



HAL
open science

Signatures moléculaires impliquées dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par les silices amorphes synthétiques

Anaïs Kirsch

► **To cite this version:**

Anaïs Kirsch. Signatures moléculaires impliquées dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par les silices amorphes synthétiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0015 . tel-02877489

HAL Id: tel-02877489

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02877489v1>

Submitted on 22 Jun 2020

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 Anaïs KIRSCH

Signatures moléculaires impliquées dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par les silices amorphes synthétiques

11 mars 2020

Membres du jury :

Rapporteurs : Mr Stéphane FABRE	Directeur de Recherche, INRAE, Toulouse
Mme Armelle BAEZA-SQUIBAN	Professeur, Université de Paris VII, Paris
Examineurs : Mr Olivier JOUBERT	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy
Mme Martine DUTERQUE-COQUILLAUD	Directrice de Recherche, Université de Lille, Lille
Mme Valérie FESSARD	Directrice de Recherche, ANSES, Rennes
Mr Hervé SCHOHN	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Vandoeuvre, Directeur de thèse
Mme Hélène DUBOIS-POT-SCHNEIDER	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Vandoeuvre, co-directeur
Mr Yves GUICHARD	Responsable d'étude, INRS, Vandoeuvre, co-directeur de thèse

UMR CNRS 7039, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Département Biologie, Signaux et Système en Cancérologie et Neurosciences (BioSiS), 9 avenue de la forêt de Haye - BP 20199 – 54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), Département Toxicologie et Biométrie (TB), 1 rue du Morvan – CS 60027 – 54519 Vandoeuvre-Lès-Nancy

À mon grand-père

« Que le bonheur brille
toujours
Sur ta route ensoleillée
Que la joie remplisse tes
jours
Ce sont mes vœux et une
pensée

Si tu cherches à le
comprendre
Le bonheur est près de toi
Apprends donc à le
surprendre
Le bonheur est toujours
là. »

Günther, Jean
Gauthier

Remerciements

Je souhaite dans un premier temps remercier les membres de mon jury de thèse pour le temps et l'attention consacrés à l'évaluation de mon travail. Merci à Mme Armelle BAEZA-SQUIBAN, Professeur des Universités, et à Mr Stéphane FABRE, Directeur de Recherche, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse. Merci également à Mme Martine DUTERQUE-COQUILLAUD, Directrice de recherche et Mr Olivier JOUBERT, Maître de Conférences, pour vos conseils, votre disponibilité lors des différents comités de thèse, et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse. Et merci à Mme Valérie FESSARD, Directrice 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.

Je souhaiterais remercier également Mr Didier Wolf, Directeur du CRAN et Mme Muriel Barberi, Directrice du département BioSiS, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire CRAN durant ces 3 années de thèse. Je suis également extrêmement reconnaissante envers mes directeurs de thèse Universitaires, Mr Hervé SCHOHN, Mme Hélène DUBOIS-POT-SCHNEIDER, Maîtres de Conférences, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de co-diriger ma thèse. Veuillez accepter ici toute ma considération.

Mais aussi, un grand merci à Yves GUICHARD, Responsable d'études, pour avoir accepté de co-diriger ma thèse. Travailler avec toi a été une expérience enrichissante. Je te remercie de tout cœur d'avoir bien voulu m'accorder ta confiance... Je te remercie également pour ta bienveillance à mon égard : Rome ne s'est pas fait en un jour, et grâce à toi j'ai su progresser au fil du temps. Merci donc pour ton soutien et ton écoute dans les moments difficiles. Merci également pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta patience. Je t'en serai éternellement reconnaissante.

Je tiens à remercier également Mr Pierre CAMPO, pour les différents échanges que nous avons pu avoir, merci à vous pour vos conseils, vos corrections et votre écoute. J'espère croiser encore une fois la route d'un manager tel que vous. Vous contribuez à la convivialité qui règne à l'INRS et en particulier dans le département TB.

