Dans notre étude, nous avons observé que la réponse inflammatoire était principalement caractérisée par l'afflux considérable de granulocytes neutrophiles jusqu'à 3 jours post-exposition ; puis leur présence diminue progressivement mais reste significative jusqu'à 180 jours post-exposition. Cependant, nous avons également mis en évidence une augmentation significative des macrophages dans le LBA 3 et 28 jours post-exposition, laissant présager leur rôle dans la réponse inflammatoire. L'origine de ces macrophages n'est pas connue. En effet, ils proviendraient soit de la division de macrophages alvéolaires résidents présents initialement, soit du recrutement de monocytes circulants. Ces macrophages

seront ensuite éliminés par apoptose ou migreront vers les ganglions lymphatiques associés aux poumons, ou l'escalator muco-ciliaire.

Bermudez et coll. ont mis en évidence suite à une exposition de rats, souris et hamsters à un aérosol de NP de TiO₂ P25 (21 nm) de 10 mg/m³, la présence d'une inflammation pulmonaire caractérisée par une augmentation du nombre de macrophages et de neutrophiles, et de la concentration en marqueurs solubles dans le LBA (Bermudez et al., 2004). Ils ont également observé que l'afflux initial de neutrophiles était plus importante chez les rats comparé aux souris ; alors que l'augmentation relative des macrophages était moins marquée chez les rats ; ce qui est en corrélation avec nos observations.

Dans les poumons et l'espace alvéolaire, l'inflammation est étroitement liée au phénotype et à la fonction des macrophages (Figure 40). En effet, les macrophages sont capables de modifier leur état d'activation, en réponse à divers stimuli tel que des facteurs de croissance (GM-CSF, CSF-1), des cytokines pro- ou anti-inflammatoires, une infection, des agents pathogènes, les motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP. Initialement, 2 états d'activation ont été décrits pendant l'inflammation pulmonaire: l'activation classique (M1) et alternative (M2) (Aggarwal et al., 2014b, Gordon and Martinez, 2010, Martinez and Gordon, 2014, Mills et al., 2000).

La transition entre l'état M1 et M2 est possible grâce à la plasticité des macrophages, et dépend de signaux environnementaux. Ces 2 états interviennent dans le remodelage tissulaire pulmonaire et la fibrose. La balance entre les 2 états joue un rôle essentiel tout au long de l'inflammation.

En réponse à des agents pathogènes ou substances étrangères, une réponse inflammatoire peut se mettre en place, se traduisant notamment par une activation des

macrophages résidents vers l'état M1. Ils vont alors sécréter des cytokines pro-inflammatoires notamment IL-1 β , TNF- α , IL-12, stimulant la sécrétion de chimiokines par les macrophages voisins et autres cellules. Afin de potentialiser la réponse immunitaire innée, les macrophages vont également sécréter CXCL2 (MIP-2) entraînant le recrutement de neutrophiles dans l'espace alvéolaire, ainsi que CCL2 (MCP-1) responsable du recrutement de monocytes et macrophages. Différents marqueurs d'activation ont été identifiés à la surface des macrophages M1, notamment CCL20, CXCL10, CXCL11 (Aggarwal et al., 2014b, Herold et al., 2011, Murray et al., 2014, Murray and Wynn, 2011).

Quand le stimulus inflammatoire ou le pathogène sont éliminés, l'activation des macrophages M1 diminue, et les macrophages vont se reprogrammer vers l'état d'activation M2, caractérisé notamment par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-1ra en réponse à des signaux provenant des cytokines IL-4 et IL-13. Les macrophages M2 favorisent la résolution de l'inflammation et la réparation épithéliale par différents mécanismes. Ils provoquent l'arrêt du recrutement des cellules inflammatoires *via* la sécrétion de IL-1ra, de MMP ; sont responsables de l'apoptose des granulocytes neutrophiles et macrophages *via* la sécrétion de IL-1ra, TRAIL, IL-10 et TGF- α . Ils vont également interagir avec les lymphocytes T régulateurs (Treg) ; vont favoriser la réparation épithéliale en sécrétant des lipoxines, résolvines et facteurs de croissance (Figure 41).

Différents marqueurs d'activation ont également été identifiés à la surface des macrophages M2 notamment RETNLA, CHIA, CHI3L1, CCL12, CCL17, CCL22, KLF4 (Aggarwal et al., 2014b, Herold et al., 2011, Murray et al., 2014, Murray and Wynn, 2011).

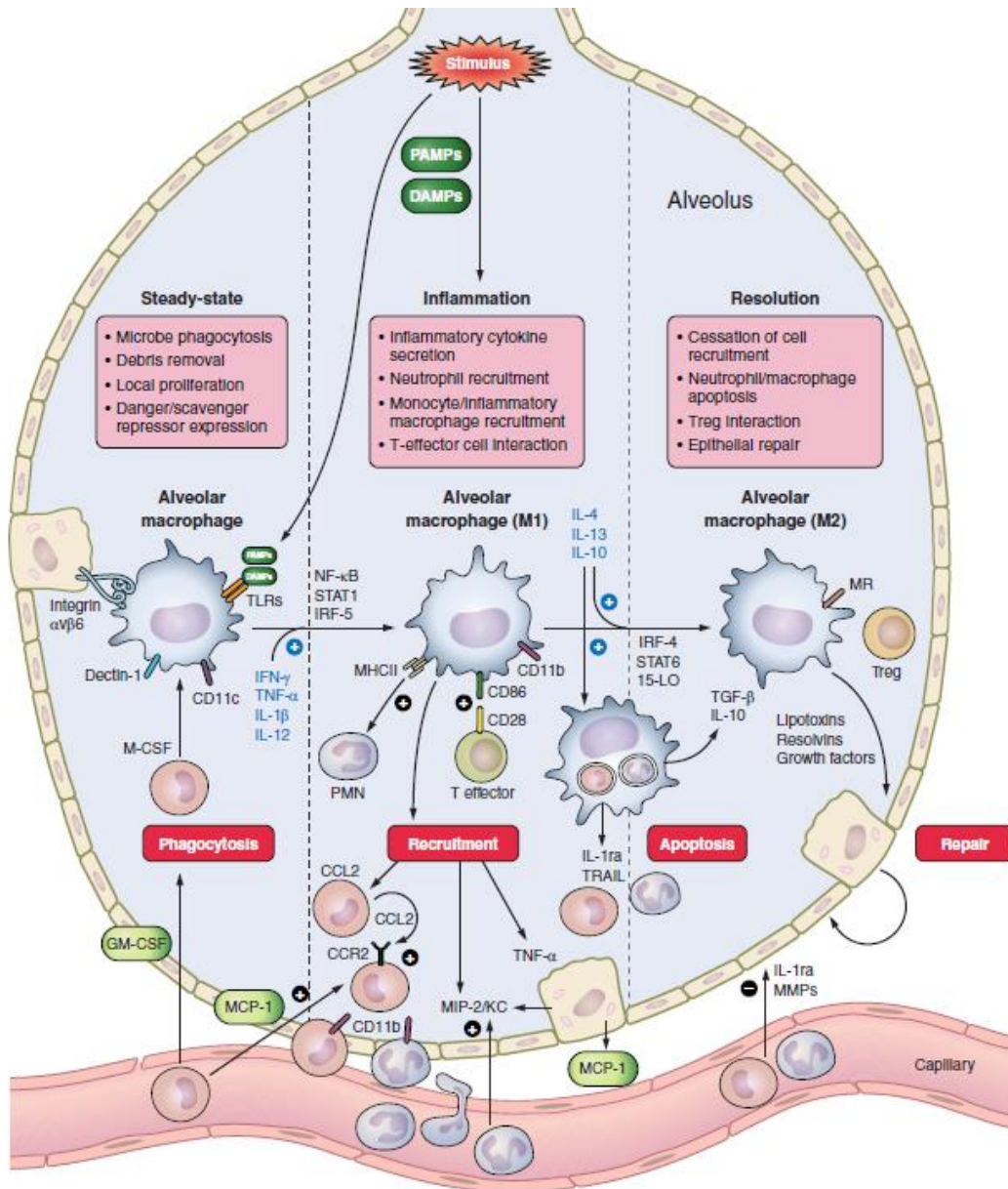


Figure 41: Représentation schématique des différents états d'activation et fonctions des macrophages pendant la quiescence, l'inflammation et la résolution de l'inflammation.

Pendant la quiescence (état d'équilibre), les macrophages sont attachés aux cellules épithéliales (expression en surface des récepteurs TLR et Dectin-1). Le renouvellement est lent, et résulte principalement de la prolifération locale induite par les facteurs M-CSF/GM-CSF, avec un recrutement minimal des monocytes circulants. Lors d'une stimulation par des agents pathogènes ou substances étrangères (signaux de danger pathogéniques (PAMP) ou non (DAMP)), les macrophages résidents sont activés vers l'état M1 (expression des facteurs de transcription NF- κ B, STAT1, IRF-5, et des cytokines précoces IFN- α , TNF- α , IL-1 β , IL-12), et vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires notamment CXCL2 (MIP-2) entraînant le recrutement de neutrophiles dans l'espace alvéolaire ; ainsi que CCL2 (MCP-1) responsable du recrutement de monocytes/macrophages. Quand le stimulus étranger et/ou pathogène est éliminé, les macrophages vont se reprogrammer vers l'état d'activation M2 (expression des facteurs de transcription STAT6, STAT3, IRF-4, 15-LO, et des cytokines IL-4, IL-13, IL-10), et coordonner une série de réponses régulées permettant une résolution de l'inflammation et une réparation de l'épithélium : arrêt du recrutement de cellules inflammatoires (par la sécrétion de IL-1ra, MMPs), apoptose des granulocytes neutrophiles, des macrophages (IL-1ra, TRAIL, IL-10, TGF- α), interaction avec les lymphocytes T régulateurs (Treg), sécrétions de lipoxines, résolvines et facteurs de croissance pour favoriser la réparation épithéliale. D'après (Aggarwal et al., 2014b).

Dans notre étude, nous avons observé suite à l'exposition des rats à l'aérosol de NP de TiO₂, une dérégulation de différents marqueurs d'activation ainsi que de cytokines et chimiokines sécrétées appartenant aux phénotypes M1 et M2. En effet, concernant l'état M1, une augmentation de l'expression de *Tnf*, *Cxcl2*, *Ccl2*, des marqueurs de surface *Ccl20*, *Cxcl10*, *Cxcl11* a été observé à court terme dans les poumons (Tableau XI). Concernant l'état M2, une surexpression de *Chia*, *Vegf* et *Il-1ra* dans le LBA, ainsi que des marqueurs *Chia*, *Chi311*, *Klf4*, *Retnla*, *Ccl12*, *Ccl17* et *Ccl22* dans les poumons a été observée aux temps courts (Tableau XI). Ainsi, il semblerait ainsi qu'à court terme, les macrophages se partagent entre les états de transition M1 et M2 simultanément, grâce à leur grande plasticité et en fonction des signaux environnementaux.

Ces résultats semblent suggérer que dès la fin de l'exposition à l'aérosol, une résolution de l'inflammation (phénotype M2) tend à se mettre en place, bien que l'inflammation soit toujours présente (phénotype M1), comme observé au niveau de la cytologie du LBA. Cependant, des auteurs ont montré plus récemment la nécessité de réévaluer ce concept, décrivant notamment l'existence de sous-groupes parmi ces 2 principaux états d'activation (M2a, M2b, M2c), de macrophages régulateurs, de macrophages associés aux tumeurs, et insistant sur la difficulté de séparer clairement les différents états d'activation (Aggarwal et al., 2014b, Martinez and Gordon, 2014, Murray et al., 2014, Murray and Wynn, 2011, Zhang et al., 2015b). De plus, ils ont précisé qu'il était délicat de s'appuyer uniquement sur la présence d'un ou plusieurs marqueurs pour définir la présence de macrophages M1 ou M2.

Tableau XI : Marqueurs d'activation des macrophages (phénotypes M1, M2) dérégulés dans les poumons ou le LBA de rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ à court et long terme (Aggarwal et al., 2014a, Murray et al., 2014, Murray and Wynn, 2011). NA : non applicable.

Phénotype	Gènes (poumons)	Niveau d'expression				
	Protéines (LBA)	J0	J3	J28	J90	J180
M1	<i>Ccl2</i>	↗	↗	---	↘	---
	<i>Ccl20</i>	↗	---	---	---	---
	<i>Cxcl2</i>	↗	↗	↗	↘	---
	<i>Cxcl10</i>	↗	↗	---	---	---
	<i>Cxcl11</i>	↗	↗	---	---	---
	<i>Tnf</i>	↗	↗	---	↘	---
M2	<i>Chia</i>	↗	↗	↗	↗	↗
	<i>Chi3l1</i>	↗	↗	↗	↗	---
	<i>Ccl12</i>	↗	↗	---	↘	↗
	<i>Ccl17</i>	↗	↗	---	---	---
	<i>Ccl22</i>	↗	↗	---	---	---
	<i>Retnla</i>	↗	↗	↗	↗	↗
	<i>Klf4</i>	↘	---	---	---	---
	<i>Chia</i>	---	↗	NA	NA	---
	<i>Il1r1 (Il1ra)</i>	↗	---	NA	NA	---
	<i>Vegf</i>	↗	↗	NA	NA	↘

L'activation des macrophages est impliquée dans de nombreuses maladies, notamment les maladies auto-immunes, certains cancers, l'hyperréactivité des voies aériennes, les infections virales, bactériennes, parasitaires et fongiques. Dans ce contexte, des auteurs se sont intéressés à l'impact des NP sur l'état d'activation des macrophages et sur leurs fonctions immunologiques et plus précisément les NP de TiO₂ (Chen et al., 2018a, Huang et al., 2017).

2.1.2.2. Système cardio-vasculaire

L'inflammation et la coagulation sont des systèmes de défense complémentaires puisque l'inflammation active la coagulation, qui elle-même régule l'activité inflammatoire (O'Brien, 2012, Petaja, 2011). La cascade de la coagulation est composée de deux voies initiales conduisant à la formation de fibrine : la voie intrinsèque ou phase de contact et la voie extrinsèque, dépendante du facteur tissulaire (Wu, 2015). La voie intrinsèque est impliquée dans la coagulation et l'inflammation, en faisant intervenir le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), la prékallikréine et le facteur XII. La voie intrinsèque et le système kinine-kallikréine sont étroitement liés. En effet, la kallikréine résultant de l'activation de la prékallikréine par le facteur XIIa va cliver le KHPM produisant ainsi la bradykinine, un puissant vasodilatateur possédant une activité antibactérienne, qui augmente la perméabilité capillaire et favorise le développement d'œdème (Schmaier, 2016). Or, des modifications vasculaires tel qu'une augmentation du débit sanguin local et de la perméabilité vasculaire, entraînant un œdème localisé, ont été observées durant la phase inflammatoire aiguë. Ce phénomène pourrait expliquer en partie l'augmentation du poids du poumon observée à court terme chez les rats exposés.

Dans notre étude, le gène *King1* qui code le kininogène de bas (KBPM) et haut poids moléculaire (KHPM), était fortement surexprimé jusqu'à 180 jours post-exposition dans le poumon, montrant sa capacité à être un marqueur d'effet.

De plus, *Nos3* et *Npr3*, codant des protéines possédant des effets biologiques sur le système cardio-vasculaire, sont sous-exprimés immédiatement après la fin de l'exposition (*Nos3*) et jusqu'à 180 jours post-exposition (*Npr3*). *Nos3* code une enzyme endothéliale synthétisant le NO, une molécule modulant la perméabilité vasculaire et les mécanismes inflammatoires (Shaul, 2002, Vanhoutte, 2003). Or, une étude a montré une diminution importante de la production de NO endogène suite à l'exposition de rats à des NP de TiO₂ de TiO₂ (1,5 à 16 mg/m³) pendant 4 à 12 h (Nurkiewicz et al., 2011). Des effets similaires ont été observés dans des microvaisseaux systémiques suite à l'exposition à des NP de TiO₂ P25 de 21 nm, à raison de 1,5 à 16 mg/m³ (Nurkiewicz et al., 2009). D'autre part, *Npr3* code une protéine dont la fonction majeure est l'élimination des peptides natriurétiques de la circulation ou du milieu extracellulaire, peptides impliqués dans le contrôle du volume et de la pression sanguine (Potter et al., 2005). Dans notre étude, nous avons observé une augmentation du poids du poumon chez les rats exposés à court terme, pouvant s'expliquer par la présence d'un œdème pulmonaire. Lors d'un œdème pulmonaire, l'organisme doit maintenir la pression artérielle. Ainsi, les modifications de l'expression de *King1*, *Nos3* et *Npr3* pourraient aider à contrôler la pression artérielle.

Enfin, *Vegf*, une glycoprotéine exprimée dans les pneumocytes de type II qui favorise la perméabilité vasculaire et régule l'angiogenèse, est surexprimée dans le LBA à J0 et J3 (Hambly et al., 2015).

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre l'inhalation de NP de TiO₂ et des effets cardiovasculaires (Nurkiewicz et al., 2008, Nurkiewicz et al., 2011, Shi et al., 2013). De

manière plus générale, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont souligné la survenue d'effets indésirables cardiovasculaires suite à l'exposition à des NP de TiO₂, d'Ag, de ZnO, de Si, ainsi qu'aux nanotubes de carbone. Des effets variés ont été décrits, notamment des dysfonctionnements cardiaques, vasculaires, de l'athérosclérose, une angiogénèse anormale, une activation plaquettaire, une coagulation sanguine ainsi que la survenue de thrombose. Le stress oxydant, la réponse inflammatoire, l'activation de voies de signalisation intracellulaires, la régulation neurale et l'activation de canaux ioniques, contribuent à la toxicité cardiovasculaire induite par l'exposition aux NP (Yu et al., 2016). De plus, les propriétés physicochimiques, telles que la composition, la taille, la structure cristalline et la charge de surface, influencent cette toxicité cardiovasculaire (Cao et al., 2018).

Ainsi, nos résultats sont en accord avec les données de la littérature et tendent à montrer que même en l'absence d'effets pulmonaires majeurs hormis la présence éventuelle d'un œdème aux temps courts, l'exposition à des NP peut conduire à des effets cardiovasculaires dont nous pouvons difficilement prédire les répercussions. Cependant, en raison des connaissances actuelles sur les conséquences cardiovasculaires associées à l'exposition à des particules ultrafines issues de la pollution environnementale, notamment une augmentation de l'incidence de l'athérosclérose et de l'asthme (Li et al., 2016), nous pourrions anticiper des effets similaires en cas d'une exposition à long-terme à un aérosol nanostructuré de TiO₂.

2.1.2.3. Stress oxydant

Au cours de la réponse inflammatoire, le recrutement et l'activation de neutrophiles peuvent être responsables d'un stress oxydant. Dans notre étude, nous avons observé des modifications de l'expression de transcrits et protéines impliqués dans ce processus, suite à

l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂. Ainsi, *NoxO1*, *NoxA1* and *Duox1* impliqués dans la production d'ERO, ainsi que *Sod2* et *Sulfiredoxin 1(Srxn1)* impliqués dans les défenses anti-oxidantes, étaient surexprimés à court terme (Ramesh et al., 2014, Xu et al., 2017). D'autre part, l'analyse par spectrométrie de masse du LBA a mis en évidence une augmentation de l'expression de plusieurs protéines pro-oxydantes : *Hspa1a* et *Hspa1b* (J0), *Lpo*, *Mpo* et *Prdx5* (J0 & J3) à court terme.

Les modifications observées simultanément sur des transcrits et protéines impliqués dans un système piègeur de radicaux libres, suggèrent que les mécanismes de défense contre le stress oxydant se sont mis en place à court terme. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les NP de TiO₂ déposées dans les poumons, sont responsables de la production d'ERO, pouvant conduire au développement de lésions de l'ADN, ainsi que de maladies pulmonaires susceptibles de favoriser l'apparition de fibrose, de BPCO et cancer (Shi et al., 2013, Song et al., 2016).

2.1.2.4. Lésions de l'ADN

L'expression de quelques gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, a été modifiée suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ : *Kif22*, *Pttg1*, *Sod2*, *Bard1*, *Top2a* et *Rad51*, surexprimés à J0, ont ensuite retrouvé un niveau d'expression similaire aux témoins ; tandis qu'*Hspa1b* était sous-exprimé à J0.

Des études *in vitro* (Armand et al., 2016b, Wang et al., 2007b) et *in vivo* (Chen et al., 2014b, Li et al., 2017, Trouiller et al., 2009) ont montré que des NP de TiO₂ entraînaient des effets génotoxiques pulmonaires et hépatiques chez la souris (cassures et adduits de l'ADN). Ces effets étaient associés à des dérégulations de gènes impliqués dans la réponse aux lésions

de l'ADN et la réparation (*Rad51*). Toutefois, la génotoxicité des NP de TiO₂ demeure controversée (Chen et al., 2014a, Shi et al., 2013).