Une thèse n'est bien évidemment pas le travail d'une seule et unique personne, mais nécessite la présence de toute une équipe. Toutes mes pensées vont donc vers vous qui avez partagé mon quotidien pendant trois ans et qui avez contribué, chacun à votre façon, à l'aboutissement de ce travail. C'est pourquoi je souhaite remercier toute l'équipe CMR ! Merci à toi Laurent pour m'avoir suivi durant ces trois années, pour tes conseils précieux et ton écoute. Merci à Caroline, ma collègue de bureau, pour m'avoir aidé tant sur le plan expérimental, que personnel et pour m'avoir soutenu quoi qu'il arrive durant toutes ces années. Je souhaitais également remercier Carole pour m'avoir fait part de son savoir-faire en biologie moléculaire dès mes débuts à l'INRS et pour avoir toujours répondu présente quand j'avais besoin de son aide. Merci également à Sylvie, Mylène et Dieynaba pour vos conseils notamment concernant la partie sur les Western blot !! Et enfin merci à Christian, Jean-Philippe, Anne-Marie,

Hélène, Laetitia et Sarah pour les différents échanges que j'ai pu avoir avec vous. Et de façon plus générale, un grand merci à vous tous pour votre collaboration, et pour votre participation à mes différentes répétitions ou présentations de mes travaux de thèse.

Merci également à Olivier, Aurélie THOMAS et Stéphane sans qui je n'aurai jamais pu obtenir les images de microscopie électronique. J'en suis très fière.

Aurélie REMY, je tenais tout particulièrement à te remercier pour tes analyses statistiques. Ça n'a pas été de tout repos. Alors merci pour ta patience et ta compréhension. Tu as su m'expliquer la démarche de façon claire et concise, mais tu as également su m'écouter et me soutenir quand j'en avais besoin.

L'INRS n'est pas seulement un lieu de travail mais également un lieu de rencontre. Et des belles rencontres j'en ai fait !! J'ai une pensée toute particulière pour l'ensemble des personnes du premier étage du bâtiment 5 (La FF2FIVE d'après Samuel pour les journées omnisports !) Ronan, Jérôme, Matthieu, Asena, Karine, Bénédicte, Caroline, Marie, Fabrice One, Fabrice Two, Isabelle SPONNE, Isabelle LANGONNE, Samuel, Kiki, Elisabeth, Catherine, Marie-Jo, Lisa, Claire, Julianne, Adrien et Samuel. Un très grand merci à vous tous. Bien qu'une thèse soit difficile, vous avez su adoucir cette épreuve chacun à votre manière. La fin de ma thèse marque également la fin de mon aventure avec vous. Et c'est avec une immense tristesse que je partirai vers d'autres horizons. Car comme on dit, on sait ce que l'on quitte mais on ne se sait pas ce que l'on retrouve. Et j'ai du mal à croire que je puisse retrouver ailleurs une aussi bonne ambiance. Alors merci pour tout ce que vous m'avez apporté, pour ces longues discussions de travail en salle de pause (soi-disant), pour les nouvelles expressions qui enrichissent chaque jour mon vocabulaire, pour vos blagues un peu douteuses et pour tous ces moments de convivialités. J'ai pris un énorme plaisir à venir chaque jour à l'INRS durant presque 4 ans.

Je souhaite remercier plus particulièrement les personnes dont j'ai été le plus proche durant toutes ces années.

Merci à toi Karine, tu fais partie de mes plus belles rencontres. J'ai adoré tous les moments passés avec toi, aussi bien à l'INRS, qu'en dehors du travail. J'ai été ravie d'être en face de ton bureau durant une longue période. Merci pour tes snaps à mourir de rire. Merci également pour tes nombreuses imitations, toutes plus drôles les unes que les autres. Je n'oublierai jamais ces moments passés ensembles à chanter la Fièvre tout en allant chez Stéphane. Je pense qu'on avait largement mérité nos casquettes ce jour-là, et les photos prises dans la boule de Noël de la place du marché. J'espère qu'on ne se quittera jamais des yeux. Et stp, ne pars plus, l'INRS sans toi ce n'est pas pareil !