2.1.2.5. Gènes et protéines associés à la fibrose et au remodelage tissulaire

Le stress oxydant et la persistance de l'inflammation peuvent conduire à l'apparition d'une fibrose. Dans notre étude, nous avons recherché la présence de gènes associés à la fibrose, en nous basant sur des études de Snyder-Talkington qui a défini une liste de 69 gènes en lien avec la fibrose, ainsi que de Poulsen, Hamai et Rahman, qui ont utilisé des nanotubes de carbone multi-parois connus pour induire une fibrose pulmonaire (Hamai et al., 2016, Poulsen et al., 2015b, Rahman et al., 2017, Snyder-Talkington et al., 2013). Nous avons identifiés seulement quelques gènes en commun, principalement dérégulés à court terme, notamment *Adora3*, *C3*, *Ccl2*, *Ccl17*, *Col4a4*, *Col9a2*, *Mmp7*, *Mmp12*, *Mmp14*, *Selp*, *Spp1*, *Timp3* and *Tnf*.

De plus, les protéines *Mmp7* et *Spp1*, codées par des gènes surexprimés de manière importante dans le poumon de rats exposés, jusqu'à 180 jours post-exposition, ont également été identifiés comme biomarqueurs candidats dans la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), une forme chronique et progressive de pneumopathie interstitielle d'origine inconnue (Figure 42) (Hambly et al., 2015, Pardo et al., 2016). *Mmp7*, le plus petit membre de la superfamille des métalloprotéases matricielles (MMPs) ; est impliqué dans la dégradation de nombreux composants de la matrice extracellulaire, et joue un rôle clé dans la fibrose. L'ostéopontine (*Spp1*) est une cytokine inflammatoire impliquée dans la réparation tissulaire. Elle serait essentielle dans le recrutement des fibroblastes et le dépôt de la matrice extracellulaire. De plus, *Spp1* augmente l'expression de *Mmp7* et co-localise avec *Mmp7* dans les pneumocytes

de type 2 chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (Hambly et al., 2015, Pardo et al., 2016).

Un autre biomarqueur candidat de la FPI est la protéine Vegf. Cette protéine était surexprimée dans le LBA à J0 et J3 ; puis sous-exprimée à J180. Vegf est impliquée dans l'angiogenèse comme mentionné précédemment. Or l'angiogenèse peut contribuer au développement de cette pathologie (Hambly et al., 2015).

D'autre part, Sftpa et Sftpb surexprimées dans la FPI, sont également des biomarqueurs potentiels. Or dans notre étude, une sous-expression a été observée à J0 dans le LBA. Une hypothèse serait que l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ induit une altération de la composition du surfactant pulmonaire à J0 uniquement, mais ne semble pas entraîner de conséquences physiopathologiques à plus long terme, comme le développement d'une FPI.

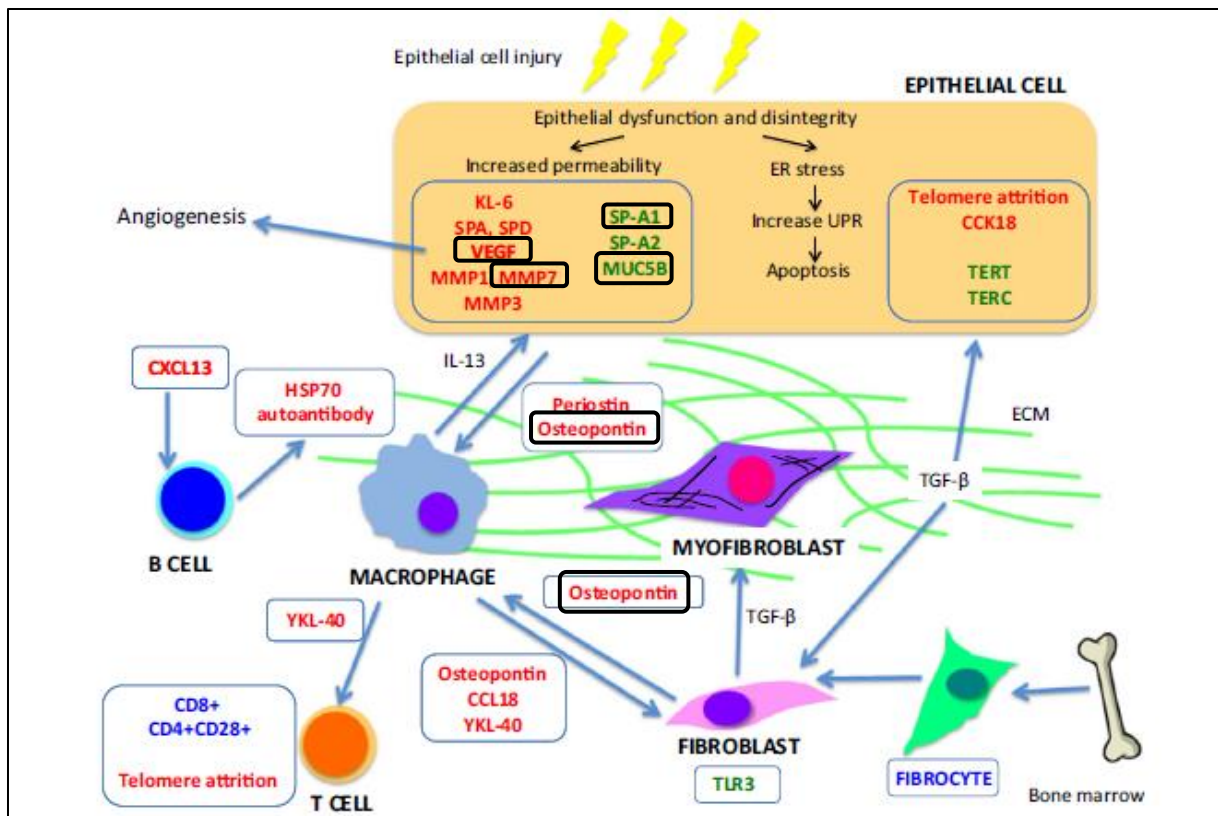


Figure 42: Biomarqueurs potentiels de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).

La fibrose progressive observée dans la FPI dépend d'une multitude de voies de signalisation complexes activant des cellules effectrices nombreuses et variées. Cette complexité rend difficile l'identification de biomarqueurs fiables ainsi que le développement de traitements efficaces. ECM : matrice extracellulaire (MEC), ER : réticulum endoplasmique, UPR : *unfolded protein response* ou accumulation de protéines mal repliées. Les protéines encadrées en noir sont également dérégulées dans notre étude. D'après (Hambly et al., 2015).

Enfin, nous avons observé dans le poumon une surexpression à court terme de *Chia* et *Chi311* codant des protéines de la famille des chitinase et chitinase like-protein ; ainsi qu'une surexpression de *Chia* à J3 dans le LBA. Classiquement, ces protéines sont exprimées de façon ubiquitaire dans les voies aériennes et le tractus intestinal, où elles protègent l'hôte contre des agents pathogènes constitués de chitine exogène. Plus récemment, des études ont suggéré un rôle des protéines chitinases et chitinase-like proteins dans le développement et la progression d'une inflammation allergique, ainsi que dans le remodelage tissulaire (Lee, 2009).

L'ensemble de ces données peut être corrélé à la forte réponse inflammatoire induite par l'aérosol nanostructuré de TiO₂ à court terme. Cependant, le nombre limité de gènes dérégulés associés à la fibrose, leur niveau d'expression ainsi que les données d'histopathologie pulmonaire à court terme, ne semblent pas suggérer la mise en place d'un processus de fibrose ou de FPI.

2.1.2.6. Métabolisme glucidique

Les données de protéomique semblent suggérer une perturbation du métabolisme glucidique à court terme suite à l'exposition aux NP de TiO₂. En effet, une surexpression des protéines Gpi, Mdh2, Pgam et Pkm, et une sous-expression de la protéine Eno2 ont été observée à J0 dans le LBA ; ainsi qu'une surexpression des protéines Pygl, Rpia et Ugp2 à J3. Des études *in vivo* par voie orale et *in vitro* ont mis en évidence une perturbation du métabolisme du glucose suite à une exposition à des NP de TiO₂ (Armand et al., 2016a, Chen et al., 2018b, Ge et al., 2011). Dans notre étude, le nombre de protéines dérégulées impliquées dans ce métabolisme est limité et cette perturbation est observée uniquement à court terme.

2.2. Réponse à long terme

2.2.1. Approche conventionnelle

L'activation de mécanismes de défense immédiatement après la fin de l'exposition à un nanomatériau est un processus physiologique. Cependant, les conséquences à long terme de ce type d'exposition soulèvent des préoccupations. Comme décrit ci-dessus, une importante réponse inflammatoire à l'origine de nombreuses modifications au niveau transcriptomique et protéomique, a été observé à court terme. Cette inflammation a ensuite diminué au cours du temps. De plus, nous avons observé un regroupement de macrophages chargés de particules, une épithélialisation alvéolaire autour des agrégats de macrophages, et

la présence de particules intracellulaires dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons. Cependant ces modifications ne sont pas significatives car nous n'avons observé aucun effet toxique notable telle que la présence de nécrose ou apoptose des cellules épithéliales pulmonaires ni de fibrose pulmonaires, et ceci contrairement à des études d'inhalation subchronique et chronique qui ont souligné des changements épithéliaux et fibroprolifératifs progressifs, ainsi qu'une augmentation du taux de tumeurs pulmonaires (Bermudez et al., 2004, Heinrich et al., 1995). Ces résultats s'expliqueraient par le fait que la dose déposée dans notre étude était beaucoup plus faible. Lee et al. ont également noté la présence d'une fibrose et la formation de tumeurs au niveau pulmonaire chez des rats exposés à de très fortes doses de TiO₂ (50 et 250 mg/m³) mais pas à la dose de 10 mg/m³ (Lee et al., 1985).

L'objectif de notre étude n'était pas de montrer qu'une très forte dose de nanoparticules déposées dans le poumon induisait des effets toxicologiques majeurs. Nous souhaitons montrer qu'une dose plus faible bien qu'induisant une forte réponse inflammatoire à court terme, n'entraînait pas d'effets toxiques visibles par des méthodes conventionnelles à long terme ; mais pouvait induire au niveau moléculaire, des altérations des voies de transduction du signal ou des processus biologiques, visibles à l'aide d'outils de transcriptomique et de protéomique.

2.2.2. Profil d'expression de gènes et de protéines

Malgré l'absence de modifications histopathologiques significatives à long-terme, plusieurs gènes et protéines étaient encore dérégulés jusqu'à 180 jours post-exposition à savoir 102 sondes correspondant à 92 transcrits et 45 protéines (Uniprot KB identifiants).

2.2.2.1. Inflammation

La surexpression de gènes impliqués dans l'inflammation était considérable à court-terme, mais a eu tendance à diminuer à long-terme, tout en restant significative. Ces résultats sont en corrélation avec ceux observés dans l'analyse cytologique du LBA, ainsi qu'avec la diminution de la charge pulmonaire de Ti décrite précédemment (Gate et al., 2017).

L'analyse du LBA par spectrométrie de masse a mis en évidence une sous-expression de la majorité des protéines dérégulées à J180 chez les rats exposés, excepté pour les protéines Trem2, *Cd177 antigen-like* et une protéine non caractérisée (Uniprot KB identifier F1M0U4) impliquée dans l'inflammation. De plus, une sous-expression légère mais statistiquement significative de Vegf et 3 chimiokines inflammatoires (Cxcl3, C3xcl1, Cxcl5) a été observé dans le LBA suite à l'expérience de Proteome profiler[®]. Vegf est sécrétée par les macrophages alvéolaires pour initier la réparation des barrières endothéliales suite à une inflammation pulmonaire. Elle favorise également la perméabilité vasculaire et régule l'angiogénèse comme mentionné ci-dessus.

Cxcl3 et Cxcl5 sont impliqués dans le recrutement des neutrophiles vers les espaces alvéolaires et leur activation (Aggarwal et al., 2014b, Herold et al., 2011). La sous-expression de ces chimiokines chez les rats exposés est en corrélation avec la diminution du nombre de neutrophiles dans le LBA à long terme, traduisant une résolution progressive de l'inflammation.

De plus, la sous-expression de la plupart des protéines observée à long terme pourrait être associée à une résolution progressive de l'inflammation et une récupération de la fonction pulmonaire physiologique, corrélé avec la diminution du nombre de neutrophiles recrutés et de la charge de Ti. Les signatures génique et protéique tendent en effet à montrer la résolution

de la réponse inflammatoire, plutôt que l'installation d'une réponse inflammatoire chronique. Ces signatures pourraient être la résultante de la présence de miARN régulant l'expression des acteurs de l'inflammation, et dont l'expression peut être modifiée sur le long terme suite à l'inhalation de NP de TiO₂ (Halappanavar et al., 2011).

2.2.2.2. Stress oxydant

Au cours de la réponse inflammatoire, une production excessive d'ERO peut être à l'origine du développement de stress oxydant. Dans les poumons, les gènes *Scd1* et *Scd4* impliqués dans la peroxydation lipidique, étaient sous-exprimés chez les rats exposés à long terme, tandis que *Lpo* était surexprimé. Dans le LBA, la sous-expression de quelques protéines impliquées dans le stress oxydant (*Hspa1a*, *Hspa1b* and *Sod1*) a été observée à J180 chez les rats exposés. Ces résultats suggèrent une résolution progressive du stress oxydant à long terme.

2.2.2.3. Gènes et protéines associés à la fibrose et au remodelage tissulaire

Les analyses histopathologiques n'ont pas mis en évidence de fibrose pulmonaire. Toutefois, 5 gènes associés à la fibrose étaient toujours dérégulés à long-terme (*Areg*, *Ccl2*, *Tnf*, *Spp1* and *Mmp7*). *Mmp7* et *Spp1* étaient surexprimés jusqu'à 180 jours post-exposition. D'autre part, nous avons observé une surexpression des gènes *Chi3* et *Chi3l1* codant des protéines impliquées dans le remodelage tissulaire, à court et long terme dans le poumon (Lee, 2009).

Ces résultats suggèrent que la surexpression de ces gènes n'est pas suffisante pour entraîner une fibrose, et que ces gènes à eux seuls ne peuvent servir de marqueur pour cette

pathologie. En effet, l'implication d'un plus grand nombre de gènes ou avec un niveau d'expression plus élevé, nous paraît nécessaire pour conduire à l'apparition d'une telle maladie. La dérégulation de tels gènes jusqu'à 180 jours post-exposition, reste tout de même une source d'interrogation sur la signification physiopathologique d'un effet résiduel ou mémoire sur l'expression des gènes.

2.2.2.4. Métabolisme lipidique

Les données de transcriptomique suggèrent que le métabolisme lipidique semble affecté, 28 à 180 jours suivant l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂. En effet, la voie métabolique de biosynthèse des acides gras insaturés (*KEGG pathway*) comprenant 3 gènes dérégulés *Scd1*, *Scd4* et *Acot1*, est significativement enrichie de J28 à J180. Parmi ces 3 gènes, une sous-expression de *Scd1* et *Scd4*, codant une stéaryl-CoA désaturase, a été observé de J28 à J180, tandis que le gène *Acot1* qui code une acyl-CoA thioestérase était surexprimé de J28 à J180.

Précédemment, Husain et al. ont montré chez la souris une perturbation du métabolisme lipidique suite à l'instillation intratrachéale de faibles doses de NP de TiO₂ à savoir 18, 54, and 162 µg/souris (Husain et al., 2013). Dans notre étude, seuls 3 gènes sont dérégulés à long terme suggérant une perturbation mineure.

2.3. Etats d'activation des macrophages

Comme détaillé précédemment, 2 principaux états d'activation ont été décrit lors de l'inflammation, l'état M1 et M2. Dans notre étude, nous avons observé à long terme la surexpression des marqueurs *Chia*, *Chi3l1*, *Ccl12* et *Retnla* dans les poumons. Ces marqueurs sont associés à l'état d'activation M2 soit la résolution de l'inflammation (Tableau XI). Une

sous-expression à J180, de certains marqueurs M1 comme *Ccl2*, *Cxc12*, *Tnf* à J90, ainsi que de la protéine Vegf, un marqueur M2, a été observée dans les poumons et dans le LBA de rats exposés. *Ccl12* sous-exprimé dans les poumons à J90 était ensuite surexprimé à J180.

Bien qu'il soit difficile de s'appuyer sur la présence de quelques marqueurs pour définir l'état d'activation des macrophages comme détaillé précédemment, leur expression semble en accord avec la chute de la réponse inflammatoire observée aux temps longs.

2.4. Comparaison des données de transcriptomique et protéomique

Notre étude *in vivo* apporte un nouvel éclairage sur les effets pulmonaires à long terme, jusqu'à 6 mois post-exposition, de l'inhalation d'un aérosol nanostructuré de TiO₂ à l'aide d'une combinaison d'analyses transcriptomique et protéomique dans une approche multi-omique associée à des tests de toxicologie conventionnelle. A notre connaissance, il s'agit de la première étude explorant à la fois le niveau d'expression global de gènes et de protéines à l'aide d'analyses transcriptomique et protéomique respectivement, jusqu'à 180 jours suivant la fin d'une inhalation subaiguë chez le rat.

De manière intéressante, nous avons observé des transcrits et protéines communs dérégulés à court et long-terme dans les poumons et le LBA respectivement (Tableau XII). Ces gènes et protéines sont impliqués dans la réponse inflammatoire et immune, les cascades du complément et de la coagulation, ainsi que dans le stress oxydant ; notamment des chimiokines (*Cxcl1*, *C3xcl1*, *Cxcl5*), et autres protéines tel que *Cd177*, *C4bpa*, *Lpo*, *Chia* et *Tuba8*. Ces données montrent une bonne corrélation entre l'analyse transcriptomique pulmonaire et protéomique, suggérant que les modifications de l'expression de certains gènes dans le poumon ont conduit à la sécrétion de protéines dans le LBA.

Des études comme la nôtre pourraient permettre d'identifier des biomarqueurs d'exposition aux nanomatériaux. En effet, nous avons observé des changements dans des processus biologiques tels que l'inflammation et le système cardiovasculaire. Ces 2 processus sont liés notamment *via* le gène *Kng1* surexprimé de manière importante dans les poumons de rats jusqu'à 180 jours post-exposition. Ce gène code la protéine Kng1 dont l'expression est également modulée dans le LBA de rats exposés à J180. Ainsi, Kng1 pourrait être un bon biomarqueur candidat, afin de surveiller la toxicité pulmonaire induite par les nanomatériaux, bien que cette hypothèse doive être étudiée plus en détail.

Tableau XII : Gènes et protéines communs différentiellement exprimés dans les poumons et le LBA de rats exposés respectivement, immédiatement, 3 et 180 jours post-exposition.

Nom des protéines	Nom des gènes	Fonction biologique	Jours post-exposition
BPI Fold Containing Family B Member 1	<i>Bpifb1</i>	innate immune response (in mucosa)	0 & 3
Complement Component 4 Binding Protein, Alpha	<i>C4bpa</i>	complement activation, innate immune response	0 & 3
Protein Cd177	<i>Cd177</i>	blood coagulation, leukocyte migration	0 & 3
Chitinase, Acidic	<i>Chia</i>	production of molecular mediator involved in inflammatory response	3
Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1B	<i>Hspa1b</i>	regulation of protein ubiquitination, cellular response to heat, protein stabilization	180
Lactoperoxidase	<i>Lpo</i>	response to oxidative stress	0 & 3
Protein S100-A8 (Calgranulin-A)	<i>S100a8</i>	cytokine production	0 & 3
Tubulin Alpha 8	<i>Tuba8</i>	microtubule-based process	0
C-X-C Motif Chemokine Ligand 1	<i>Cxcl1</i>	chemotaxis, defense response, inflammatory response	0 & 3
C-X-C Motif Chemokine Ligand 2	<i>Cxcl2</i>	chemotaxis, defense response, inflammatory response	0 & 3
C-X-C Motif Chemokine Ligand 3	<i>Cxcl3</i>	chemotaxis, defense response, inflammatory response	0 & 3
C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1	<i>Cx3cl1</i>	leukocyte migration involved in inflammatory response, chemotaxis, defense response	0
C-X-C Motif Chemokine Ligand 5	<i>Cxcl5</i>	neutrophil mediated immunity, chemotaxis, defense response	0 & 3

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives

CONCLUSION

Cette étude *in vivo* apporte un nouvel éclairage sur les effets pulmonaires à long terme, jusqu'à 6 mois post-exposition, résultant de l'inhalation d'un aérosol nanostructuré de TiO₂ grâce à la combinaison d'analyses toxicologiques conventionnelles et moléculaires.

L'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ a entraîné une forte réponse inflammatoire pulmonaire aiguë. Cette réponse était caractérisée par une augmentation dans le LBA du nombre de cellules totales, du contenu en protéines totales, et de l'activité LDH, ainsi que par la présence de macrophages chargés de particules dans la lumière alvéolaire et les ganglions lymphatiques à court terme. Il semblerait dans le cas présent que les granulocytes neutrophiles jouent un rôle central dans la réponse inflammatoire. En effet, un important afflux de granulocytes neutrophiles a été observé jusqu'à 3 jours post-exposition. Cet afflux diminuait ensuite mais restait significatif jusqu'à 6 mois post-exposition. Dans une moindre mesure, les macrophages intervenaient également dans la réponse inflammatoire, avec une augmentation significative de leur nombre ; 3 et 28 jours post-exposition. Ces macrophages sembleraient se partager entre les états de transition M1 et M2 ; suggérant ainsi une possible mise en place d'une résolution de l'inflammation (phénotype M2), dès la fin de l'exposition à l'aérosol ; bien que l'inflammation soit toujours présente (phénotype M1), comme observé par l'étude cytologique du LBA.

Cette réponse inflammatoire s'est traduite par une surexpression à court terme de gènes impliqués dans les réponses inflammatoires et immunitaires, les cascades du complément et de coagulation, le stress oxydant, les lésions de l'ADN et la fibrose. D'autre part, une surexpression de protéines impliquées dans le protéasome, les réponses inflammatoires et immunitaires, les cascades du complément et de la coagulation, le stress oxydant ainsi que l'organisation du cytosquelette, a été observée à court terme. De plus, de

nombreuses voies métaboliques enrichies et interactions protéines-protéines ont été identifiées à J0, en corrélation avec l'importante réponse inflammatoire pulmonaire ; alors que ces voies et interactions étaient beaucoup moins nombreuses à J3. Ces mécanismes de régulation des protéines et dans une moindre mesure, des transcrits à court terme; seraient des marqueurs précoces d'une résolution de la réponse inflammatoire. La mise en place de cette résolution à court terme, n'est pas détectée par les méthodes cytologiques ou histopathologiques.

De manière surprenante, une augmentation de l'expression de diverses histones et autres protéines constituant les pièges extracellulaires ou NET, a été mise en évidence dans les surnageant de LBA des rats exposés à court terme. Ces pièges participent aux fonctions de défense de l'hôte par les granulocytes neutrophiles. Cette observation suggère la possible formation de complexes NET dans l'espace alvéolaire suite à l'exposition par voie oro-nasale à un aérosol nanostructuré de TiO_2 ; mécanisme, qui n'a jamais été décrit auparavant à notre connaissance. Ce phénomène s'est produit dans un contexte inflammatoire mais en l'absence de changements histopathologiques significatifs (Figure 43).

Six mois après la fin de l'exposition, l'inflammation a diminué, corrélée à la diminution de la charge pulmonaire en titane. De plus, nous n'avons pas observé de modifications histopathologiques significatives. Ces résultats suggèrent une résolution progressive de l'inflammation et une potentielle récupération de la fonction pulmonaire physiologique.

Cependant, de nombreux gènes et protéines sont restés différentiellement exprimés jusqu'à 180 jours post-exposition. Les conséquences physiopathologiques de ces modifications observées au niveau moléculaire, ne sont pas totalement connues. Toutefois, ces résultats devraient susciter des interrogations quant aux effets pulmonaires à long terme

résultant de l'inhalation de nanoparticules considérées comme faiblement solubles et faiblement toxiques, notamment le TiO₂ (Figure 44).

Les Figures 43 et 44 résument les principaux mécanismes impliqués dans la réponse inflammatoire suite à l'exposition des rats à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ à court et long terme respectivement, sur la base des données obtenues lors des analyses conventionnelles et moléculaires.

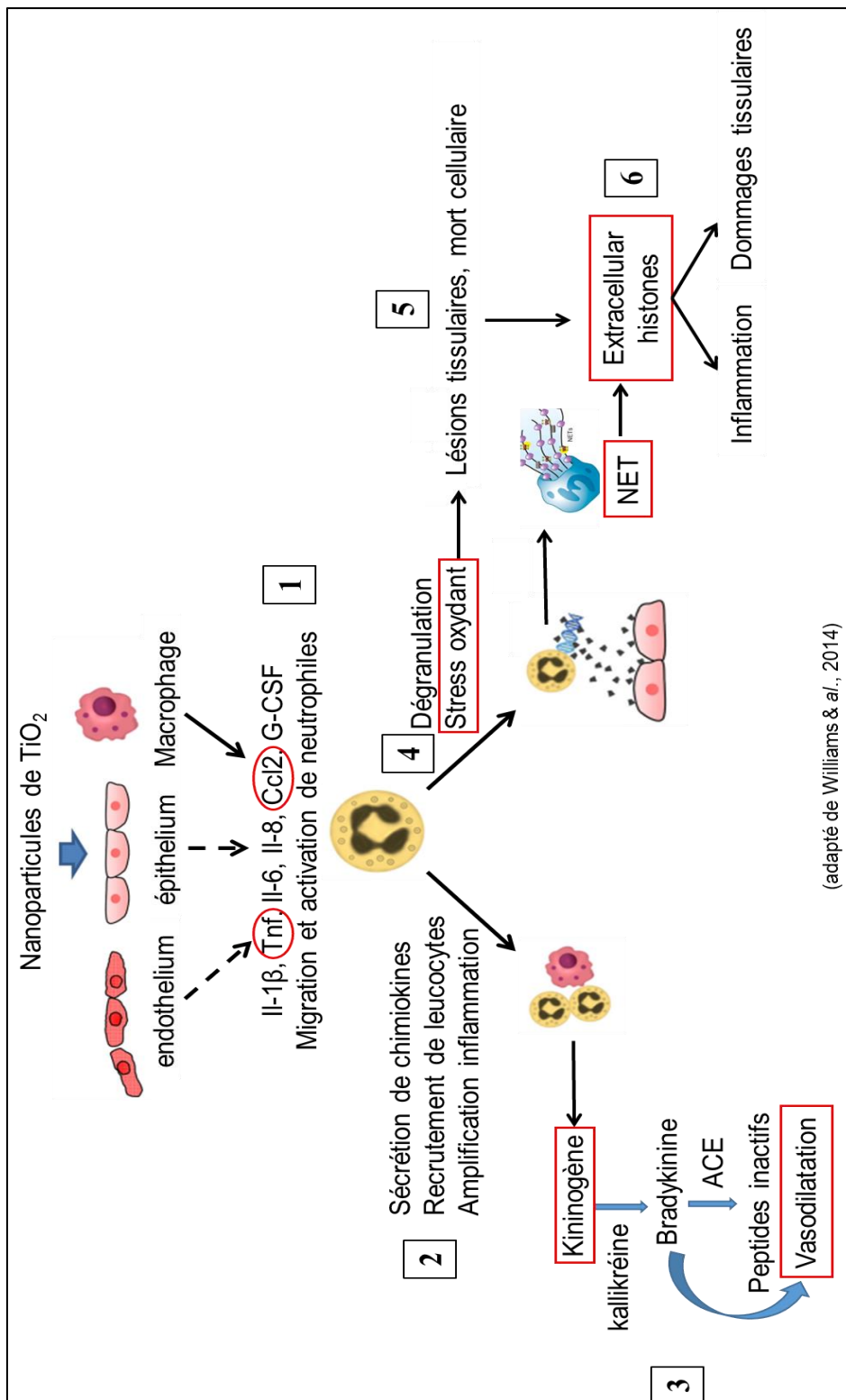


Figure 43 : Réponse pulmonaire inflammatoire à court terme

Un stimulus inflammatoire notamment la présence de NPs de TiO_2 , va entraîner la sécrétion par les macrophages alvéolaires de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (1) : notamment les protéines Tnf et Ccl2 codées par des gènes sur-exprimés dans les poumons de rats exposés ainsi que les protéines Cxcl1, Cxcl2/3, Il1a, Cxcl5 sur-exprimées dans les surnageants de LBA de rats exposés ; à court terme.

(2) Ceci entraîne le recrutement et l'activation de neutrophiles comme observé dans l'approche conventionnelle avec un influx important jusqu'à 3 jours post-exposition. A leur

tour, les neutrophiles vont libérer des chimiokines qui augmentent le recrutement de macrophages et neutrophiles, amplifiant la réponse inflammatoire. Cette amplification se traduit notamment par la présence de macrophages chargés de particules de TiO₂ dans les poumons de rats exposés, ainsi que de particules de TiO₂ dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons de rats exposés, comme observé en histopathologie.

(3) Au cours de l'inflammation aiguë, des changements vasculaires peuvent survenir notamment une augmentation de la perméabilité vasculaire résultant en œdème localisé. Ici *Kngr1* qui code la bradykinine, un puissant vasodilatateur, est surexprimé de manière importante jusqu'à 180 jours post-exposition dans les poumons de rats exposés. De plus, une dérégulation de différents gènes impliqués dans le processus de vasodilatation est observée en transcriptomique à court terme. D'autre part, une augmentation de la masse pulmonaire et de la concentration en protéines totales sont mises en évidence chez les rats exposés jusqu'à 3 jours post-exposition, pouvant traduire la présence d'un œdème pulmonaire.

(4) D'autre part, le recrutement et l'activation de neutrophiles induisent un stress oxydant, se traduisant par la libération d'ERO. Dans cette étude, des transcrits et protéines impliqués dans le stress oxydant apparaissent impactés par l'inhalation de NPs de TiO₂. Ainsi, les gènes *NoxO1*, *NoxA1*, *Duox1*, *Sod2*, *Srxn1* sont surexprimés à court terme dans les poumons de rats exposés. Les protéines Lpo, Mpo, Prdx5, Akr1c9, Mdh2, Txnrd1 et Txnrd2 sont surexprimées dans les surnageants de LBA de rats exposés à court terme.

(5) Ce stress oxydant peut provoquer des lésions tissulaires ainsi que la mort cellulaire. Or une augmentation significative de l'activité LDH témoignant de la présence d'une cytotoxicité, est observée chez les rats exposés jusqu'à 28 jours post-exposition.

(6) Ces lésions tissulaires et la mort cellulaire peuvent expliquer la présence d'histones extracellulaires dans les surnageants de LBA de rats exposés à court terme. Une autre hypothèse est la présence d'un phénomène de NETose.

Ces histones extracellulaires vont à leur tour entraîner une inflammation et des lésions tissulaires.

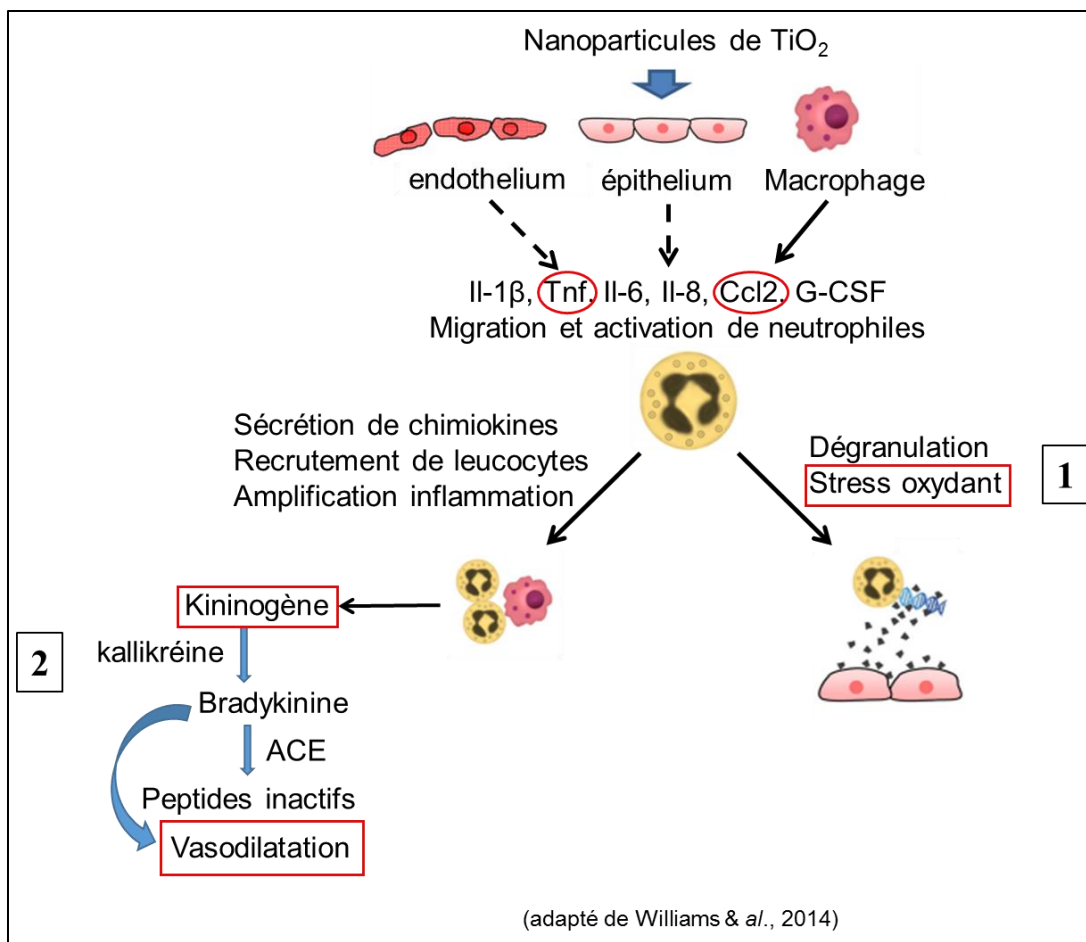


Figure 44 : Réponse pulmonaire inflammatoire à long terme.

A long terme, l'inflammation diminue corrélée à la diminution de la charge pulmonaire en Ti. Toutefois, cette inflammation persiste jusqu'à 180 jours post-exposition, comme le traduit l'augmentation légère mais significative du nombre de neutrophiles dans le LBA de rats exposés à long terme. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de nombreux macrophages chargés de particules regroupés en agglomérats dans les poumons de rats exposés, ainsi que par la présence de nombreuses particules de TiO₂ dans les ganglions lymphatiques de rats exposés, comme observé en histopathologie à long terme.

Concernant l'approche moléculaire, un certain nombre de gènes (92) et protéines (45) sont différemment exprimés jusqu'à 180 jours post-exposition. Parmi les gènes dérégulés, quelques-uns sont impliqués dans stress oxydant (1). Ainsi *Lpo* est sur-exprimé tandis que *Scd1* et *Scd4* sont sous-exprimés à long terme chez les rats exposés.

(2) D'autre part, *Kng1* qui code la bradykinine, un puissant vasodilatateur, est surexprimé de manière importante jusqu'à 180 jours post-exposition dans le poumon de rats exposés. Toutefois, la protéine *Kng1* est sous-exprimée 180 jours post-exposition dans les surnageants de LBA de rats exposés. Une hypothèse serait la mise en place d'une régulation post-transcriptionnelle notamment par l'intermédiaire de miARN.

A long terme, quelques-unes des 45 protéines dérégulées interagissent encore entre elles, et un réseau d'interaction majeur protéine-protéine a été identifié en lien avec la voie métabolique KEGG enrichie « complement and coagulation cascade ». Parmi ces protéines, certaines sont également impliquées dans le stress oxydant (1), avec une sous-expression de *Sod1*, *Pdia3* et *Akr1a1* dans les surnageants de LBA de rats exposés.

Ces résultats suggèrent ainsi une résolution progressive du stress oxydant à long terme chez les rats exposés à l'aérosol nanostructuré de TiO₂.

PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons suggéré pour la première fois, une possible induction de la formation de NET suite à l'exposition par voie oro-nasale à un aérosol nanostructuré de TiO₂. Il nous paraît intéressant d'étudier plus précisément la relation entre la formation de NET et la présence de nanoparticules, et surtout les conséquences physiopathologiques en cas de persistance de ce phénomène.

D'autre part, une telle approche pourrait permettre d'identifier des ensembles de gènes ou des signatures moléculaires, qui permettraient de prédire les effets toxiques des nanomatériaux. Par ailleurs, malgré la complexité des interactions cellulaires présentes au niveau pulmonaire, ces signatures moléculaires pourraient contribuer à la mise au point de tests *in vitro* prédictifs. Nous sommes d'ailleurs en train de comparer l'expression des gènes *in vivo* et *in vitro* sur des cellules THP-1, suite à l'exposition à des NP de TiO₂.

Enfin, une analyse croisée et approfondie de l'ensemble des études de transcriptomique, serait utile pour identifier des biomarqueurs d'effet aux nanomatériaux. Ces biomarqueurs pourraient ensuite être utilisés dans les études de biométrie chez les salariés exposés, *via* leur recherche dans les condensats d'air exhalé en tant que protéines ou produits de leur activité. Les travaux de Pelclova en sont un bon exemple (Pelclova et al., 2017). Cependant la question de la spécificité de ces biomarqueurs se pose.

Références bibliographiques

Adachi K, Yamada N, Yamamoto K, Yoshida Y and Yamamoto O. 2010. In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin. *Nanotoxicology* 4:296-306.

Afssaps. (2011a). Nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc dans les produits cosmétiques : Etat des connaissances sur la pénétration cutanée, génotoxicité et cancérogenèse - Point d'information. Journal [Online] Available at: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Nanoparticules-de-dioxyde-de-titane-et-d-oxyde-de-zinc-dans-les-produits-cosmetiques-Etat-des-connaissances-sur-la-penetration-cutanee-genotoxicite-et-cancerogenese-Point-d-information>.

Afssaps. (2011b). Recommandations relatives à l'utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc en tant que filtres ultraviolets dans les produits cosmétiques. Journal [Online] Available at: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Nanoparticules-de-dioxyde-de-titane-et-d-oxyde-de-zinc-dans-les-produits-cosmetiques-Etat-des-connaissances-sur-la-penetration-cutanee-genotoxicite-et-cancerogenese-Point-d-information>.

Aggarwal NR, King LS and D'alessio FR. 2014a. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 306:L709-L725.

Ahlinder L, Ekstrand-Hammarstrom B, Geladi P and Osterlund L. 2013. Large uptake of titania and iron oxide nanoparticles in the nucleus of lung epithelial cells as measured by Raman imaging and multivariate classification. *Biophysical journal* 105:310-319.

Anjilvel S and Asgharian B. 1995. A multiple-path model of particle deposition in the rat lung. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 28:41-50.

Anses. (2014). Evaluation des risques liés aux nanomatériaux, enjeux et mise à jour des connaissances. Journal [Online] Available at: <https://www.anses.fr/fr/system/files/PRES2014CPA05.pdf>.

Anses. (2016). Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale, les travailleurs et pour l'environnement. Journal [Online] Available at: <https://www.anses.fr/fr/content/%C3%A9valuation-des-risques-li%C3%A9s-aux-nanomat%C3%A9riaux-pour-la-population-g%C3%A9n%C3%A9rale-les-travailleurs>.

Anses. (2017a). Dioxyde de titane. Journal [Online] Available at: <https://www.anses.fr/fr/content/dioxyde-de-titane>.

Anses. (2017b). Nanoparticules de dioxyde de titane dans l'alimentation (additif E 171) : des effets biologiques qui doivent être confirmés. Journal [Online] Available at: <https://www.anses.fr/fr/content/nanoparticules-de-dioxyde-de-titane-dans-l%E2%80%99alimentation-additif-e-171-des-effets-biologiques>.

Armand L, Biola-Clier M, Bobyk L, Collin-Faure V, Diemer H, Strub JM, Cianferani S, Van Dorsselaer A, Herlin-Boime N, Rabilloud T and Carriere M. 2016a. Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view. *Journal of proteomics* 134:163-173.

Armand L, Tarantini A, Beal D, Biola-Clier M, Bobyk L, Sorieul S, Pernet-Gallay K, Marie-Desvergne C, Lynch I, Herlin-Boime N and Carriere M. 2016b. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. *Nanotoxicology* 10:913-923.

Baan RA. 2007. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhalation toxicology* 19 Suppl 1:213-228.

Bannunah AM, Vllasaliu D, Lord J and Stolnik S. 2014. Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Molecular pharmaceutics* 11:4363-4373.

Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G and Groll J. 2010. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano letters* 10:59-63.

Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB and Everitt JJ. 2002. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 70:86-97.

Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB and Everitt JJ. 2004. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 77:347-357.

Bernstein DM. 2007. Synthetic vitreous fibers: a review toxicology, epidemiology and regulations. *Critical reviews in toxicology* 37:839-886.

Bettini S, Boutet-Robinet E, Cartier C, Comera C, Gaultier E, Dupuy J, Naud N, Tache S, Grysan P, Reguer S, Thieriet N, Refregiers M, Thiaudiere D, Cravedi JP, Carriere M, Audinot JN, Pierre FH, Guzylack-Piriou L and Houdeau E. 2017. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific reports* 7:40373.

Binet S, Ricaud M, Chazelet S, Fontaine J, Gaté L, Hédelin G, Malard S, Rousset D and Witschger O. (2017). Dioxyde de titane nanométrique : de la nécessité de proposer une valeur limite d'exposition professionnelle. INRS, 17.

Biswas SK. 2016. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016.

Boffetta P, Gaborieau V, Nadon L, Parent MF, Weiderpass E and Siemiatycki J. 2001. Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal. *Scandinavian journal of work, environment & health* 27:227-232.

Boitelle A. (1997). Mécanismes de recrutement et de régulation de l'activité des macrophages alvéolaires, dans un contexte de pathologie interstitielle pulmonaire. Lille 1.

Borm P, Cassee FR and Oberdorster G. 2015. Lung particle overload: old school -new insights? *Particle and fibre toxicology* 12:10.

Borm PJ, Hohl D, Steinfartz Y, Zeitrager I and Albrecht C. 2000. Chronic Inflammation and Tumor Formation in Rats After Intratracheal Instillation of High Doses of Coal Dusts, Titanium Dioxides, and Quartz. *Inhalation toxicology* 12 Suppl 3:225-231.

Bourdon JA, Halappanavar S, Saber AT, Jacobsen NR, Williams A, Wallin H, Vogel U and Yauk CL. 2012. Hepatic and pulmonary toxicogenomic profiles in mice intratracheally instilled with carbon black nanoparticles reveal pulmonary inflammation, acute phase response, and alterations in lipid homeostasis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 127:474-484.