Julianne, certains départs ont laissé un grand vide en moi, que tu as su combler. Nous n'avons pas exactement les mêmes goûts, mais nous partageons une passion commune (non non pas l'amour est dans le pré), Disney forever !! Merci pour ton soutien et nos délires qui resteront à jamais dans ma mémoire. Ton enthousiasme me manquera, et rire à chacune de mes blagues aussi. Merci mon bon public !! C'est encore pire quand tu sniffes de l'eau javel soit-dit en passant. Au risque de me répéter,

tu resteras également l'une de mes plus belles rencontres de l'INRS, mais cette amitié n'en restera pas là puisque nous nous reverrons encore et encore en dehors de l'INRS... Eh oui on n'a pas fini de chanter tous nos classiques.

Adrien, merci, grâce à toi j'ai pris du poids rien qu'en parlant de bouffe toute la journée !! Je ne vais bientôt plus passer dans le placard ☺. Trêve de plaisanteries, je tenais à te dire que j'ai été ravie d'avoir partagé ton bureau durant cette dernière année et c'est toujours réconfortant de pouvoir échanger sur les difficultés que l'on rencontre en thèse.

Samuel et Isabelle L., je crois qu'on peut dire que ça sent le cheval pour moi cette fois-ci et même très très fort. J'ai été ravie de faire votre connaissance. Vous resterez à jamais gravés dans ma mémoire. Je crois que vous êtes les personnes que j'ai le plus embêté durant ces trois années de thèse mais comme on dit « Qui aime bien, châtie bien », et oui encore une expression !!! Des petites crasses, on s'en ait fait, mais toujours dans le but de faire rire l'autre. Je voulais vous remercier pour votre bonne humeur, pour toutes les discussions que l'on a pu avoir, pour les fous rires à répétition et surtout pour m'avoir adopté !! Vous m'avez également appris à réaliser des tests ELISA ! Bon, ce n'était pas si dur que ça, mais quand même, sans toi Samuel je n'aurai jamais obtenu mon résultat pour POSTN. D'ailleurs toutes les autres protéines n'ont rien donné, étrange... Je souhaite également immortaliser tes expressions Samuel, que tu répètes au moins plus d'une fois dans la journée : « Mais vous êtes grave !, Ah bon tu sais pas ça ?, non sérieux ? Tu sais pas ? » Ces phrases et la mimique qui va avec vont me manquer.

J'espère en tout cas que même après mon départ, vous n'irez plus boire un café sans le signal (Tic, Tic, Tic), je vais devoir passer la relève à quelqu'un...

Enfin, j'ai une petite fierté tout de même, c'est de t'avoir fait découvrir les 3D Samuel et le grignotage devant la télé. Non vraiment je suis contente et je m'engage à ce qu'il y ait des 3D à mon pot de thèse.

Claire L., je ne t'ai pas connu très longtemps, mais dès le départ le feeling est passé entre nous. Tu as su ramener un vent de fraîcheur à l'INRS et c'est très agréable. Garde ta spontanéité et ta bonne humeur ! Et merci d'avoir contribué à la création du gang des blondes. Je suis sûre que nous ne nous perdrons pas de vue, une amitié s'est formée.

Marie, la reine des potins, à se demander si tu ne travailles pas pour les renseignements, tu connais tellement de choses. Merci à toi pour le stage de 6 mois que tu as effectué chez CMR, je suis contente que tu aies pu revenir parmi nous.

Bon et puis, merci à toi aussi Fabrice B. pour nous avoir dit à plusieurs reprises : « mais je vous emmerde ». Cette phrase pourrait en choquer plus d'un, mais c'est sa manière à lui de nous exprimer son affection. Parce que dans le fond, Fabrice est une personne très sociable, qui aime la compagnie de ces chers collègues et qui laissera toujours sa porte ouverte à celui qui en a besoin ;-).

Pour conclure sur les remerciements des personnes avec qui j'ai travaillé, je souhaite remercier également mes acolytes de sorties. Stéphane, Karine, Mathieu, Lise et Aurélie, j'ai passé des supers moments avec vous et ce fut un réel plaisir de faire partie de votre groupe.

UN GRAND merci à l'ensemble des personnes du département TB, grâce à vous tous, j'ai vraiment eu l'impression de faire partie d'une grande famille qui est l'INRS...