Bourdon JA, Williams A, Kuo B, Moffat I, White PA, Halappanavar S, Vogel U, Wallin H and Yauk CL. 2013. Gene expression profiling to identify potentially relevant disease outcomes and support human health risk assessment for carbon black nanoparticle exposure. *Toxicology* 303:83-93.

Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J and Vingron M. 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nature genetics* 29:365-371.

Brosson D. (2006). Proteomic analysis and characterization of new spore wall proteins of the microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*, an emerging pathogen of humans. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.

Browning CL, The T, Mason MD and Wise JP, Sr. 2014. Titanium Dioxide Nanoparticles are not Cytotoxic or Clastogenic in Human Skin Cells. *Journal of environmental & analytical toxicology* 4.

Brun E, Carriere M and Mabondzo A. 2012. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO₂ nanoparticles. *Biomaterials* 33:886-896.

Brunauer S, Emmett PH and Teller E. 1938. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* 60:309-319.

Cabon L, Martinez-Torres AC and Susin SA. 2013. [Programmed cell death comes in many flavors]. *Medecine sciences : M/S* 29:1117-1124.

Cancer-Environnement. (2018). Le dioxyde de titane (TiO₂). Journal [Online] Available at: <http://www.cancer-environnement.fr/559-Dioxyde-de-titane.ce.aspx>.

Cao Y, Gong Y, Liao W, Luo Y, Wu C, Wang M and Yang Q. 2018. A review of cardiovascular toxicity of TiO₂, ZnO and Ag nanoparticles (NPs). *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*:1-20.

Cha MH, Rhim T, Kim KH, Jang AS, Paik YK and Park CS. 2007. Proteomic identification of macrophage migration-inhibitory factor upon exposure to TiO₂ particles. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6:56-63.

Chantepie S, Krieger S and Leporrier S. 2012. Méthylation dans les hémopathies malignes : techniques et perspectives. *Hématologie* 18:124-132.

Charles S, Jomini S, Fessard V, Bigorgne-Vizade E, Rousselle C and Michel C. 2018. Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context. *Nanotoxicology* 12:357-374.

Chaudhry Q. 2015. Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) - Revision of the opinion on the safety of the use of titanium dioxide, nano form, in cosmetic products. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 73:669-670.

Chen JL and Fayerweather WE. 1988. Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide. *Journal of occupational medicine : official publication of the Industrial Medical Association* 30:937-942.

Chen M, Zhang M, Borlak J and Tong W. 2012. A decade of toxicogenomic research and its contribution to toxicological science. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 130:217-228.

- Chen Q, Wang N, Zhu M, Lu J, Zhong H, Xue X, Guo S, Li M, Wei X, Tao Y and Yin H. 2018a. TiO₂ nanoparticles cause mitochondrial dysfunction, activate inflammatory responses, and attenuate phagocytosis in macrophages: A proteomic and metabolomic insight. *Redox biology* 15:266-276.
- Chen S, Yin R, Mutze K, Yu Y, Takenaka S, Konigshoff M and Stoeger T. 2016. No involvement of alveolar macrophages in the initiation of carbon nanoparticle induced acute lung inflammation in mice. *Particle and fibre toxicology* 13:33.
- Chen T, Yan J and Li Y. 2014a. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of food and drug analysis* 22:95-104.
- Chen Z, Wang Y, Ba T, Li Y, Pu J, Chen T, Song Y, Gu Y, Qian Q, Yang J and Jia G. 2014b. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology letters* 226:314-319.
- Chen Z, Wang Y, Wang X, Zhuo L, Chen S, Tang S, Zhao L, Luan X and Jia G. 2018b. Effect of titanium dioxide nanoparticles on glucose homeostasis after oral administration. *Journal of applied toxicology : JAT* 38:810-823.
- Chen Z, Wang Y, Zhuo L, Chen S, Zhao L, Chen T, Li Y, Zhang W, Gao X, Li P, Wang H and Jia G. 2015a. Interaction of titanium dioxide nanoparticles with glucose on young rats after oral administration. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 11:1633-1642.
- Chen Z, Wang Y, Zhuo L, Chen S, Zhao L, Luan X, Wang H and Jia G. 2015b. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the cardiovascular system after oral administration. *Toxicology letters* 239:123-130.
- Chithrani DB. 2010. Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures. *Molecular membrane biology* 27:299-311.
- Cho WS, Kang BC, Lee JK, Jeong J, Che JH and Seok SH. 2013. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and fibre toxicology* 10:9.
- Ciel. (2014). Fiche d'information sur la définition des nanomatériaux. Center for International Environmental Law CIEL.
- Collas P. 2010. The current state of chromatin immunoprecipitation. *Molecular biotechnology* 45:87-100.
- Conroy DM and Williams TJ. 2001. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respiratory research* 2:150-156.
- Contado C and Pagnoni A. 2008. TiO₂ in commercial sunscreen lotion: flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Analytical chemistry* 80:7594-7608.
- Cosnier F, Bau S, Grossmann S, Nunge H, Brochard C, Viton S, Payet R, Witschger O and Gaté L. 2016. Design and Characterization of an Inhalation System to Expose Rodents to Nanoaerosols. *Aerosol and Air Quality Research*.
- Costa PM and Fadeel B. 2016. Emerging systems biology approaches in nanotoxicology: Towards a mechanism-based understanding of nanomaterial hazard and risk. *Toxicology and applied pharmacology* 299:101-111.
- Creutzenberg O, Bellmann B, Korolewitz R, Koch W, Mangelsdorf I, Tillmann T and Schaudien D. 2012. Change in agglomeration status and toxicokinetic fate of various nanoparticles in vivo following lung exposure in rats. *Inhalation toxicology* 24:821-830.
- Cullen RT, Tran CL, Buchanan D, Davis JM, Searl A, Jones AD and Donaldson K. 2000. Inhalation of poorly soluble particles. I. Differences in inflammatory response and clearance during exposure. *Inhalation toxicology* 12:1089-1111.
- Curwin B and Bertke S. 2011. Exposure characterization of metal oxide nanoparticles in the workplace. *Journal of occupational and environmental hygiene* 8:580-587.
- Daigo K, Takamatsu Y and Hamakubo T. 2016. The Protective Effect against Extracellular Histones Afforded by Long-Pentraxin PTX3 as a Regulator of NETs. *Frontiers in immunology* 7:344.
- Dankovic D, Kuempel E and Wheeler M. 2007. An approach to risk assessment for TiO₂. *Inhalation toxicology* 19 Suppl 1:205-212.
- Dembele D and Kastner P. 2014. Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes. *BMC bioinformatics* 15:14.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S and Sawaya BE. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research* 29:313-326.
- Detaille C. (2008). Pathologie respiratoire des rongeurs et lagomorphes de compagnie.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K and Stone V. 2003. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhalation toxicology* 15:39-52.
- Disdier C, Devoy J, Cosnefroy A, Chalansonnet M, Herlin-Boime N, Brun E, Lund A and Mabondzo A. 2015. Tissue biodistribution of intravenously administrated titanium dioxide nanoparticles revealed blood-brain barrier clearance and brain inflammation in rat. *Particle and fibre toxicology* 12:27.

- Donaldson K, Borm PJ, Oberdorster G, Pinkerton KE, Stone V and Tran CL. 2008. Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: the key role of the proximal alveolar region. *Inhalation toxicology* 20:53-62.
- Donaldson K, Li XY and Macnee W. 1998. Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* 29:553-560.
- Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H and Schlesinger RB. 2000. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 55:24-35.
- Driscoll KE, Deyo LC, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG and Bertram TA. 1997. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis* 18:423-430.
- Ecetoc. (2013). TR 122 - Poorly Soluble Particles / Lung Overload. Brussels: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.
- Edgar R and Barrett T. 2006. NCBI GEO standards and services for microarray data. *Nature biotechnology* 24:1471-1472.
- El-Sharkawy N, Hamza S and Abou-Zeid E. 2010. Toxic impact of titanium dioxide (TiO₂) in male albino rats with special reference to its effect on reproductive system. *J Am Sci* 6:865-872.
- Engler-Chiurazzi EB, Stapleton PA, Stalnaker JJ, Ren X, Hu H, Nurkiewicz TR, McBride CR, Yi J, Engels K and Simpkins JW. 2016. Impacts of prenatal nanomaterial exposure on male adult Sprague-Dawley rat behavior and cognition. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 79:447-452.
- Eu. (2010). "DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes."
- Fan C, Meuchel LW, Su Q, Angelini DJ, Zhang A, Cheadle C, Kolosova I, Makarevich OD, Yamaji-Kegan K, Rothenberg ME and Johns RA. 2015. Resistin-Like Molecule alpha in Allergen-Induced Pulmonary Vascular Remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 53:303-313.
- Ferin J, Oberdorster E, Soderholm SC and Gelein R. 1991. Pulmonary Tissue Access of Ultrafine Particles. *Journal of Aerosol Medicine* 4:57-68.
- Ferin J, Oberdorster G and Penney DP. 1992. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 6:535-542.
- Florence AT. 2005. Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential? *Drug discovery today Technologies* 2:75-81.
- Folkerts G, Kloek J, Muijsers RB and Nijkamp FP. 2001. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. *European journal of pharmacology* 429:251-262.
- Fournier T, Medjoubi NN and Porquet D. 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et biophysica acta* 1482:157-171.
- Froehlich E and Salar-Behzadi S. (2014). Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies.
- Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK and Blot WJ. 2003. A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *Journal of occupational and environmental medicine* 45:400-409.
- Fuchs G, Diges C, Kohlstaedt LA, Wehner KA and Sarnow P. 2011. Proteomic analysis of ribosomes: translational control of mRNA populations by glycogen synthase GYS1. *Journal of molecular biology* 410:118-130.
- Fujiwara N and Kobayashi K. 2005. Macrophages in inflammation. *Current drug targets Inflammation and allergy* 4:281-286.
- Gao H, He X, Wu M, Zhang Z, Wang D, Lv L, Su Z and Huang Y. 2011a. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between stenotic and normal colon segment tissues derived from patients with Hirschsprung's disease. *The protein journal* 30:138-142.
- Gao Y, Gopee NV, Howard PC and Yu LR. 2011b. Proteomic analysis of early response lymph node proteins in mice treated with titanium dioxide nanoparticles. *Journal of proteomics* 74:2745-2759.
- Garabrant DH, Fine LJ, Oliver C, Bernstein L and Peters JM. 1987. Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers. *Scandinavian journal of work, environment & health* 13:47-51.
- Gate L, Disdier C, Cosnier F, Gagnaire F, Devoy J, Saba W, Brun E, Chalansonnet M and Mabondzo A. 2017. Biopersistence and translocation to extrapulmonary organs of titanium dioxide nanoparticles after subacute inhalation exposure to aerosol in adult and elderly rats. *Toxicology letters* 265:61-69.

- Ge Y, Bruno M, Wallace K, Winnik W and Prasad RY. 2011. Proteome profiling reveals potential toxicity and detoxification pathways following exposure of BEAS-2B cells to engineered nanoparticle titanium dioxide. *Proteomics* 11:2406-2422.
- Geiser M. 2010. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 23:207-217.
- Geiser M and Kreyling WG. 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 7:2.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J and Gehr P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental health perspectives* 113:1555-1560.
- George I, Naudin G, Boland S, Mornet S, Contremoulins V, Beugnon K, Martinon L, Lambert O and Baeza-Squiban A. 2015. Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier. *Nanoscale* 7:4529-4544.
- Geraets L, Oomen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, Laurentie M, Verharen HW, Brandon EF and De Jong WH. 2014. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Particle and fibre toxicology* 11:30.
- Geys J, Nemmar A, Verbeken E, Smolders E, Ratoi M, Hoylaerts MF, Nemery B and Hoet PH. 2008. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge. *Environmental health perspectives* 116:1607.
- Gordon S and Martinez FO. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593-604.
- Grailer JJ and Ward PA. 2014. Lung inflammation and damage induced by extracellular histones. *Inflammation and cell signaling* 1.
- Grassian VH, O'shaughnessy P T, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM and Thorne PS. 2007. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environmental health perspectives* 115:397-402.
- Greim H, Borm P, Schins R, Donaldson K, Driscoll K, Hartwig A, Kuempel E, Oberdörster G and Speit G. 2001. TOXICITY OF FIBERS AND PARTICLES? REPORT OF THE WORKSHOP HELD IN MUNICH, GERMANY, 26th 27 OCTOBER 2000. *Inhalation toxicology* 13:737-754.
- Griffis L, Wolff R, Beeth R, Hobbs C and McClellan R. (1979). Pulmonary deposition of a/sup 99m/Tc-labeled aerosol in a whole-body exposure.
- Guichard Y, Schmit J, Darne C, Gate L, Goutet M, Rousset D, Rastoix O, Wrobel R, Witschger O, Martin A, Fierro V and Binet S. 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *The Annals of occupational hygiene* 56:631-644.
- Guo NL, Wan YW, Denvir J, Porter DW, Pacurari M, Wolfarth MG, Castranova V and Qian Y. 2012. Multiwalled carbon nanotube-induced gene signatures in the mouse lung: potential predictive value for human lung cancer risk and prognosis. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 75:1129-1153.
- Gurr JR, Wang AS, Chen CH and Jan KY. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213:66-73.
- Halappanavar S, Jackson P, Williams A, Jensen KA, Hougaard KS, Vogel U, Yauk CL and Wallin H. 2011. Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. *Environmental and molecular mutagenesis* 52:425-439.
- Halappanavar S, Saber AT, Decan N, Jensen KA, Wu D, Jacobsen NR, Guo C, Rogowski J, Koponen IK, Levin M, Madsen AM, Atluri R, Snitka V, Birkedal RK, Rickerby D, Williams A, Wallin H, Yauk CL and Vogel U. 2015. Transcriptional profiling identifies physicochemical properties of nanomaterials that are determinants of the in vivo pulmonary response. *Environmental and molecular mutagenesis* 56:245-264.
- Hamadeh HK, Amin RP, Paules RS and Afshari CA. 2002. An overview of toxicogenomics. *Current issues in molecular biology* 4:45-56.
- Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N, Horimasu Y, Masuda T, Miyamoto S, Nakashima T, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N and Kohno N. 2016. Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Disease markers* 2016:4759040.
- Hambly N, Shimbori C and Kolb M. 2015. Molecular classification of idiopathic pulmonary fibrosis: personalized medicine, genetics and biomarkers. *Respirology* 20:1010-1022.
- Hamilton RF, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M and Holian A. 2009. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Particle and fibre toxicology* 6:35.
- Heijne WH, Kienhuis AS, Van Ommen B, Stierum RH and Groten JP. 2005. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert review of proteomics* 2:767-780.

Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W and Levsen K. 1995. Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and 2 Different Strains of Mice to Diesel-Engine Exhaust, Carbon-Black, and Titanium-Dioxide. *Inhalation toxicology* 7:533-556.

Herlin-Boime N, Michaud-Soret I, Fauquant C, Armand L and Carrière M. 2013. De la synthèse des nanoparticules de TiO₂ à l'étude de leur comportement. *Biofutur* 294:3506.

Herold S, Mayer K and Lohmeyer J. 2011. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Frontiers in immunology* 2:65.

Hervé-Bazin B. (2007). Les nanoparticules: Un enjeu majeur pour la santé au travail ?

Hext PM, Tomenson JA and Thompson P. 2005. Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology. *The Annals of occupational hygiene* 49:461-472.

Hirsch JG. 1958. Bactericidal action of histone. *The Journal of experimental medicine* 108:925-944.

Ho SM, Johnson A, Tarapore P, Janakiram V, Zhang X and Leung YK. 2012. Environmental epigenetics and its implication on disease risk and health outcomes. *ILAR journal* 53:289-305.

Hohr D, Steinfartz Y, Schins RP, Knaapen AM, Martra G, Fubini B and Borm PJ. 2002. The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *International journal of hygiene and environmental health* 205:239-244.

Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, Sloth JJ, Loschner K, Larsen EH, Birkedal RK, Vibenholt A, Boisen AM, Wallin H and Vogel U. 2010. Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Particle and fibre toxicology* 7:16.

Hsiao IL and Huang YJ. 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. *The Science of the total environment* 409:1219-1228.

Hu R, Gong X, Duan Y, Li N, Che Y, Cui Y, Zhou M, Liu C, Wang H and Hong F. 2010. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO₂ nanoparticles. *Biomaterials* 31:8043-8050.

Huang C, Sun M, Yang Y, Wang F, Ma X, Li J, Wang Y, Ding Q, Ying H, Song H, Wu Y, Jiang Y, Jia X, Ba Q and Wang H. 2017. Titanium dioxide nanoparticles prime a specific activation state of macrophages. *Nanotoxicology* 11:737-750.

Huang DW, Sherman BT and Lempicki RA. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4:44-57.

Husain M, Kyjovska ZO, Bourdon-Lacombe J, Saber AT, Jensen KA, Jacobsen NR, Williams A, Wallin H, Halappanavar S, Vogel U and Yauk CL. 2015. Carbon black nanoparticles induce biphasic gene expression changes associated with inflammatory responses in the lungs of C57BL/6 mice following a single intratracheal instillation. *Toxicology and applied pharmacology* 289:573-588.

Husain M, Saber AT, Guo C, Jacobsen NR, Jensen KA, Yauk CL, Williams A, Vogel U, Wallin H and Halappanavar S. 2013. Pulmonary instillation of low doses of titanium dioxide nanoparticles in mice leads to particle retention and gene expression changes in the absence of inflammation. *Toxicology and applied pharmacology* 269:250-262.

Iarc. (2010). Carbon black, titanium dioxide, and talc. IARC Press, International Agency for Research on Cancer.

Iarc. (2010). Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc., 93. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human.

Ichihara S, Li W, Omura S, Fujitani Y, Liu Y, Wang Q, Hiraku Y, Hisanaga N, Ding X, Kobayashi T and Ichihara G. (2013). Effects on respiratory and cardiovascular systems in workers handling titanium dioxide particles. The 6th international symposium on nanotechnology, occupational and environmental health (NanOEH).

Icrp I. 1994. ICRP publication 66: human respiratory tract model for radiological protection.

Ilsi RSI. 2000. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhalation toxicology* 12:1.

Inra. (2017). Additif alimentaire E171 : les premiers résultats de l'exposition orale aux nanoparticules de dioxyde de titane. *Journal* [Online] Available at: <http://presse.inra.fr/Communiqués-de-presse/Additif-alimentaire-E171>.

Inrs. 2012. Utilisation du dioxyde de titane nanométrique. Cas particulier de la filière BTP.

Inrs. (2013). Dioxyde de titane, Fiche toxicologique n°291.

Inrs. (2014). Nanomatériaux, nanoparticules. *Journal* [Online] Available at: <http://www.inrs.fr/risques/nanomateriaux/effets-sante.html>.

Inventory CP. (2013). Project on Emerging Nanotechnologies. *Journal* [Online] Available at: <http://www.nanotechproject.org/cpi>. Accessed on 2018-05

Iso. (2012). ISO/TR 13014:2012, Nanotechnologies – Guidance on physicochemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment.

Iso. (2013). ISO/TS 17200 (2013) - Nanotechnology — Nanoparticles in powder form — Characteristics and measurements.

Iso. (2015). ISO/TS 80004-2: 2015 Nanotechnologies—Vocabulary—Part 2: Nano-objects.

Iso. (2016). ISO/TC 229 - Nanotechnologies.

Jansen R, Osterwalder U, Wang SQ, Burnett M and Lim HW. 2013. Photoprotection: part II. Sunscreen: development, efficacy, and controversies. *Journal of the American Academy of Dermatology* 69:867 e861-814; quiz 881-862.

Ji JH, Jung JH, Kim SS, Yoon JU, Park JD, Choi BS, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS, Shin JH, Sung JH, Song KS and Yu IJ. 2007. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation toxicology* 19:857-871.

Jones K, Morton J, Smith I, Jurkschat K, Harding AH and Evans G. 2015. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology letters* 233:95-101.

Jovanovic B, Anastasova L, Rowe EW, Zhang Y, Clapp AR and Palic D. 2011. Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Ecotoxicology and environmental safety* 74:675-683.

Kan H, Wu Z, Lin YC, Chen TH, Cumpston JL, Kashon ML, Leonard S, Munson AE and Castranova V. 2014. The role of nodose ganglia in the regulation of cardiovascular function following pulmonary exposure to ultrafine titanium dioxide. *Nanotoxicology* 8:447-454.

Kang SJ, Kim BM, Lee YJ and Chung HW. 2008. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environmental and molecular mutagenesis* 49:399-405.

Kettler K, Veltman K, Van De Meent D, Van Wezel A and Hendriks AJ. 2014. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental toxicology and chemistry* 33:481-492.

Khansari N, Shakiba Y and Mahmoudi M. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery* 3:73-80.

Kim JK, Samaranayake M and Pradhan S. 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 66:596-612.

Kim SC, Chen DR, Qi C, Gelein RM, Finkelstein JN, Elder A, Bentley K, Oberdorster G and Pui DY. 2010. A nanoparticle dispersion method for in vitro and in vivo nanotoxicity study. *Nanotoxicology* 4:42-51.

Knuckles TL, Yi J, Frazer DG, Leonard HD, Chen BT, Castranova V and Nurkiewicz TR. 2012. Nanoparticle inhalation alters systemic arteriolar vasoreactivity through sympathetic and cyclooxygenase-mediated pathways. *Nanotoxicology* 6:724-735.

Koizumi A, Tsukada M, Hirano S, Kamiyama S, Masuda H and Suzuki KT. 1993. Energy Restriction That Inhibits Cellular Proliferation by Torpor Can Decrease Susceptibility to Spontaneous and Asbestos-Induced Lung-Tumors in a/J Mice. *Lab Invest* 68:728-739.

Kreyling WG. 2016. Discovery of unique and ENM- specific pathophysiologic pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats. *Toxicology and applied pharmacology* 299:41-46.

Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Seitz J, Scymczak W, Wenk A, Mayer P, Takenaka S and Oberdorster G. 2009. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhalation toxicology* 21 Suppl 1:55-60.

Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S and Moller W. 2013. Differences in the biokinetics of inhaled nano-versus micrometer-sized particles. *Accounts of chemical research* 46:714-722.

Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdorster G and Ziesenis A. 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 65:1513-1530.

Kulkarni P, Baron PA and Willeke K. (2011). *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*. Wiley.

Kumar V and Sharma A. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International immunopharmacology* 10:1325-1334.

Labille J, Feng J, Botta C, Borschneck D, Sammut M, Cabie M, Auffan M, Rose J and Bottero JY. 2010. Aging of TiO₂ nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environ Pollut* 158:3482-3489.

- Lacour S. 2011. Définir les nanomatériaux : une controverse scientifique ou normative ? ANSES - Bulletin de veille scientifique - Santé Environnement Travail 16.
- Landsiedel R, Fabian E, Ma-Hock L, Wohlleben W, Wiench K, Oesch F and Van Ravenzwaay B. 2012. Toxicokinetics of nanomaterials. *Archives of toxicology* 86:1021-1060.
- Larese Filon F, Mauro M, Adami G, Bovenzi M and Crosera M. 2015. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP 72:310-322.
- Leblanc AJ, Moseley AM, Chen BT, Frazer D, Castranova V and Nurkiewicz TR. 2010. Nanoparticle inhalation impairs coronary microvascular reactivity via a local reactive oxygen species-dependent mechanism. *Cardiovascular toxicology* 10:27-36.
- Lee CG. 2009. Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling. *Yonsei medical journal* 50:22-30.
- Lee KP, Trochimowicz HJ and Reinhardt CF. 1985. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicology and applied pharmacology* 79:179-192.
- Li G, Lv L, Fan H, Ma J, Li Y, Wan Y and Zhao XS. 2010a. Effect of the agglomeration of TiO₂ nanoparticles on their photocatalytic performance in the aqueous phase. *Journal of colloid and interface science* 348:342-347.
- Li N, Georas S, Alexis N, Fritz P, Xia T, Williams MA, Horner E and Nel A. 2016. A work group report on ultrafine particles (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology): Why ambient ultrafine and engineered nanoparticles should receive special attention for possible adverse health outcomes in human subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138:386-396.
- Li Y, Li J, Yin J, Li W, Kang C, Huang Q and Li Q. 2010b. Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10:8544-8549.
- Li Y, Yan J, Ding W, Chen Y, Pack LM and Chen T. 2017. Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis* 32:33-46.
- Liao M and Liu H. 2012. Gene expression profiling of nephrotoxicity from copper nanoparticles in rats after repeated oral administration. *Environmental toxicology and pharmacology* 34:67-80.
- Liou SH, Tsai CS, Pelclova D, Schubauer-Berigan MK and Schulte PA. 2015. Assessing the first wave of epidemiological studies of nanomaterial workers. *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology* 17:413.
- Liu R, Yin L, Pu Y, Liang G, Zhang J, Su Y, Xiao Z and Ye B. 2009. Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Progress in Natural Science* 19:573-579.
- Liz R, Simard JC, Leonardi LB and Girard D. 2015. Silver nanoparticles rapidly induce atypical human neutrophil cell death by a process involving inflammatory caspases and reactive oxygen species and induce neutrophil extracellular traps release upon cell adhesion. *International immunopharmacology* 28:616-625.
- Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, Van Ravenzwaay B and Landsiedel R. 2009. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhalation toxicology* 21:102-118.
- Ma-Hock L, Gamer AO, Landsiedel R, Leibold E, Frechen T, Sens B, Linsenbuehler M and Van Ravenzwaay B. 2007. Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials. *Inhalation toxicology* 19:833-848.
- Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V and Dusinska M. 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 8:233-278.
- Martinez FO and Gordon S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6:13.
- Mayadas TN, Cullere X and Lowell CA. 2014. The multifaceted functions of neutrophils. *Annual review of pathology* 9:181-218.
- Meng H, Xia T, George S and Nel AE. 2009. A Predictive Toxicological Paradigm for the Safety Assessment of Nanomaterials. *ACS nano* 3:1620-1627.
- Miller FJ. 2000. Dosimetry of particles in laboratory animals and humans in relationship to issues surrounding lung overload and human health risk assessment: a critical review. *Inhalation toxicology* 12:19-57.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ and Hill AM. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164:6166-6173.
- Misra BB. 2018. New tools and resources in metabolomics: 2016-2017. *Electrophoresis*.
- Moller P, Jensen DM, Wils RS, Andersen MHG, Danielsen PH and Roursgaard M. 2017. Assessment of evidence for nanosized titanium dioxide-generated DNA strand breaks and oxidatively damaged DNA in cells and animal models. *Nanotoxicology* 11:1237-1256.

- Monteiller C, Tran L, Macnee W, Faux S, Jones A, Miller B and Donaldson K. 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occupational and environmental medicine* 64:609-615.
- Morimoto Y, Horie M, Kobayashi N, Shinohara N and Shimada M. 2013. Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles. *Accounts of chemical research* 46:770-781.
- Morrow PE. 1988. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 10:369-384.
- Moschen AR, Adolph TE, Gerner RR, Wieser V and Tilg H. 2017. Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 28:388-397.
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, Van Ginderachter JA, Vogel SN and Wynn TA. 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41:14-20.
- Murray PJ and Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews Immunology* 11:723-737.
- Nanoderm. (2007). Quality of skin as a barrier to ultra-fine particles (Final report).
- Narciso SP, Nadziejko E, Chen LC, Gordon T and Nadziejko C. 2003. Adaptation to stress induced by restraining rats and mice in nose-only inhalation holders. *Inhalation toxicology* 15:1133-1143.
- Naya M, Kobayashi N, Ema M, Kasamoto S, Fukumuro M, Takami S, Nakajima M, Hayashi M and Nakanishi J. 2012. In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 62:1-6.
- Nel A, Xia T, Mädler L and Li N. 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 311:622-627.
- Newman MD, Stotland M and Ellis JI. 2009. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology* 61:685-692.
- Nicholson JK, Lindon JC and Holmes E. 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 29:1181-1189.
- Nikota J, Williams A, Yauk CL, Wallin H, Vogel U and Halappanavar S. 2016. Meta-analysis of transcriptomic responses as a means to identify pulmonary disease outcomes for engineered nanomaterials. *Particle and fibre toxicology* 13:25.
- Niosh. 2011. Occupational Exposure to Titanium Dioxide Current Intelligence. National Institute for Occupational Safety and Health Bulletin 63.
- Noel A, Charbonneau M, Cloutier Y, Tardif R and Truchon G. 2013a. Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO₂: effect of primary particle size and agglomeration state. *Particle and fibre toxicology* 10:48.
- Noel A, Cloutier Y, Wilkinson KJ, Dion C, Halle S, Maghni K, Tardif R and Truchon G. 2013b. Generating nano-aerosols from TiO₂ (5 nm) nanoparticles showing different agglomeration states. Application to toxicological studies. *Journal of occupational and environmental hygiene* 10:86-96.
- Nurkiewicz TR, Porter DW, Hubbs AF, Cumpston JL, Chen BT, Frazer DG and Castranova V. 2008. Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Particle and fibre toxicology* 5:1.
- Nurkiewicz TR, Porter DW, Hubbs AF, Stone S, Chen BT, Frazer DG, Boegehold MA and Castranova V. 2009. Pulmonary nanoparticle exposure disrupts systemic microvascular nitric oxide signaling. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 110:191-203.
- Nurkiewicz TR, Porter DW, Hubbs AF, Stone S, Moseley AM, Cumpston JL, Goodwill AG, Frisbee SJ, Perrotta PL, Brock RW, Frisbee JC, Boegehold MA, Frazer DG, Chen BT and Castranova V. 2011. Pulmonary particulate matter and systemic microvascular dysfunction. *Res Rep Health Eff Inst*:3-48.
- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC and Afshari CA. 1999. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Molecular carcinogenesis* 24:153-159.
- O'Brien M. 2012. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Topics in companion animal medicine* 27:46-52.
- O'reilly S. 2017. Epigenetics in fibrosis. *Molecular aspects of medicine* 54:89-102.
- Oberdorster G. 1995. Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 21:123-135.
- Oberdorster G. 1996. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhalation toxicology* 8 Suppl:73-89.

- Oberdorster G. 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *International archives of occupational and environmental health* 74:1-8.
- Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC and Finkelstein J. 1992. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 97:193-199.
- Oberdorster G, Ferin J and Lehnert BE. 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 5:173-179.
- Oberdorster G, Oberdorster E and Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 113:823-839.
- Oecd. (2015). Dossier on Titanium Dioxide - Part 1/3 - NM105.
- Oecd. (2016a). Physical-chemical parameters : measurements and methods relevant for the regulation of nanomaterials - OECD Workshop Report - Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 63.
- Oecd. (2016b). Publications in the Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials.: OECD.
- Oecd. (2017). "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study.". Organization for Economic Co-operation and Development Guidelines for the Testing of Chemicals.
- Oh P, Borgstrom P, Witkiewicz H, Li Y, Borgstrom BJ, Chrastina A, Iwata K, Zinn KR, Baldwin R, Testa JE and Schnitzer JE. 2007. Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nature biotechnology* 25:327-337.
- Okuda-Shimazaki J, Takaku S, Kanehira K, Sonezaki S and Taniguchi A. 2010. Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. *International journal of molecular sciences* 11:2383-2392.
- Oleksiak MF. (2008). Toxicogenomics. In: HODGSON, R. C. S. A. E. ed. *Molecular and Biochemical Toxicology*, Fourth Edition. Hoboken, NJ, USA. : John Wiley & Sons, Inc.
- Olin S. (2000). The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhalation toxicology*. ILSI Risk Science Institute, 1-17.
- Ostraat ML, Swain KA and Krajewski JJ. 2008. SiO₂ aerosol nanoparticle reactor for occupational health and safety studies. *Journal of occupational and environmental hygiene* 5:390-398.
- Oyabu T, Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Lee BW, Okada T, Myojo T, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Kawaguchi K and Sasaki T. 2016. Comparison between whole-body inhalation and nose-only inhalation on the deposition and health effects of nanoparticles. *Environmental health and preventive medicine* 21:42-48.
- Page NM. 2004. Hemokinins and endokinins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:1652-1663.
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A and Zychlinsky A. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 191:677-691.
- Pardo A, Cabrera S, Maldonado M and Selman M. 2016. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research* 17:23.
- Pati R, Das I, Mehta RK, Sahu R and Sonawane A. 2016. Zinc-Oxide Nanoparticles Exhibit Genotoxic, Clastogenic, Cytotoxic and Actin Depolymerization Effects by Inducing Oxidative Stress Responses in Macrophages and Adult Mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 150:454-472.
- Pelcova D, Zdimal V, Fenclova Z, Vlckova S, Schwarz J, Pusman J, Zikova N, Syslova K, Kuzma M and Navratil T. 2012. Markers of oxidative stress are elevated in workers exposed to nanoparticles. *Proceedings of the 4th International Conference on NANOCON, Brno, Czech Republic*:23-25.
- Pelcova D, Zdimal V, Fenclova Z, Vlckova S, Turci F, Corazzari I, Kacer P, Schwarz J, Zikova N, Makes O, Syslova K, Komarc M, Belacek J, Navratil T, Machajova M and Zakharov S. 2016a. Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO₂ (nano) particles. *Occupational and environmental medicine* 73:110-118.
- Pelcova D, Zdimal V, Kacer P, Vlckova S, Fenclova Z, Navratil T, Komarc M, Schwarz J, Zikova N, Makes O and Zakharov S. 2016b. Markers of nucleic acids and proteins oxidation among office workers exposed to air pollutants including (nano)TiO₂ particles. *Neuro endocrinology letters* 37:13-16.
- Pelcova D, Zdimal V, Kacer P, Zikova N, Komarc M, Fenclova Z, Vlckova S, Schwarz J, Makes O, Syslova K, Navratil T, Turci F, Corazzari I, Zakharov S and Bello D. 2017. Markers of lipid oxidative damage in the exhaled breath condensate of nano TiO₂ production workers. *Nanotoxicology* 11:52-63.
- Pennefather JN, Lecci A, Canden ML, Patak E, Pinto FM and Maggi CA. 2004. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life sciences* 74:1445-1463.
- Petaja J. 2011. Inflammation and coagulation. An overview. *Thrombosis research* 127 Suppl 2:S34-37.
- Pineau C. 2006. La protéomique : nouvelles approches en génomique fonctionnelle. *MT médecine de la reproduction* 8:373-384.

- Pisani C, Gaillard JC, Nouvel V, Odorico M, Armengaud J and Prat O. 2015. High-throughput, quantitative assessment of the effects of low-dose silica nanoparticles on lung cells: grasping complex toxicity with a great depth of field. *BMC genomics* 16:315.
- Porter DW, Wu N, Hubbs AF, Mercer RR, Funk K, Meng F, Li J, Wolfarth MG, Battelli L, Friend S, Andrew M, Hamilton R, Jr., Sriram K, Yang F, Castranova V and Holian A. 2013. Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 131:179-193.
- Porto BN and Stein RT. 2016. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Frontiers in immunology* 7:311.
- Pott F and Roller M. 2005. Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur J Oncol* 10:249-281.
- Potter LR, Abbey-Hosch S and Dickey DM. 2005. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine reviews* 27:47-72.
- Poulsen SS, Jacobsen NR, Labib S, Wu D, Husain M, Williams A, Bøgelund JP, Andersen O, Købler C and Mølhav K. 2013. Transcriptomic analysis reveals novel mechanistic insight into murine biological responses to multi-walled carbon nanotubes in lungs and cultured lung epithelial cells. *PLoS one* 8:e80452.
- Poulsen SS, Saber AT, Mortensen A, Szarek J, Wu D, Williams A, Andersen O, Jacobsen NR, Yauk CL, Wallin H, Halappanavar S and Vogel U. 2015a. Changes in cholesterol homeostasis and acute phase response link pulmonary exposure to multi-walled carbon nanotubes to risk of cardiovascular disease. *Toxicology and applied pharmacology* 283:210-222.
- Poulsen SS, Saber AT, Williams A, Andersen O, Kobler C, Atluri R, Pozzebón ME, Mucelli SP, Simion M, Rickerby D, Mortensen A, Jackson P, Kyjovska ZO, Molhave K, Jacobsen NR, Jensen KA, Yauk CL, Wallin H, Halappanavar S and Vogel U. 2015b. MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differences in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs. *Toxicology and applied pharmacology* 284:16-32.
- Price O, Asgharian B, Miller F, Cassee F and De Winter-Sorkina R. 2002. Multiple Path Particle Dosimetry model (MPPD v1. 0): A model for human and rat airway particle dosimetry. RIVM rapport 650010030.
- R-Nano. (2017). Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire: rapport d'étude 2017. Ministère de la Transition écologique et solidaire, 317.
- Rahman L, Wu D, Johnston M, William A and Halappanavar S. 2017. Toxicogenomics analysis of mouse lung responses following exposure to titanium dioxide nanomaterials reveal their disease potential at high doses. *Mutagenesis* 32:59-76.
- Ramesh A, Varghese SS, Doraiswamy J and Malaiappan S. 2014. Role of sulfiredoxin in systemic diseases influenced by oxidative stress. *Redox biology* 2:1023-1028.
- Relier C, Dubreuil M, Lozano Garcia O, Cordelli E, Mejia J, Eleuteri P, Robidel F, Loret T, Pacchierotti F, Lucas S, Lacroix G and Trouiller B. 2017. Study of TiO₂ P25 Nanoparticles Genotoxicity on Lung, Blood, and Liver Cells in Lung Overload and Non-Overload Conditions After Repeated Respiratory Exposure in Rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 156:527-537.
- Ren W, Iqbal MZ, Zeng L, Chen T, Pan Y, Zhao J, Yin H, Zhang L, Zhang J, Li A and Wu A. 2017. Black TiO₂ based core-shell nanocomposites as doxorubicin carriers for thermal imaging guided synergistic therapy of breast cancer. *Nanoscale* 9:11195-11204.
- Ricaud M and Witschger O. 2012. Les nanomatériaux. Définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention. ED 6050:48.
- Rickard AJ and Young MJ. 2009. Corticosteroid receptors, macrophages and cardiovascular disease. *Journal of molecular endocrinology* 42:449-459.
- Rihn B, Saliou C, Bottin MC, Keith G and Packer L. 2001. From ancient remedies to modern therapeutics: pine bark uses in skin disorders revisited. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 15:76-78.
- Rogers KR, Morris CJ and Blake DR. 1992. The cytoskeleton and its importance as a mediator of inflammation. *Annals of the rheumatic diseases* 51:565-571.
- Roursgaard M, Jensen KA, Poulsen SS, Jensen NE, Poulsen LK, Hammer M, Nielsen GD and Larsen ST. 2011. Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice. *TheScientificWorldJournal* 11:801-825.
- Russell WMS and Burch RL. (1959). The principles of humane experimental technique. *Journal* [Online] Available at: <http://books.google.com/books?id=j75qAAAAMAAJ>.
- Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, Mcneil SE, Howard PC, Doub WH and Buhse LF. 2010. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 115:156-166.

- Sagawa Y, Futakuchi M, Xu J, Fukamachi K, Sakai Y, Ikarashi Y, Nishimura T, Suzui M, Tsuda H and Morita A. 2012. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice. *The Journal of toxicological sciences* 37:317-327.
- Sager TM and Castranova V. 2009. Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: comparison to ultrafine titanium dioxide. *Particle and fibre toxicology* 6:15.
- Sager TM, Kommineni C and Castranova V. 2008. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Particle and fibre toxicology* 5:17.
- Sang X, Zheng L, Sun Q, Li N, Cui Y, Hu R, Gao G, Cheng Z, Cheng J, Gui S, Liu H, Zhang Z and Hong F. 2012. The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part A* 100:894-902.
- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB and Colvin VL. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 92:174-185.
- Scherer IJ, Holmes PV and Harris RB. 2011. The importance of corticosterone in mediating restraint-induced weight loss in rats. *Physiology & behavior* 102:225-233.
- Schins RP and Knaapen AM. 2007. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhalation toxicology* 19 Suppl 1:189-198.
- Schmaier AH. 2016. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 14:28-39.
- Senzui M, Tamura T, Miura K, Ikarashi Y, Watanabe Y and Fujii M. 2010. Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *The Journal of toxicological sciences* 35:107-113.
- Shah NB, Vercellotti GM, White JG, Fegan A, Wagner CR and Bischof JC. 2012. Blood–nanoparticle interactions and in vivo biodistribution: impact of surface PEG and ligand properties. *Molecular pharmaceutics* 9:2146-2155.
- Shaul PW. 2002. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annual review of physiology* 64:749-774.
- Shi H, Magaye R, Castranova V and Zhao J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology* 10:15.
- Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S and Dhawan A. 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25:231-241.
- Shyamasundar S, Ng CT, Yung LY, Dheen ST and Bay BH. 2015. Epigenetic mechanisms in nanomaterial-induced toxicity. *Epigenomics* 7:395-411.
- Siemiatycki J, Richardson L, Nadon L, Lakhani R, Begin D, Gerin M and Dewar R. (1991). Risk factors for cancer in the workplace.
- Smith JR. 2010. Bioinformatics and the eye. *Journal of ocular biology, diseases, and informatics* 2:161-163.
- Smolkova B, El Yamani N, Collins AR, Gutleb AC and Dusinska M. 2015. Nanoparticles in food. Epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 77:64-73.
- Snipes MB, Olson TR and Yeh HC. 1988. Deposition and retention patterns for 3-, 9-, and 15-micron latex microspheres inhaled by rats and guinea pigs. *Experimental lung research* 14:37-50.
- Snyder-Talkington BN, Dymacek J, Porter DW, Wolfarth MG, Mercer RR, Pacurari M, Denvir J, Castranova V, Qian Y and Guo NL. 2013. System-based identification of toxicity pathways associated with multi-walled carbon nanotube-induced pathological responses. *Toxicology and applied pharmacology* 272:476-489.
- Song B, Zhou T, Yang W, Liu J and Shao L. 2016. Contribution of oxidative stress to TiO₂ nanoparticle-induced toxicity. *Environmental toxicology and pharmacology* 48:130-140.
- Stapleton PA, Hathaway QA, Nichols CE, Abukabda AB, Pinti MV, Shepherd DL, McBride CR, Yi J, Castranova VC, Hollander JM and Nurkiewicz TR. 2018. Maternal engineered nanomaterial inhalation during gestation alters the fetal transcriptome. *Particle and fibre toxicology* 15:3.
- Stenback F, Rowland J and Sellakumar A. 1976. Carcinogenicity of Benzo(a)pyrene and dusts in the hamster lung (instilled intratracheally with titanium oxide, aluminum oxide, carbon and ferric oxide). *Oncology* 33:29-34.
- Stocco A, Karlsson HL, Coppede F and Migliore L. 2013. Epigenetic effects of nano-sized materials. *Toxicology* 313:3-14.
- Sturla SJ, Boobis AR, Fitzgerald RE, Hoeng J, Kavlock RJ, Schirmer K, Whelan M, Wilks MF and Peitsch MC. 2014. Systems toxicology: from basic research to risk assessment. *Chemical research in toxicology* 27:314-329.