En remerciant toutes les personnes de l'INRS, je ne pouvais bien évidemment pas oublier les personnes qui ont été de passage, Léa, Hakima et Hami mais qui sont devenus rapidement des amis précieux. Léa, ma première coéquipière de bureau. Dès la première semaine on était déjà très complice. Grâce à toi, mon stage de master 2 restera à jamais dans ma mémoire. Merci pour ces japonais à répétition, ces mojitos fraise tagada, les meilleurs de Nancy selon nous (Place Stan, pour ceux qui seraient intéressés), ta légendaire fatigue au moment de commencer un film et ces « Il fait un temps magnifique !! ». Tu resteras une amie chère à mes yeux et j'ai hâte de te revoir. Je te souhaite beaucoup de réussite, car malgré mes mises en garde, tu t'es lancée dans une thèse au Canada, je suis fière de toi.

Hakima, les mots me manquent. Tu es une fille en or, j'admire ta force et ton courage et je suis fan de ta bonne humeur. Merci pour tous les délires qu'on a pu avoir et qu'on aura encore. Une amitié comme celle-là, durera toute la vie. Je suis sincèrement navrée que tu sois maintenant obligée de mettre de la crème antirides, mais bon je ne fais pas de soucis tu resteras toujours aussi belle ! Tiens, c'est cadeau, je me sens d'une humeur nostalgique alors profite-en, ce ne sera pas toujours le cas. Au fait, à quand la prochaine compétition ?

Hami, je voulais te remercier pour ton investissement durant ton stage de master 2. Ton aide m'a été précieuse et les délires qu'on a pu avoir m'ont permis de progresser dans la joie et la bonne humeur. Merci également d'avoir tenu bon et d'avoir insisté pour que j'installe green shot, ça me change la vie, par contre rend moi mes fluo stp !!!

Tout autant, merci à mes amis que j'ai rencontré sur le banc de la fac et qui sont encore à mes côtés aujourd'hui. Je pense à Camille, Florent, Marius (le copain de Laetitia) et Claire. Je vous aime les copains !

Camille, Florent, on en a quand même bien bavé ensemble en master 2. Mais j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous. Merci pour les vacances passées ensemble, c'était génial et je ne les oublierai jamais. Je vous souhaite à tous les deux beaucoup de réussite.

Marius, la première fois que tu m'as vu, tu pensais que j'étais la prof d'anglais. Depuis, j'ai changé mes lunettes !! Je suis ravie d'être ton amie et même si nous avons rarement l'occasion de nous voir en ce moment, je compte bien me rattraper après ma soutenance. Je ne peux évidemment pas remercier

Marius sans remercier Laetitia également. « Bonjour je suis le vomit » et je tiens à te décerner la palme d'or car je suis persuadée que ce n'est franchement pas facile de vivre avec lui tous les jours. Je le sais puisque j'ai le même à la maison. Mais ne t'inquiète pas Laetitia, un jour ils admettront qu'on est aussi drôle qu'eux... À quand la prochaine soirée Mario Kart, pannini poulet, get, chorizo ? Sans oublier la présence indispensable de Louis ! Parce que clairement ça me manque. Je vous souhaite plein de bonnes choses, votre amitié m'est précieuse.

Ma petite Clairounette Mumu, eh oui on l'a fait !! Après des années et des années d'acharnement, ça y est, c'est fini. Et je ne pouvais pas rêver de meilleur binôme que toi pour traverser toutes ces épreuves. On s'est toujours serré les coudes et t'avoir à mes côtés m'a permis d'avancer le cœur moins lourd. Je pense également que tu m'as poussé à donner toujours le meilleur de moi-même. Et je tiens à t'en remercier. Ton ouverture d'esprit et ta tolérance sont ta plus grande force. Tu es une fille géniale et j'espère t'avoir à mes côtés pour toujours. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tes projets futurs, tu le mérites. Ah oui et merci aussi pour tes cadeaux d'anniversaire en retard, Zip se porte très bien ☺. Je remercie également FloFlo et Chacha d'avoir pris soin de toi durant ces trois années de thèse. Bon courage à vous aussi, FloFlo, accroche-toi c'est bientôt la fin !