- Sycheva LP, Zhurkov VS, Iurchenko VV, Daugel-Dauge NO, Kovalenko MA, Krivtsova EK and Durnev AD. 2011. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutation research* 726:8-14.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ and Von Mering C. 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* 43:D447-452.
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ and Von mering C. 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research* 45:D362-D368.
- Takeda K, Suzuki KI, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T and Sugamata M. 2009. Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems. *J Health Sci* 55:95-102.
- Tan MH, Commens CA, Burnett L and Snitch PJ. 1996. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *The Australasian journal of dermatology* 37:185-187.
- Taylor CF, Paton NW, Lilley KS, Binz PA, Julian RK, Jr., Jones AR, Zhu W, Apweiler R, Aebersold R, Deutsch EW, Dunn MJ, Heck AJ, Leitner A, Macht M, Mann M, Martens L, Neubert TA, Patterson SD, Ping P, Seymour SL, Souda P, Tsugita A, Vandekerckhove J, Vondriska TM, Whitelegge JP, Wilkins MR, Xenarios I, Yates JR, 3rd and Hermjakob H. 2007. The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nature biotechnology* 25:887-893.
- Tga. (2016). Literature Review on the safety of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens.
- Tilton SC, Karin NJ, Tolic A, Xie Y, Lai X, Hamilton RF, Jr., Waters KM, Holian A, Witzmann FA and Orr G. 2014. Three human cell types respond to multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanobelts with cell-specific transcriptomic and proteomic expression patterns. *Nanotoxicology* 8:533-548.
- Torrano AA, Pereira ÂS, Oliveira ON and Barros-Timmons A. 2013. Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC Langmuir monolayers as cell membrane models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 108:120-126.
- Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD and Donaldson K. 2000. Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence Of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhalation toxicology* 12:1113-1126.
- Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P and Schiestl RH. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer research* 69:8784-8789.
- Unnithan J, Rehman MU, Ahmad FJ and Samim M. 2011. Aqueous synthesis and concentration-dependent dermal toxicity of TiO₂ nanoparticles in Wistar rats. *Biological trace element research* 143:1682-1694.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abad U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR and Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 5:e1000639.
- Valverde JM and Castellanos A. 2007. Fluidization, bubbling and jamming of nanoparticle agglomerates. *Chemical Engineering Science* 62:6947-6956.
- Vanhoutte PM. 2003. Endothelial control of vasomotor function. *Circulation journal* 67:572-575.
- Veillenanos. Risques dioxyde de titane. Journal [Online] Available at: <http://veillenanos.fr/wakka.php?wiki=risquesndioxtitane>.
- Voelkerding KV, Dames S and Durtschi JD. 2010. Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 12:539-551.
- Vuong NQ, Goegan P, Mohotalage S, Breznan D, Ariganello M, Williams A, Elisma F, Karthikeyan S, Vincent R and Kumarathasan P. 2016. Proteomic changes in human lung epithelial cells (A549) in response to carbon black and titanium dioxide exposures. *Journal of proteomics* 149:53-63.
- Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z and Chen C. 2008. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* 254:82-90.
- Wang J and Maldonado MA. 2006. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cellular & molecular immunology* 3:255-261.
- Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y and Chai Z. 2007a. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology letters* 168:176-185.
- Wang JJ, Sanderson BJ and Wang H. 2007b. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation research* 628:99-106.

- Wang Y, Chen Z, Ba T, Pu J, Chen T, Song Y, Gu Y, Qian Q, Xu Y, Xiang K, Wang H and Jia G. 2013. Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Small* 9:1742-1752.
- Wang Z, Li N, Zhao J, White JC, Qu P and Xing B. 2012. CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chemical research in toxicology* 25:1512-1521.
- Wang Z, Tiruppathi C, Cho J, Minshall RD and Malik AB. 2011. Delivery of nanoparticle: complexed drugs across the vascular endothelial barrier via caveolae. *IUBMB life* 63:659-667.
- Ward PA and Grailer JJ. 2014. Acute lung injury and the role of histones. *Translational respiratory medicine* 2:1.
- Warheit DB. 2013. How to measure hazards/risks following exposures to nanoscale or pigment-grade titanium dioxide particles. *Toxicology letters* 220:193-204.
- Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR and Reed KL. 2005. Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 88:514-524.
- Warheit DB, Brown SC and Donner EM. 2015. Acute and subchronic oral toxicity studies in rats with nanoscale and pigment grade titanium dioxide particles. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 84:208-224.
- Warheit DB, Hansen JF, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr SI and Hartsky MA. 1997. Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *Toxicology and applied pharmacology* 145:10-22.
- Warheit DB, Hartsky MA and Frame SR. 1996a. Pulmonary effects in rats inhaling size-separated chrysotile asbestos fibres or p-aramid fibrils: differences in cellular proliferative responses. *Toxicology letters* 88:287-292.
- Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL and Sayes CM. 2007a. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology letters* 171:99-110.
- Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S and Sayes CM. 2007b. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230:90-104.
- Warheit DB, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr S and Hartsky MA. 1996b. Subchronic inhalation of high concentrations of low toxicity, low solubility particulates produces sustained pulmonary inflammation and cellular proliferation. *Toxicology letters* 88:249-253.
- Waters MD and Fostel JM. 2004. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nature reviews Genetics* 5:936-948.
- Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE and Warscheid B. 2007. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7:340-350.
- Williams AE and Chambers RC. 2014. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 306:L217-230.
- Wong J, Magun BE and Wood LJ. 2016. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 11:1391-1401.
- Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X and Zeng FD. 2009. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology letters* 191:1-8.
- Wu N, Wang J, Tafen De N, Wang H, Zheng JG, Lewis JP, Liu X, Leonard SS and Manivannan A. 2010. Shape-enhanced photocatalytic activity of single-crystalline anatase TiO₂ (101) nanobelts. *Journal of the American Chemical Society* 132:6679-6685.
- Wu Y. 2015. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thrombosis journal* 13:17.
- Xu J, Sagawa Y, Futakuchi M, Fukamachi K, Alexander DB, Furukawa F, Ikarashi Y, Uchino T, Nishimura T, Morita A, Suzui M and Tsuda H. 2011. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 49:1298-1302.
- Xu M, Han L, Yuan C, Mei Y, Zhang H, Chen S, Sun K and Zhu B. 2017. Role for Functional SOD2 Polymorphism in Pulmonary Arterial Hypertension in a Chinese Population. *International journal of environmental research and public health* 14.
- Xu T, Park SK, Venable JD, Wohlschlegel JA, Diedrich JK, Cociorva D, Lu B, Liao L, Hewel J, Han X, Wong CC, Fonslow B, Delahunty C, Gao Y, Shah H and Yates JR, 3rd. 2015. ProLuCID: An improved SEQUEST-like algorithm with enhanced sensitivity and specificity. *Journal of proteomics* 129:16-24.
- Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa

T, Yanagihara I, Saito S and Tsutsumi Y. 2011. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nature nanotechnology* 6:321-328.

Yameen B, Choi WI, Vilos C, Swami A, Shi J and Farokhzad OC. 2014. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 190:485-499.

Yang B, Wang Q, Lei R, Wu C, Shi C, Yuan Y, Wang Y, Luo Y, Hu Z, Ma H and Liao M. 2010. Systems toxicology used in nanotoxicology: mechanistic insights into the hepatotoxicity of nano-copper particles from toxicogenomics. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10:8527-8537.

Yu X, Hong F and Zhang YQ. 2016. Bio-effect of nanoparticles in the cardiovascular system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 104:2881-2897.

Zhang J, Zhou P, Liu J and Yu J. 2014. New understanding of the difference of photocatalytic activity among anatase, rutile and brookite TiO₂. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 16:20382-20386.

Zhang L, Wang M, Kang X, Boontheung P, Li N, Nel AE and Loo JA. 2009. Oxidative stress and asthma: proteome analysis of chitinase-like proteins and FIZZ1 in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of proteome research* 8:1631-1638.

Zhang S, Gao H and Bao G. 2015a. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS nano* 9:8655-8671.

Zhang WC, Zheng XJ, Du LJ, Sun JY, Shen ZX, Shi C, Sun S, Zhang Z, Chen XQ, Qin M, Liu X, Tao J, Jia L, Fan HY, Zhou B, Yu Y, Ying H, Hui L, Yi X, Zhang L and Duan SZ. 2015b. High salt primes a specific activation state of macrophages, M(Na). *Cell research* 25:893-910.

Annexes

ANNEXE 1 : Récapitulatif des études concernant la toxicité pulmonaire suite à l'inhalation/instillation de NPs de TiO₂ chez l'animal.

Références	Particules (taille)	Modèle animal	Conditions d'exposition	Paramètres évalués	Principaux résultats
Lee et al., 1985	TiO ₂ fin rutile MMAD 1,5-1,7 µm	rats mâles et femelles, Sprague Dawley (CrI : CD)	- inhalation corps entier - 6 h/jour, 5 jours/semaine, 2 ans - 0, 10, 50, ou 250 mg/m ³ (84% respirable, < 13 µm MMAD)	- clinique, poids des animaux et des poumons - inflammation (microscopie optique et électronique) - histologie (cavité nasale, trachée, poumon et alvéoles pulmonaires)	- pas de signes cliniques anormaux, ni de changements de poids corporel, ni de mortalité excessive par rapport aux témoins - 10 mg/m ³ : particules principalement phagocytées par les macrophages alvéolaires - 50 mg/m ³ : hyperplasie marquée des cellules du revêtement alvéolaire, agrégats de macrophages chargés de particules, débris cellulaires, protéinose et fibrose - 250 mg/m ³ : poids poumon doublé par rapport à celui des groupes de 10 mg/m ³ - augmentation dose-dépendante du nombre de particules dans les ganglions lymphatiques trachéobronchiques, cervicaux, le foie et la rate
Oberdorster et al., 1994	- TiO ₂ fin, anatase 250 nm - TiO ₂ ultrafin, anatase 20 nm	rats mâles fisher F344	- inhalation corps entier, pendant 12 semaines 6h/jour, 5 jours/semaine - environ 23 mg/m ³ - observations pendant l'exposition : 4, 8 et 12 semaines - observations post-exposition : 29 et 64 semaines	- charge pulmonaire (poumon, ganglions lymphatiques) - inflammation pulmonaire (LBA, protéines totales, activités enzymatiques) - réponses interstitielles et épithéliales (microscopie optique et électronique)	- dépôt similaire des 2 types de particules dans le tractus respiratoire inférieur - augmentation de la demi-vie d'élimination des particules (66 jours pour les animaux contrôles vs 117 jours pour les animaux exposés au TiO ₂ fin et 541 jours pour le TiO ₂ ultrafin) - effet pulmonaire plus important du TiO ₂ ultrafin comparé au TiO ₂ fin : translocation, rétention, inflammation (neutrophiles) et toxicité (prolifération cellules de type II, fibrose interstitielle légère) pulmonaire accrue - corrélation entre la surface des particules et les effets observés
Warheit et al., 1996	TiO ₂ , CI	rats mâles	- inhalation nez seul - 4 semaines - 5, 50, 250 mg/m ³ - observations : 0 jour, 1 semaine, 1, 3 et 6 mois post-exposition	- inflammation pulmonaire (LBA), - cytotoxicité (LDH), perméabilité membranaires (protéines LBA) - prolifération cellulaire (immunomarquage pulmonaire et voies aériennes (BrdU))	- 250 mg/m ³ : réponse inflammatoire pulmonaire persistante (augmentation nombre de neutrophiles, de l'activité LDH et des protéines dans LBA) - cytotoxicité et augmentation de la prolifération de cellules pulmonaires (marquage aux anticorps anti-BrdU) - développement de lésions pulmonaires
Bermudez et al., 2002	TiO ₂ rutile MMAD 1,40 µm	- souris femelles B3C3F1/CrIBR. - rats femelles CDF (F344)/CrIBR - hamsters femelles Lak : LVG (SYR) BR	- inhalation 13 semaines - 6h/jour, 5 jours/semaine - 10, 50 ou 250 mg/m ³ - observations 0, 4, 13, 26 et 52 semaines post-exposition (46 pour les hamsters)	- inflammation (LBA et histopathologie), prolifération cellulaire, histopathologie - cytotoxicité (LDH), perméabilité membranaire (protéines LBA) - charge pulmonaire	- inflammation plus sévère et persistante chez les rats ; 50 et 250 mg/m ³ : réponse inflammatoire chez les 3 espèces, surcharge pulmonaire (rats + hamsters) - 250 mg/m ³ : lésions pulmonaires plus sévères chez les rats (changements fibroprolifératifs et épithéliaux) - cytotoxicité (plus faible chez les hamsters) - diminution de la clairance des particules à haute concentration, clairance plus efficace chez les hamsters - résultats fonction de l'espèce (rats > souris > hamsters) et de la concentration en particules

Références	Particules (taille)	Modèle animal	Conditions d'exposition	Paramètres évalués	Principaux résultats
Bermudez et al., 2004	TiO ₂ (21 nm)	- souris femelles B3C3F1/CrIBR - rats femelles CDF (F344)/CrIBR - hamsters femelles Lak : LVG (SYR) BR	- inhalation 13 semaines - 6h/jour, 5 jours/semaine - 0,5 ; 2 ou 10 mg/m ³ - observations 4, 13, 26 et 52 semaines post-exposition (49 pour les hamsters)	- inflammation (LBA et histopathologie), - cytotoxicité (LDH), perméabilité membranaire (protéines LBA) - prolifération des cellules pulmonaires - charge pulmonaire (poumon, ganglions lymphatiques)	- inflammation pulmonaire (rats + souris, augmentation nombre de macrophages et neutrophiles) et surcharge pulmonaire (rats + souris) à 10 mg/m ³ - diminution de la clairance des particules, clairance plus efficace chez les hamsters, cytotoxicité (rats + souris, augmentation LDH et protéines totales) - augmentation dose-dépendante de la charge pulmonaire chez les 3 espèces, clairance plus efficace chez les hamsters - prolifération métaplasique focale, accumulation de particules interstitielles et fibrose alvéolaire progressive uniquement chez les rats à 10 mg/m ³ - résultats fonction de l'espèce (rats > souris > hamsters) et de la concentration en particules
Grassian et al., 2007	TiO ₂ (2-5 nm)	souris mâles C57BL/6	- inhalation corps entier - groupe 1 : 0,77 ou 7,22 mg/m ³ pendant 4h/jour, observations immédiates - groupe 2 : 8,88 mg/m ³ 4h/jour pendant 10 jours - observations 0, 1, 2 et 3 semaines post-exposition	- inflammation (cytologie du LBA, cytokines, protéines totales) - cytotoxicité (LDH) - histopathologie	- groupe 1 : inflammation et toxicité pulmonaires minimales (augmentation du nombre de macrophages dans le LBA à 7,22 mg/m ³) - groupe 2 : réponse inflammatoire modérée mais significative jusqu'à 2 semaines post-exposition, résolue en 3ème semaine (augmentation du nombre de macrophages jusqu'à 2 semaines post-exposition, présence de macrophages chargés de particules dans les alvéoles pulmonaires et le LBA)
Warheit et al., 2007	- TiO ₂ rutile 136 et 149 nm - TiO ₂ rutile 380 nm - TiO ₂ P25 129nm 80/20 anatase / rutile - Min-U-Sil	rats mâles CrI:CD®(SD)IGS BR	- instillation intratrachéale - 1 ou 5 mg/kg - observations 24h, 1 semaine, 1 et 3 mois post-exposition	- inflammation (LBA et cytokines) - cytotoxicité (LDH), perméabilité pulmonaire (protéines LBA) - activité sécrétoire des cellules épithéliales alvéolaires type II (PAL) - prolifération cellulaire - histopathologie	- TiO ₂ P25 (5 mg/kg) : inflammation pulmonaire, cytotoxicité, prolifération cellulaire, accumulation de macrophages chargés de particules, épaissement tissulaire occasionnel - TiO ₂ rutile : pas de cytotoxicité, ni d'augmentation de la perméabilité pulmonaire, ni de l'activité PAL, pas de modifications histopathologiques
Liu et al., 2009	NPs de TiO ₂ 5, 21 et 50 nm	rats mâles et femelles Sprague-Dawley	- instillation intratrachéale - 0,5 ; 5 ou 50 mg/kg	- poids animaux et poumons - inflammation pulmonaire (LBA et histopathologie) - cytotoxicité (LDH, PAL, phosphatase acide (PAC)) - capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires	- impact de la taille des particules et de la dose d'exposition sur la toxicité pulmonaire (relation dose-réponse) - TiO ₂ 5 nm : toxicité pulmonaire > TiO ₂ 21 et 50 nm, augmentation activité LDH et PAL à 50 mg/kg, diminution de la capacité de phagocytose des macrophages à 50 mg/kg - histopathologie : lésions inflammatoires doses-dépendantes, infiltration de cellules et épaissement interstitiel

Références	Particules (taille)	Modèle animal	Conditions d'exposition	Paramètres évalués	Principaux résultats
Ma-Hock et al., 2009	TiO ₂ 25.1 ± 8.2nm 14% rutile, 86% anatase surface hydrophobe	rats mâles Wistar CrI:WI (Han)	- inhalation tête-nez 5 jours, 6h/jour - 0 ; 2 ; 10 et 50 mg/m ³ - observations immédiatement, 3 et 16 jours post-exposition	- poids animaux et poumons - inflammation pulmonaire (cytologie du LBA, protéines totales, - activités enzymatiques (GGT, LDH, PAL, NAG) témoins de lésions pulmonaires) - histopathologie, prolifération cellulaire (incorporation de BrdU), apoptose - recherche de médiateurs cellulaires dans le LBA et le sérum (Haptoglobine, MIP-2, Myéloperoxydase, Ostéopontine...)	- augmentation du poids des poumons à 50 mg/m ³ (J0), présence de TiO ₂ dans ganglions lymphatiques médiastinaux - inflammation pulmonaire : augmentation dose dépendante du nombre total de cellules (neutrophiles), des protéines totales et des activités enzymatiques dans le LBA - augmentation de la prolifération cellulaires à toutes les doses (bronches moyennes et larges, bronchioles terminales) - histopathologie : légères modifications (histiocytose) 50 mg/m ³ : hypertrophie et hyperplasie de l'épithélium bronchique terminale - effets plus importants immédiatement et 3 jours post-exposition - effets pulmonaires comparables à ceux observés dans les études subchroniques (étude par inhalation à court terme prédictive des effets chroniques de NPS de TiO ₂ chez le rat)
Halappanavar et al., 2011	TiO ₂ 20 nm	souris femelles C57BL/6BomTac	- inhalation corps entier - 1h/jour pendant 11 jours - environ 42 mg/m ³ - observations 5 jours post-exposition	- inflammation pulmonaire (LBA) - niveau d'expression de gènes (poumon et foie) et de protéines (poumon)	- augmentation du niveau d'expression de gènes associés à l'inflammation et la réponse immunitaire, à la phase aiguë (Saa1 et 3, CC- et CXC-chimiokines, TNF) dans les poumons - augmentation du niveau d'expression de plusieurs miARN et du niveau d'expression de la protéine Saa3 dans les poumons - pas de modifications significatives de l'expression de gènes dans le foie
Roursgaard et al., 2011	- TiO ₂ rutile micrométrique - TiO ₂ rutile nanométrique 8 nm - TiO ₂ anatase nanométrique 10,4 nm - TiO ₂ amorphe	souris femelles BALB/cJ	- instillation intratrachéale unique - 0 ; 5 ; 50 et 500 µg - observations 24h et 3 mois post-exposition	- inflammation pulmonaire (LBA, protéines totales, niveau TNF-α et IL-6) - histopathologie pulmonaire	- Différents TiO ₂ : augmentation dose-dépendante des neutrophiles dans le LBA, histopathologie : peu d'inflammation - 24h post-exposition : TiO ₂ micrométrique rutile, nanométrique rutile et amorphe entraînent une augmentation des niveaux d'IL-6 et de protéines totales dans le LBA à 500 µg - 3 mois post-exposition : TiO ₂ nanométrique rutile et amorphe entraînent une augmentation dose-dépendante des macrophages dans le LBA - TiO ₂ rutilés micro et nanométrique : effets similaires - TiO ₂ nanométriques : forme rutile la plus inflammogène, forme amorphe entraîne le plus de lésions tissulaires en lien avec le niveau de protéines totales dans le LBA

Références	Particules (taille)	Modèle animal	Conditions d'exposition	Paramètres évalués	Principaux résultats
Halappanavar et al., 2015	- TiO ₂ rutile nanométriques 10 ; 20,6 ou 38 nm - TiO ₂ nanométriques inclus dans des peintures (12, 24 et 36% de TiO ₂)	souris femelles C57BL/6	- instillation intratrachéale unique - NPs de TiO ₂ libres : 18 ; 54 ou 162 mg - NPs de TiO ₂ présentes dans les peintures : 54 ; 162 ou 486mg - observations 1 et 28 jours post-exposition	- profil transcriptionnel pulmonaire - niveau d'expression de protéines inflammatoires pulmonaires - détection de particules dans les poumons	- modifications du niveau d'expression de gènes et protéines impliqués dans l'inflammation pulmonaire - intensité de la réponse dépend du type de particules (impact de la taille et surface spécifique), plus importante pour les particules libres - perturbations de voies métaboliques similaires entre les différents types de particules suggérant une implication de mécanismes d'actions similaires dans la réponse inflammatoire - présence des particules de TiO ₂ dans les poumons
Rahman et al., 2017	- TiO ₂ anatase 8 nm, hydrophile - TiO ₂ anatase 20 et 300 nm - TiO ₂ rutile / anatase 81,5:18,5 ; 22/40nm hydrophile - TiO ₂ rutile 20 nm, hydrophobe - TiO ₂ rutile 21 nm, hydrophile	souris C57BL/6	- instillation intratrachéale unique - 18 ; 54 ; 162 ou 486 µg - observations 1, 28 et 90 jours post-exposition	- inflammation pulmonaire (LBA) - histopathologie pulmonaire - analyse toxicogénomique	- inflammation pulmonaire (influx de neutrophiles dans le LBA) observée avec les différents types de NPs - NPs de type rutile : influx de neutrophiles plus marqué, nombre de gènes différentiellement exprimés plus important, modifications histopathologiques (lésions, fibrose) à 486 µg - NPs de type anatase : réponse maximale pour NP de 8 nm et minimale pour NP de 300 nm - intensité de la réponse pulmonaire dépend du type de particules (influence de la taille, de la forme cristalline et des modifications de surface) - mécanismes de toxicité sous-jacents (voies métaboliques et gènes modulés) similaires pour les différents types de particules

ANNEXE 2 : Morphologie, cytologie, histologie, fonction et structure de l'appareil respiratoire et régions utilisées dans le modèle dosimétrique de la Commission internationale de protection radiologique (CIPR, 1994).