Merci Benoît pour tout ce que tu m'as apporté durant toutes mes années Fac. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite.

Mes remerciements ne seraient pas complets sans ceux adressés à ma famille : mes parents, mon frère, mes grands-parents, mes oncles et tantes, cousins et cousines, beaux-parents, beaux-frères, belles-sœurs.

Julien, Kathy, papa, Muk, ces trois années de thèse ont marqué une longue absence de ma part, mais malgré la distance j'ai toujours ressenti un soutien de votre part. Un grand merci à vous pour votre bienveillance et vos encouragements qui m'ont permis de continuer à avancer !! Et merci à vous Julien et Kathy, de me donner l'occasion de devenir tata !!

Merci à mes grands-parents paternels et maternels, toujours là pour moi. J'ai une pensée toute particulière pour mon pépé, un homme sage, surnommé Mc Giver, le meilleur, qui aurait dû être présent en ce jour si particulier pour moi. J'espère que de là où tu es tu es fière de moi. Et pour ma mamie, une femme forte et déterminée qui me fera toujours beaucoup rire, sache que j'aurai toujours besoin de toi. Je suis fière d'être votre petite fille et je vous dédie cette thèse.

Merci à Christine, Pascal, Lisa. Malgré la distance, j'ai toujours ressenti votre soutien. Vous me manquez, j'espère vous revoir très vite.

Nedjia, Mohamed, Amine, Yamina, Fadela, Solange, et les cousins, Ilies, Camil, Elijah et Isaac. Vous étiez les premiers à me faire part de votre souhait de participer à ma soutenance de thèse et je dois dire que ça m'a fait chaud au cœur. Merci pour tous les moments passés ensemble.

Merci à toute ma famille qui m'a soutenu durant ces trois années ! Conny, Hervé, Maxime, Aurore, Jessica, Sébastien, Alice, Nellie, Stella. Plus particulièrement, merci à mon cousin Sébastien pour m'avoir conseillé de faire une thèse. J'attends ton remboursement...

Allons faire un tour du côté des Tallandier. Merci à Pascal et Annick, mes beaux-parents. Je suis fière d'être entrée dans votre famille. Je prends beaucoup de plaisir à passer du temps avec vous. Vous avez toujours su me soutenir et merci pour tout ce que vous faites pour nous. Vous nous gâtez beaucoup. Antoine, Anthony, Elisa, Aurélie, qu'est-ce que je suis heureuse de vous connaître, merci pour les délires qu'on peut avoir, plus d'excuses pour faire la fête ou aller courir.

Fodel, Maman, mes mots ne seront pas suffisants pour vous exprimer toute ma gratitude. Vous avez toujours été là pour moi, dans les moments difficiles comme dans les bons moments. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous faites pour moi chaque jour. Vous avez toujours su me pousser pour donner le meilleur de moi-même. Alors un GRAND merci à vous de m'avoir soutenue tout au long des étapes jusqu'à l'accomplissement de ma thèse ! Merci d'avoir toujours été à mon écoute et de bons conseils. Vous avez su trouver les bons mots pour apaiser mes tourments et me redonner confiance en moi. J'ai une profonde admiration pour le talent et le calme légendaire dont tu fais preuve maman. Fodel, merci pour ta force morale et ta dévotion. On peut toujours compter sur toi le Chat ! Vous êtes mon havre de paix.

Et enfin, le meilleur pour la fin. Un GRAND, ENORME, GIGANTESQUE merci à Valentin, mon amour, mon meilleur ami, mon confident qui a toujours su me soutenir et trouver les mots afin que je persévère jusqu'au bout dans mon travail. Merci de m'avoir accompagné tout au long de cette étape. Sans toi je n'en serais pas là. Tu as passé des heures et des heures à mes côtés pour me permettre de me sentir mieux, sans jamais rien réclamer en retour. Merci pour tout ce que tu m'apportes chaque jour. Tu m'apprends la persévérance et grâce à toi j'ai foi en l'avenir. Je t'aime de tout mon cœur.