Fonction	Cytologie (épithélium)	Histologie (parois)	Nombre de générations	Anatomie	Régions utilisées dans le modèle		Zones (air)	Localisation	Surface des voies respiratoires	Nombre de voies respiratoires	
					Nouveau	Ancien*					
Conditionnement de l'air; température, humidité, épuration; clairance rapide des particules; conduction de l'air	Epithélium respiratoire avec cellules calciformes Types cellulaires: ● Cellules ciliées ● Cellules non ciliées: – cellules calciformes – cellules à mucus (sécrétantes) – cellules séreuses – cellules à bordure en brosse – cellules endocrines – cellules basales – cellules intermédiaires	Membrane muqueuse, épithélium respiratoire (pseudostratifié, cilié, muqueux), glandes		Voies nasales antérieures	ET ₁		Conditionnement	Extrathoracique	2 x 10 ⁻³ m ²	—	
		Membrane muqueuse, épithélium respiratoire ou stratifié, glandes		Nez	ET ₂	LNT			(N-P)	4,5 x 10 ⁻² m ²	—
		Membrane muqueuse, épithélium respiratoire, anneaux cartilagineux, glandes	0	Trachée	BB					3 x 10 ⁻² m ²	511
		Membrane muqueuse, épithélium respiratoire, plaques cartilagineuses, couche musculaire lisse, glandes	1	Grosses bronches							
Conditionnement de l'air; échanges gazeux; clairance lente des particules	Epithélium respiratoire avec cellules claires (différentes des cellules en gobelet) Types cellulaires: ● Cellules ciliées ● Cellules non ciliées: – cellules claires (non sécrétantes)	Membrane muqueuse, épithélium respiratoire, pas de cartilage, pas de glandes, couche musculaire lisse	9 - 14	Bronchiales	bb		Conduction	Thoracique	0,175 x 10 ⁻³ m ³ (espace mort anatomique)	2,6 x 10 ⁻⁴ m ²	6,5 x 10 ⁴
		Membrane muqueuse, épithélium respiratoire monostratifié, moins cilié, couche musculaire lisse	15	Bronchiales terminales							
Echanges gazeux; clairance très lente des particules	Epithélium respiratoire composé essentiellement de cellules claires (sécrétantes) et de quelques cellules ciliées Cellules épithéliales alvéolaires squameuses (type I) couvrant 93% de la surface alvéolaire Cellules épithéliales alvéolaires cuboïdes (type II), productrices de surfactant, couvrant 7% de la surface alvéolaire Macrophages alvéolaires	Membrane muqueuse, épithélium respiratoire monostratifié, couche épithéliale squameuse, surfactant	16 - 18	Bronchiales respiratoires	AI		Zone d'échanges gazeux	Pulmonaire	0,2 x 10 ⁻³ m ³	7,5 m ²	4,6 x 10 ³
		Paroi formée d'anneaux d'entrée alvéolaire, couche de cellules épithéliales squameuses, surfactant	**	Canoux alvéolaires					4,5 x 10 ⁻³ m ³	140 m ²	4,5 x 10 ⁷
		Septa interalvéolaires recouverts d'un épithélium squameux contenant des capillaires, surfactant	**	Sac alvéolaires							
				Vaisseaux lymphatiques		L					

* Précédent modèle de la CIPR.

** Non dénombré en raison d'informations imprécises.

1 Les ganglions lymphatiques sont situés uniquement dans la région BB, mais drainent les régions interstitielles bronchique et alvéolaire, ainsi que la région bronchique.

ANNEXE 3 : Justification de l'exposition des rats à un aérosol nanostructuré de 10 mg/m³.

Aux Etats-Unis, le NIOSH a proposé en 2011 une VLEP pondérée sur 10h par jour et 40h par semaine de **0,3 mg/m³** pour le TiO₂ ultrafin (NIOSH, 2011).

En estimant une durée moyenne de vie au travail de 40 ans, avec environ 45 semaines travaillées par an, et 40h de travail par semaine, ceci correspond à un total de 4 320 000 minutes travaillées.

Concernant certains paramètres respiratoires chez l'Homme :

- La fréquence respiratoire (Fr) représente la rapidité de respiration. Elle comprend environ 12 à 20 cycles.
- Le volume courant VC (également appelé volume tidal) représente l'amplitude de respiration, c'est à dire le volume d'air inspiré ou expiré à chaque mouvement respiratoire. Au repos, le volume courant moyen est de 500 ml.
- Ainsi le débit ventilatoire au repos est d'environ 6 à 10 L/min (= Fr x VC)

En prenant la valeur par défaut du modèle MPPD de 7,5 L/min, le **volume respiré tout au long de la carrière** d'un Homme serait de : 4 320 000 min x 7,5 L / min soit 32 400 000 L ou **32 400 m³**.

Ainsi, la quantité de TiO₂ respirée au cours de la carrière d'un Homme serait de : 32 400 m³ x 0,3 mg/m³ soit **9720 mg**. En supposant que 10 % de la quantité respirée soit déposée dans les poumons chez l'Homme (modèle de la CIPR, 1994), cela correspondrait à une quantité déposée de **972 mg**.

Cette quantité peut ensuite être normalisée par différents paramètres :

- Normalisation par poids corporel :

En estimant le poids moyen d'un Homme à **70 kg** et une quantité déposée de **972 mg** (au cours de sa carrière),

Pour un rat de poids moyen de **0,3 kg**, cela correspond à une quantité déposée de **4,2 mg** sur 1 mois (durée de notre exposition).

- Normalisation par masse de poumon :

En estimant la masse moyenne d'un poumon humain à **700 g** et une quantité déposée de **972 mg** (au cours de sa carrière),

Pour un rat dont la masse moyenne du poumon est de **1,2 g**, cela correspond à une quantité déposée au niveau pulmonaire de **1,7 mg** sur 1 mois (durée de notre exposition).

- Normalisation par surface alvéolaire :

En estimant la surface alvéolaire totale moyenne des poumons chez l'Homme à **102 m²** et une quantité déposée de **972 mg** (au cours de sa carrière),

Pour un rat dont la surface alvéolaire totale moyenne est de **0,4 m²**, cela correspond à une quantité déposée au niveau alvéolaire de **3,8 mg** sur 1 mois (durée de notre exposition).

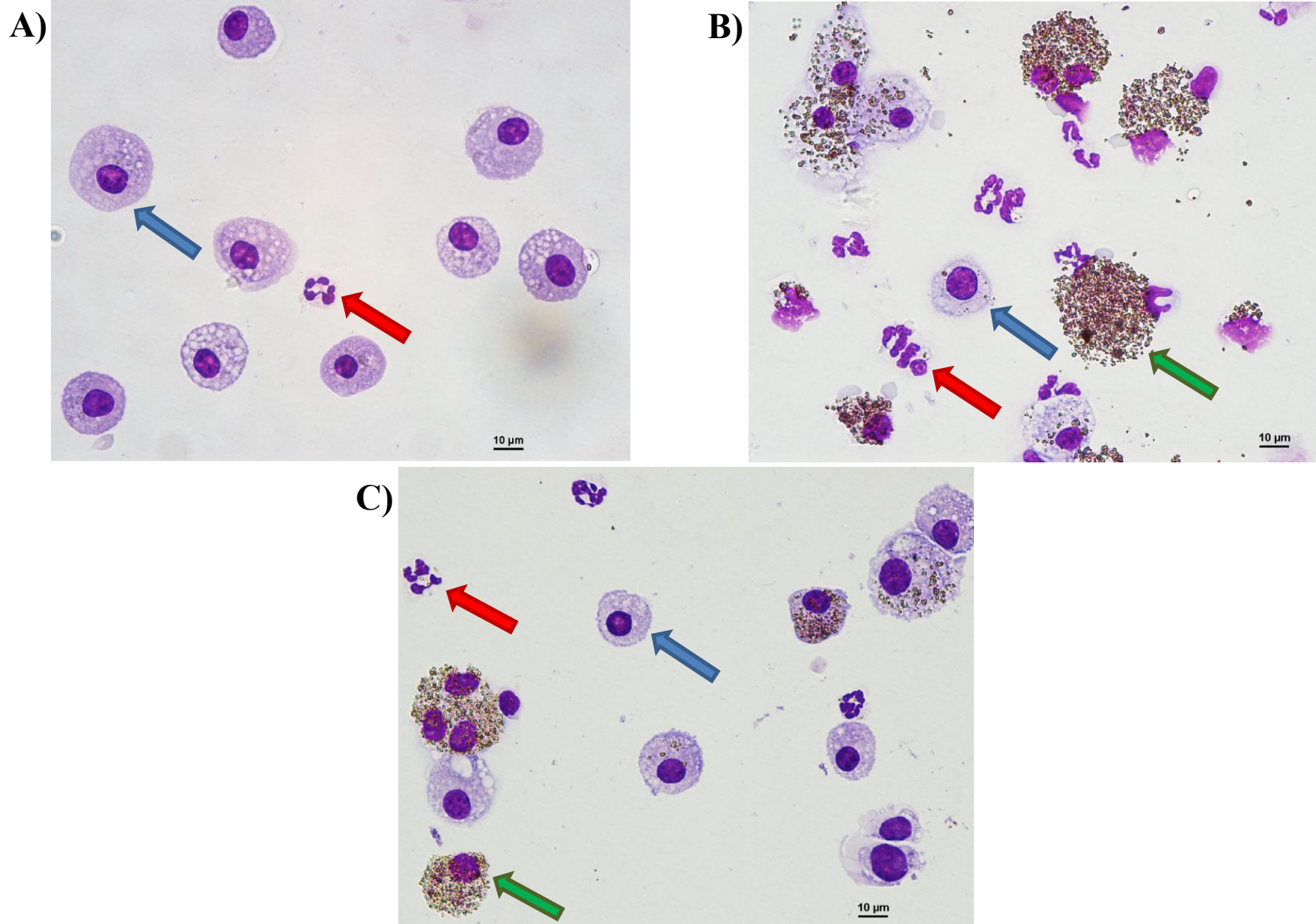
Détermination de la concentration en aérosol de TiO₂ à utiliser par inhalation chez le rat :

En estimant le débit ventilatoire d'un rat d'environ 300 g à **241 ml/min** (Hsieh, 1999) ; le volume respiré sur 1 mois (6 h par jour, 5 jours par semaine, pendant 4 semaines) est de 1735,2 L soit environ **1,7 m³**.

Ainsi la concentration en aérosol (mg/m³) :

- a été estimée à 9,6 mg/m³ (environ **10 mg/m³**) en supposant **10 % de dépôt** chez le rat et en tenant compte de la normalisation par masse de poumon :
En effet, la quantité déposée au niveau pulmonaire est estimée à **1,7 mg sur 1 mois**. Elle correspond à une quantité respirée sur 1 mois de 17 mg (si 10 % de dépôt) pour un volume de 1,7 m³.
- a également été estimée à 11 mg/m³ (environ **10 mg/m³**) en se basant sur **20 % de dépôt** chez le rat et une normalisation par surface alvéolaire :
En effet, la quantité déposée au niveau alvéolaire est estimée à **3,8 mg sur 1 mois**. Elle correspond à une quantité respirée sur 1 mois de 5 x 3,8 soit 19 mg (si 20 % de dépôt) pour un volume de 1,7 m³.

ANNEXE 4 : Aspect cytologique du LBA (microscopie optique) : A) chez des rats témoins, chez des rats exposés à un aérosol nanostructuré de TiO₂ B) immédiatement et C) 180 jours post-exposition. Les flèches rouges indiquent la présence de granulocytes neutrophiles, les flèches bleues celle de macrophages et enfin les flèches vertes, celle de macrophages chargés en particules.



ANNEXE 5 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les poumons de rats suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, qui sont impliqués dans le processus biologique « inflammatory response » (GO:0006954).

Agilent Probe ID	Gene symbol	Gene Name	Day 0		Day 3		Day 28		Day 90		Day 180	
			Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value
A_42_P473398	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	3,33	0,993	2,78	0,991	0,98	0,410	0,51	0,004	0,95	0,279
A_42_P527724	Fcnb	Ficolin B	2,88	0,993	1,23	0,896	1,06	0,730	1,03	0,602	1,12	0,865
A_42_P693316	Cfi	Complement factor I	3,97	0,993	3,24	0,992	2,19	0,995	1,59	0,996	1,42	0,994
A_42_P695401	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	5,62	0,993	4,16	0,992	1,42	0,983	0,66	0,005	1,46	0,993
A_42_P714311	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	1,89	0,991	1,26	0,943	1,42	0,986	0,85	0,037	0,98	0,343
A_42_P735417	Fcgr2b	Fc fragment of IgG receptor IIb	2,25	0,992	2,20	0,991	1,45	0,988	1,13	0,919	1,09	0,815
A_43_P10051	Saa4	Serum amyloid A4, Constitutive	1,54	0,985	1,92	0,990	1,28	0,975	1,10	0,891	1,18	0,961
A_43_P11443	C4bpa	Complement component 4 binding protein alpha	3,17	0,993	2,42	0,992	1,60	0,993	1,25	0,991	1,28	0,989
A_43_P11464	Fgg	Fibrinogen gamma chain	1,97	0,992	2,02	0,991	1,10	0,837	0,94	0,225	0,98	0,375
A_43_P11985	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	2,28	0,993	1,55	0,983	0,96	0,363	0,83	0,023	0,78	0,016
A_44_P1022002	Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	5,03	0,993	5,67	0,992	1,64	0,992	0,81	0,024	1,68	0,995
A_44_P1023538	C3	Complement component 3	2,63	0,993	2,47	0,992	1,99	0,994	1,44	0,995	1,32	0,990
A_44_P1039128	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1,92	0,990	5,07	0,992	1,48	0,990	0,93	0,212	1,14	0,866
A_44_P1055780	S100a8	S100 calcium binding protein A8	2,71	0,993	3,02	0,992	1,30	0,973	1,13	0,921	1,16	0,936
A_44_P146845	Orm1	Orosomuroid 1	7,14	0,993	6,76	0,993	6,58	0,995	3,24	0,997	3,75	0,996
A_44_P208138	F2	Coagulation factor II, Thrombin	1,73	0,991	1,18	0,899	1,25	0,970	1,14	0,906	1,24	0,985
A_44_P228059	Mbl1	Mannose binding lectin 1	1,76	0,991	1,38	0,977	1,12	0,867	1,03	0,608	1,11	0,906
A_44_P274130	C9	Complement component 9	2,35	0,993	1,40	0,971	1,32	0,981	1,26	0,986	1,33	0,984
A_44_P291264	Sele	Selectin E	2,40	0,993	1,39	0,971	1,07	0,759	1,11	0,858	1,28	0,988
A_44_P348781	Kng1	Kininogen 1	4,01	0,993	5,08	0,992	5,08	0,995	3,06	0,997	3,40	0,996
A_44_P469584	Cd14	CD14 molecule	1,89	0,991	1,80	0,990	1,07	0,757	0,91	0,117	0,98	0,350
A_44_P491796	Spp1	Secreted phosphoprotein 1	4,91	0,993	5,92	0,992	3,61	0,995	2,52	0,997	3,88	0,996
A_64_P005162	Adora3	Adenosine A3 receptor	2,03	0,992	2,08	0,991	1,28	0,966	1,08	0,869	1,10	0,870
A_64_P007633	C4bpb	Complement component 4 binding protein beta	1,75	0,991	1,63	0,985	1,11	0,752	1,20	0,972	1,17	0,960
A_64_P009996	Tac1	Tachykinin Precursor 1	0,61	0,010	0,47	0,008	0,70	0,012	0,86	0,073	0,93	0,182
A_64_P009999	Tac1	Tachykinin Precursor 1	0,42	0,007	0,30	0,007	0,67	0,009	0,81	0,061	0,95	0,241
A_64_P013758	Hp	Haptoglobin	2,86	0,993	2,44	0,991	1,90	0,994	1,50	0,995	1,39	0,994
A_64_P016978	Ccl11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	0,88	0,245	0,60	0,009	1,12	0,880	0,93	0,181	1,05	0,661
A_64_P034414	Tnf	Tumor necrosis factor	3,61	0,993	2,54	0,992	1,43	0,979	0,61	0,004	1,15	0,943
A_64_P052017	Cxcl3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	3,93	0,993	3,57	0,992	0,74	0,017	0,54	0,004	0,90	0,117
A_64_P062618	Chst1	Carbohydrate sulfotransferase 1	2,37	0,993	1,38	0,978	1,65	0,993	1,34	0,993	1,61	0,995
A_64_P093899	Elf3	E74 like ETS transcription factor 3	2,18	0,992	2,02	0,990	1,13	0,859	0,94	0,216	1,05	0,695
A_64_P137063	Kng1l1	Kininogen 1-like 1	2,96	0,993	3,72	0,992	3,86	0,995	2,70	0,997	2,66	0,996
A_64_P140437	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3,72	0,993	2,89	0,992	2,15	0,995	0,52	0,004	1,33	0,987
A_64_P157743	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	2,30	0,993	1,54	0,984	1,01	0,536	0,84	0,027	0,79	0,015
A_64_P166514	Selp	Selectin P	2,62	0,993	1,52	0,978	0,97	0,382	0,95	0,262	0,93	0,245

ANNEXE 6 : Voies biologiques KEGG significativement enrichies dans les poumons de rats exposés à un aérosol nanostructuré de TiO₂, immédiatement, 3, 28, 90 et 180 jours post-exposition (p < 0,05).

KEGG Pathways	Number of genes	P-value	Genes
Day 0			
Cell cycle	13	7.992410696584177E-6	TTK, ESPL1, PTTG1, MCM5, CCNB1, CCNE1, MAD2L1, CCNB2, PLK1, GADD45G, BUB1, BUB1B, CCNA2
Complement and coagulation cascades	10	1.0199598292445844E-5	KNG1, PLAT, MBL1, FGG, C9, C3, F2, C4BPB, C4BPA, CFI
Chemokine signaling pathway	14	3.8234343606300476E-5	CCL1, CXCL1, CCL3, CCL2, CXCL2, CCL9, CX3CL1, CXCL11, CCL7, CCL17, CXCL10, CCL12, CCL22, CCL20
Cytokine-cytokine receptor interaction	13	6.16658143010057E-4	IL1R2, CCL3, CCL2, TNF, CXCL2, TNFRSF17, CX3CL1, CXCL11, CXCL10, TNFRSF9, CCL22, TNFRSF11A, LTB
NOD-like receptor signaling pathway	7	0.001529864055209581	CXCL1, CCL12, TNF, CCL2, CXCL2, BIRC3, CCL7
Oocyte meiosis	8	0.007237161165185485	CCNB1, CCNE1, MAD2L1, CCNB2, PLK1, BUB1, ESPL1, PTTG1
Toll-like receptor signaling pathway	7	0.009781256922069746	CCL3, TNF, TLR2, CXCL11, CD14, SPP1, CXCL10
Circadian rhythm	3	0.02777014700342447	NR1D1, ARNTL, BHLHE41
Progesterone-mediated oocyte maturation	6	0.031783246265965834	CCNB1, MAD2L1, CCNB2, PLK1, BUB1, CCNA2
P53 signaling pathway	5	0.044989146315619254	CCNB1, CCNE1, CCNB2, RRM2, GADD45G
Day 3			
Chemokine signaling pathway	12	3.966699436145615E-6	CCL1, CCL11, CXCL1, CCL12, CCL22, CCL2, CXCL2, CX3CL1, CXCL11, CCL7, CXCL10, CCL17
Circadian rhythm	5	1.1702357868187435E-5	NPAS2, NR1D1, PER2, ARNTL, PER3
NOD-like receptor signaling pathway	7	7.876673872813935E-5	CCL11, CXCL1, CCL12, TNF, CCL2, CXCL2, CCL7
Complement and coagulation cascades	6	0.0013179314343785982	KNG1, FGG, C3, SERPINE1, C4BPA, CFI
Cytokine-cytokine receptor interaction	9	0.002049162464886755	IL1R2, CCL22, TNF, CCL2, CXCL2, CX3CL1, TNFSF9, CXCL11, CXCL10
Day 28			
Circadian rhythm	7	3.6426027305333013E-10	NPAS2, NR1D1, PER2, ARNTL, PER3, BHLHE41, CRY1
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3	0.01629779266565033	SCD1, LOC681458, ACOT1, SCD4
Complement and coagulation cascades	4	0.019441426261391927	KNG1, C3, C4BPA, CFI
Day 90			
Circadian rhythm	6	7.618237306340586E-9	NPAS2, NR1D1, PER2, ARNTL, PER3, CRY1
NOD-like receptor signaling pathway	5	4.960102740706445E-4	CXCL1, CCL12, TNF, CCL2, CXCL2
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3	0.009114740989577126	SCD1, LOC681458, ACOT1, SCD4
Day 180			
Circadian rhythm	6	1.1777184317605898E-9	NPAS2, NR1D1, PER2, ARNTL, PER3, CRY1
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3	0.004603031677261914	SCD1, LOC681458, ACOT1, SCD4

ANNEXE 7 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les poumons de rats suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, qui sont impliqués dans le processus biologique « blood circulation » (G0:0008015).

Agilent Probe ID	Gene symbol	Gene Name	Day 0		Day 3		Day 28		Day 90		Day 180	
			Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value
A_44_P348781	Kng1	Kininogen 1	4,01	0,993	5,08	0,992	5,08	0,995	3,06	0,997	3,40	0,996
A_64_P018781	Calcb	Calcitonin Related Polypeptide beta	2,23	0,992	1,63	0,988	1,20	0,949	1,11	0,895	1,06	0,789
A_64_P137063	Kng1l1	Kininogen 1-like 1	2,96	0,993	3,72	0,992	3,86	0,995	2,70	0,997	2,66	0,996
A_64_P009999	Tac1	Tachykinin Precursor 1	0,42	0,007	0,30	0,007	0,67	0,009	0,81	0,061	0,95	0,241
A_64_P009996	Tac1	Tachykinin Precursor 1	0,61	0,010	0,47	0,008	0,70	0,012	0,86	0,073	0,93	0,182
A_64_P103537	Cftr	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	1,78	0,991	1,48	0,981	1,21	0,951	1,03	0,715	0,91	0,115
A_44_P198620	Nos3	Nitric oxide synthase 3	0,57	0,009	0,86	0,118	0,82	0,040	0,83	0,021	0,92	0,150
A_64_P036616	Npr3	Natriuretic peptide receptor 3	0,46	0,007	0,82	0,095	0,48	0,005	0,47	0,004	0,43	0,004
A_64_P110103	Sod2	Superoxide dismutase 2	2,82	0,993	1,65	0,988	1,13	0,881	0,94	0,223	1,00	0,456
A_64_P138216	Gch1	GTP cyclohydrolase 1	2,11	0,992	1,93	0,990	1,07	0,755	0,94	0,228	0,98	0,355
A_64_P011779	Sult1a1	Sulfotransferase family 1A member 1	0,80	0,070	0,58	0,009	0,96	0,372	1,10	0,886	1,20	0,975
A_43_P12580	Scnn1a	Sodium channel epithelial 1 alpha subunit	0,67	0,017	0,56	0,009	0,99	0,439	1,05	0,717	1,10	0,877

ANNEXE 8 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les poumons de rats suite à l'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂, qui sont impliqués dans le processus biologique « oxidation reduction » (GO:0055114).

Agilent Probe ID	Gene symbol	Gene Name	Day 0		Day 3		Day 28		Day 90		Day 180	
			Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value	Fold change	f-value
A_42_P822588	Alox15	Arachidonate 15-Lipoxygenase	0,52	0,008	0,54	0,008	0,73	0,015	1,01	0,567	0,88	0,058
A_44_P412710	Adhfe1	Alcohol dehydrogenase, iron containing 1	0,58	0,009	0,70	0,015	1,03	0,663	1,09	0,820	1,16	0,957
A_64_P055684	Itgb8	Integrin subunit beta 8	1,71	0,990	1,50	0,984	0,96	0,365	1,03	0,637	0,92	0,223
A_64_P104009	Rrm2	Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2	3,70	0,993	1,54	0,986	1,34	0,979	1,09	0,826	1,23	0,978
A_64_P113802	Rrm2		2,18	0,992	1,49	0,983	1,36	0,979	1,13	0,943	1,17	0,966
A_42_P678870	Cyp2f4	Cytochrome P450 family 2 subfamily F member 1	0,59	0,009	0,78	0,042	1,08	0,796	1,25	0,984	1,12	0,910
A_44_P358194	Fmo3	Flavin containing monooxygenase 3	0,54	0,008	0,44	0,008	0,89	0,145	0,95	0,261	1,03	0,617
A_64_P123078	Phgdh	Phosphoglycerate dehydrogenase	1,81	0,991	1,45	0,982	1,38	0,986	1,17	0,971	1,06	0,769
A_64_P086118	Duox1	Dual oxidase 1	1,92	0,992	2,04	0,991	1,69	0,993	1,36	0,994	1,25	0,984
A_44_P198620	Nos3	Nitric Oxide Synthase 3	0,57	0,009	0,86	0,118	0,82	0,040	0,83	0,021	0,92	0,150
A_44_P258855	Qsox1	Quiescin sulfhydryl oxidase 1	1,72	0,990	1,49	0,984	1,41	0,987	1,23	0,982	1,16	0,958
A_42_P842833	Srxn1	Sulfiredoxin 1	2,16	0,992	1,65	0,988	1,31	0,977	1,20	0,974	1,09	0,859
A_44_P375502	Degs2	Delta 4-desaturase, sphingolipid 2	2,06	0,992	2,24	0,991	1,30	0,978	1,03	0,616	1,09	0,821
A_44_P360486	Cyp4b1	Cytochrome P450 family 4 subfamily B member 1	0,59	0,009	1,02	0,525	0,64	0,007	0,65	0,004	0,68	0,006
A_64_P110103	Sod2	Superoxide dismutase 2	2,82	0,993	1,65	0,988	1,13	0,881	0,94	0,223	1,00	0,456
A_64_P067659	Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1	0,71	0,014	0,60	0,009	0,82	0,038	0,91	0,096	0,90	0,094
A_64_P091088	Fmo2	Flavin containing monooxygenase 2	0,70	0,017	0,42	0,008	0,64	0,008	0,92	0,144	0,95	0,220
A_44_P486312	Fmo2		0,65	0,013	0,49	0,008	0,69	0,010	0,92	0,151	1,00	0,496
A_64_P033795	Hgd	Homogentisate 1,2-dioxygenase	1,14	0,799	2,12	0,991	1,07	0,705	1,04	0,739	1,01	0,511
A_44_P409232	Cyp2e1	Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	0,59	0,011	0,60	0,010	1,30	0,957	1,51	0,995	1,45	0,994
A_64_P085530	Scd1	Stearoyl-CoA desaturase	0,63	0,011	1,43	0,982	0,31	0,005	0,38	0,003	0,36	0,004
A_64_P154537	LOC681458	similar to stearoyl-coenzyme A desaturase 3	0,79	0,060	1,64	0,988	0,45	0,005	0,44	0,003	0,39	0,004
A_44_P536613	Ch25h	Cholesterol 25-hydroxylase	1,72	0,988	1,05	0,630	1,68	0,992	1,09	0,883	0,70	0,008
A_64_P091935	Scd4	Stearoyl-CoA Desaturase 4	0,89	0,166	1,46	0,981	0,47	0,005	0,52	0,004	0,45	0,004
A_64_P157313	Grhpr	Glyoxylate and hydroxypyruvate reductase	1,07	0,753	1,16	0,889	1,54	0,993	1,49	0,996	1,26	0,986

ANNEXE 9 : Publication en tant que premier auteur acceptée dans la revue « Toxicology and Applied Pharmacology ».

Toxicology and Applied Pharmacology 356 (2018) 54–64



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap



Short- and long-term gene expression profiles induced by inhaled TiO₂ nanostructured aerosol in rat lung



Laëtitia Chézeau^{a,b}, Sylvie Sébillaud^a, Ramia Safar^b, Carole Seidel^a, Doulaye Dembélé^c, Mylène Lorcin^a, Cristina Langlais^a, Stéphane Grossmann^a, Hervé Nunge^a, Sylvie Michaux^a, Hélène Dubois-Pot-Schneider^d, Bertrand Rihn^e, Olivier Joubert^e, Stéphane Binet^a, Frédéric Cosnier^a, Laurent Gaté^{a,*}

^a Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre, Cedex, France

^b EA 3452 CITHEFOR, Université de Lorraine, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

^c Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104 - Inserm U 964, Université de Strasbourg, BP 10142, F-67404 Illkirch, Cedex, France

^d CNRS, UMR 7565, SRSMC, Université de Lorraine, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^e Institut Jean-Lamour, UMR 7198 CNRS, Université de Lorraine, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Titanium dioxide
Lung inflammation
Gene expression profile
Short- and long-term response

ABSTRACT

The number of workers potentially exposed to nanoparticles (NPs) during industrial processes is increasing, although the toxicological properties of these compounds still need to be fully characterized. As NPs may be aerosolized during industrial processes, inhalation represents their main route of occupational exposure. Here, the short- and long-term pulmonary toxicological properties of titanium dioxide were studied, using conventional and molecular toxicological approaches. Fischer 344 rats were exposed to 10 mg/m³ of a TiO₂ nanostructured aerosol (NSA) by nose-only inhalation for 6 h/day, 5 days/week for 4 weeks. Lung samples were collected up to 180 post-exposure days. Biochemical and cytological analyses of bronchoalveolar lavage (BAL) showed a strong inflammatory response up to 3 post-exposure days, which decreased overtime. In addition, gene expression profiling revealed overexpression of genes involved in inflammation that was maintained 6 months after the end of exposure (long-term response). Genes involved in oxidative stress and vascular changes were also up-regulated. Long-term response was characterized by persistent altered expression of a number of genes up to 180 post-exposure days, despite the absence of significant histopathological changes. The physiopathological consequences of these changes are not fully understood, but they should raise concerns about the long-term pulmonary effects of inhaled biopersistent NPs such as TiO₂.

1. Introduction

Due to the growing use of nanomaterials in various industrial processes, the number of workers potentially exposed is increasing even though the toxicological properties of these compounds are not completely known. Since NPs may become aerosolized, inhalation represents the main route of occupational exposure, and the first tissues to be exposed are therefore those of the respiratory system. Consequently, toxicological studies involving inhalation in animals appear to be the most relevant to assess the early risks associated with exposure to nanostructured aerosols.

Titanium dioxide (TiO₂) is among the most widely produced nanomaterials worldwide. TiO₂ nanoparticles (NPs) are used in coatings, paints, self-cleaning windows, food products, toothpaste,

pharmaceuticals, and cosmetics including sunscreens (Shi et al., 2013).

TiO₂ is considered to be a poorly soluble particle of low toxicity (ECETOC, 2013; Shi et al., 2013). This is partly based on several studies that have been published on the pulmonary toxicity of inhaled TiO₂ NPs, mainly focusing on the inflammatory response and histopathological changes (Perin et al., 1992; Oberdorster et al., 2000; Bermudez et al., 2004; Shi et al., 2013). However, such conventional toxicological approaches cannot elucidate or identify the underlying molecular mechanisms of nanomaterials' toxicity. Thus, alternative complementary strategies such as toxicogenomics are of great value (Halappanavar et al., 2011; Sturla et al., 2014; Halappanavar et al., 2015; Costa and Fadeel, 2016). This approach involves the application of high content screening "omics-technologies", such as transcriptomics, proteomics, metabolomics, epigenomics (Nuwaysir et al., 1999; Gao et al., 2011;

* Corresponding author.

E-mail address: laurent.gate@inrs.fr (L. Gaté).

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.07.013>

Received 20 April 2018; Received in revised form 10 July 2018; Accepted 12 July 2018
0041-008X/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANNEXE 10 : Publication en tant que premier auteur en soumission.

Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in rat exposed to TiO₂ nanostructured aerosol by inhalation

Laëtitia Chézeau^{1,2}, Lori A. Kohlstaedt³, Bertrand Rihn^{2,4}, Frédéric Cosnier¹, Laurent Gaté^{1*}

¹ Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandœuvre Cedex, France

² EA 3452 CITHEFOR, Université de Lorraine, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

³ Institute for Quantitative Biosciences, University of California, Berkeley CA 94720

⁴ Institut Jean-Lamour, UMR 7198 CNRS, Université de Lorraine, 54506 – Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

*Corresponding author: laurent.gate@inrs.fr – Tel: +33 (0)3 83 50 85 04

Abstract

The number of workers potentially exposed to nanoparticles during their use is increasing, although the toxicological properties of these compounds still need to be fully characterized. As NPs may get aerosolized, inhalation represents their main route of occupational exposure. Here, the pulmonary toxicological properties of inhaled titanium dioxide were studied using bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology and proteomics analyses. Fischer 344 rats were exposed to 10 mg/m³ of TiO₂ nanostructured aerosol by nose-only inhalation for 6h/day, 5 days/week over 4 weeks. Lung samples were collected up to 180 post-exposure days. Cytological analyses of BALF showed a strong inflammatory response up to 3 post-exposure days, which persisted, however, at lower intensity up to 180 days. In addition, using Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT), we identified a total of 107, 50 and 45 proteins (UniprotKB identifiers) differentially expressed in exposed rats immediately, 3 and 180 days after the end of exposure respectively. The analysis of 29 cytokines and chemokines in BALF, also highlighted the deregulation of the expression of some of them up to 180 days. Increased levels of inflammatory proteins, members of proteasome, various histones, proteins involved in cytoskeleton organization, were noticed up to 3 days (short-term response). Long term-response was characterized by persistent altered expression of proteins up to 180 days, related to persistent inflammatory response. Altogether, these results suggest that exposure to low toxicity low solubility nanomaterials such as TiO₂ may induce long-term changes in the pulmonary protein expression pattern of which the physio-pathological consequences are unknown.

Abbreviations: BALF, bronchoalveolar lavage fluid; DAVID, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; d0, d3 and d180, immediately, 3 and 180 post-exposure days respectively; EBC, exhaled breath condensate; EMMS, Electro-Medical Measurement System; GO BP, gene ontology biological processes; IARC, International Agency for Research on Cancer; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MudPIT, Multidimensional Protein Identification Technology; NPs, nanoparticles; OECD, Organization for Economic Co-operation and Development; PBS, phosphate buffered saline; ROS, reactive oxygen species; TiO₂, titanium dioxide

Etude au niveau pulmonaire du profil d'expression de gènes et de protéines chez le rat exposé par inhalation à un aérosol nanostructuré de TiO₂.

En raison de l'utilisation croissante de nanomatériaux dans divers procédés industriels, le nombre de salariés potentiellement exposés ne cesse d'augmenter, sans que pour autant les propriétés toxicologiques de ces agents chimiques ne soient parfaitement connues. Comme des nanoparticules (NP) peuvent être mises en suspension dans les environnements de travail, l'inhalation représente la principale voie d'exposition professionnelle. Ainsi, l'évaluation des dangers associés à l'exposition à des aérosols nanostructurés nécessite de réaliser des études de toxicologie expérimentale par inhalation, en utilisant des modèles animaux. Dans ce travail, les propriétés toxicologiques pulmonaires d'un aérosol nanostructuré de dioxyde de titane (TiO₂) ont été étudiées à court et long termes, en combinant des analyses toxicologiques conventionnelles (analyses du lavage broncho-alvéolaire (LBA), histopathologie des poumons et des ganglions lymphatiques); et de criblage moléculaire à haut contenu (analyses de transcriptomique et de protéomique). Des rats Fischer 344 ont été exposés par inhalation oro-nasale, à un aérosol nanostructuré de TiO₂ à 10 mg / m³; 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines. Des échantillons biologiques ont été prélevés immédiatement et jusqu'à 180 jours suivant la fin de l'exposition. L'exposition à l'aérosol nanostructuré de TiO₂ a entraîné une importante réponse inflammatoire pulmonaire aiguë. Cette réponse était caractérisée par un influx de granulocytes neutrophiles, la présence de macrophages chargés en particules au niveau alvéolaire, la surexpression de gènes et de protéines impliqués dans les réponses inflammatoires et immunitaires, les cascades du complément et de la coagulation, le stress oxydant. Certains gènes surexprimés étaient également impliqués dans les lésions de l'ADN et la fibrose; et certaines protéines surexprimées étaient associées au protéasome et à l'organisation du cytosquelette. Dans le surnageant du LBA, l'augmentation du niveau d'histones et d'autres protéines associées aux pièges extracellulaires des neutrophiles (Neutrophilic Extracellular Trap, NET) suggère la libération de ces pièges extracellulaires dans l'espace alvéolaire. Cette libération possible de NET se produit dans un contexte inflammatoire mais en l'absence de changements histopathologiques significatifs. Ce processus inattendu n'a fait l'objet que de très peu d'études en lien avec une exposition à des nanomatériaux. Six mois après la fin de l'exposition (réponse à long terme), l'inflammation a diminué et s'accompagnait d'une baisse de la charge pulmonaire de titane (un marqueur fiable de la charge pulmonaire en nanoparticules de TiO₂), mais de nombreux gènes et protéines étaient différemment exprimés. Les conséquences physiopathologiques des changements rapportés ici ne sont pas entièrement connues, mais ces résultats devraient susciter des interrogations quant aux effets pulmonaires à long terme des NP inhalées biopersistantes de faible toxicité comme le TiO₂. En conclusion, ce travail montre qu'il existe une bonne relation entre les changements cytologiques et histopathologiques d'une part et les modifications des profils d'expression de gènes et de protéines d'autre part. Cependant, dans certains cas, la transcriptomique et la protéomique pourraient être plus sensibles que les méthodes conventionnelles pour identifier de nouvelles propriétés toxicologiques, ou pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents de la toxicité des produits chimiques. Notre étude avec d'autres travaux de la littérature pourraient également être utiles pour identifier des biomarqueurs d'exposition aux nanomatériaux ou prédire leurs effets nocifs à long terme.

Mots-clés : dioxyde de titane, nanoparticule, inflammation pulmonaire, profil d'expression de gènes et de protéines, réponse à court et long terme

Study of gene expression and protein profiles in rat lungs exposed by inhalation to a nanostructured aerosol of titanium dioxide

Due to the growing use of nanomaterials in various industrial processes, the number of workers potentially exposed is increasing even though the toxicological properties of these compounds are not completely known. Since nanoparticles (NP) may get aerosolized, inhalation represents their main route of occupational exposure. Then, inhalation studies of nanomaterial toxicity in animal models appear to be the most relevant approach to assess their hazards. In this work, we studied the short and long term pulmonary toxicological properties of inhaled titanium dioxide (TiO₂) nanostructured aerosol (NSA), using conventional (broncho-alveolar lavage (BAL) analyses, lung and lymph nodes histopathology); and high content molecular toxicological approaches (transcriptomics and proteomics analyses). Fischer 344 rats were exposed to 10 mg/m³ of TiO₂ nanostructured aerosol by nose-only inhalation, 6h/day, 5 days/week for 4 weeks. Biological samples were collected immediately and up to 180 post-exposure days. Exposure to TiO₂ NSA resulted in a strong acute pulmonary inflammation. This response was characterized by a neutrophil influx, the presence of particle-laden macrophages in the alveolar lumen, as well as overexpression of genes and proteins involved in inflammatory and immune responses, complement and coagulation cascades, oxidative stress. Some overexpressed genes were also involved in DNA damage and fibrosis; and some overexpressed proteins in proteasome and cytoskeleton organization. In the BAL supernatant, the increased level of histones and other neutrophilic extracellular trap (NET) -associated proteins suggests the release of these traps in the alveolar space. This possible NET release occurs in an inflammatory context but in the absence of significant histopathological changes. Very few studies reported this unexpected process related to exposure to nanomaterials. Six months after the end of exposure (long-term response), inflammation had decreased in line with the decrease of titanium lung burden (a surrogate for TiO₂ pulmonary deposition), but many genes and proteins remained differentially expressed. The physiopathological consequences of the molecular changes reported here are not fully known, but these results should raise concern about the long-term pulmonary effects of inhaled low toxicity NP such as TiO₂. Altogether, this work shows that there is a good relationship between cytological and histopathological changes in one hand and gene as well as protein expression profile modifications in the other hand. However, in some cases transcriptomics or proteomics could be more sensitive than conventional methods to identify new toxicological properties or to better understand the underlying molecular mechanisms of chemicals toxicity. Our study along with others could also be helpful to identify biomarkers of exposure or predict the long-term adverse effects of nanomaterials.

Keywords : titanium dioxide, nanoparticle, lung inflammation, gene and protein expression profile, short and long-term response