Chapitre I : INTRODUCTION : ETAT DE L'ART	1
1. LES NANOMATERIAUX : Définitions et propriétés	1
2. LES NANOMATERIAUX DE SILICE	2
2.1 Enjeux et domaines d'application	2
2.2 Les différentes formes de silice	3
2.3 Les nanoparticules de silice amorphes	5
2.3.1 Procédés de synthèse	5
A. Les SAS précipitées	5
B. Les SAS colloïdales	5
C. Les gels de silice	5
D. Les SAS pyrogénées	5
2.3.2 Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules étudiées	6
3. TOXICITE DES NANOPARTICULES : LE «RISQUE NANO»	7
3.1 Généralités	7
3.2 Voies d'exposition	8
3.2.1 La voie respiratoire	8
3.2.2 La voie cutanée	9
3.2.3 La voie orale	9
3.2.4 Le franchissement des barrières biologiques	10
3.2.5 Les nanomatériaux pourraient être impliqués dans certaines maladies	10
3.3 Propriétés des nanomatériaux pouvant influencer leur toxicité	11
3.4 Toxicité des SAS	14
3.4.1 Etudes épidémiologiques	14
3.4.2 <i>In vivo</i>	15
3.4.3 <i>Ex vivo</i>	15
3.4.4 <i>In vitro</i> sur des lignées humaines	19
3.4.5 <i>In vitro</i> sur des lignées animales	20
4. CANCEROGENESE CHIMIQUE	23
4.1 Initiation	23
4.2 Promotion	24
4.2.1 Notions de régulation épigénétique	26
A) La méthylation et déméthylation de l'ADN	26
B) Les modifications post-traductionnelles des histones	27
4.2.2 Implications des mécanismes épigénétiques dans la cancérogenèse	27
4.2.3 Connaissances sur les effets épigénétiques des nanomatériaux	28
5. LES TESTS <i>IN VITRO</i> DE TRANSFORMATION CELLULAIRE	29
5.1 Définition	29
5.2 Intérêt des tests <i>in vitro</i> de transformation cellulaire	29
5.3 Les différents modèles de transformation	30

5.3.1 Les cellules SHE.....	30
5.3.2 La lignée C3H10T ^{1/2}	30
5.3.3 La lignée BALB/c 3T3	31
5.3.4 La lignée Bhas 42	32
5.4 Rôle du gène <i>v-Ha-RAS</i> dans la transformation des cellules Bhas 42	33
5.5 Avantages à l'utilisation de la lignée Bhas 42	36
5.6 Principe du test de transformation sur les cellules Bhas 42	36
5.6.1 Test d'initiation.....	36
5.6.2 Test de promotion	37
5.7 Validation du test de transformation	37
6. Silices cristallines, SAS et cancer	38
Chapitre II : OBJECTIFS DE L'ETUDE	39
Chapitre III : MATERIELS ET METHODES.....	40
1. Culture de la lignée cellulaire Bhas 42	40
2. Le test de transformation sur les cellules Bhas 42 et test de survie cellulaire.....	40
2.1 Test de transformation en trois traitements.....	40
2.2 Test de transformation en un traitement.....	41
2.3 Test de survie cellulaire à J7.....	42
2.4 Choix des concentrations pour le test de transformation.....	42
2.5 Identification des foyers transformés et interprétation des résultats	42
3. Particules et traitements cellulaires	43
3.1 Caractéristiques physico-chimiques des particules de silice	43
3.2. Préparation des échantillons et traitement cellulaire	44
4. Analyse de l'expression génique.....	45
4.1 Extraction d'ARN pour les analyses par transcriptomique et RT-qPCR.....	45
4.2 Vérification de la qualité des ARN	45
4.3 Analyse Transcriptomique.....	46
4.3.1 Conditions expérimentales	46
4.3.2 Synthèse de l'ARNc marqué	46
4.3.3 Purification des ARNc et dosage	47
4.3.4 Hybridation	47
4.3.5 Extraction des données.....	47
4.3.6 Principal component analysis (PCA).....	48
4.3.7 Test statistique.....	48
4.3.8 Analyses bio-informatiques	49
4.4 RT-qPCR.....	49
4.4.1 Transcription inverse.....	49
4.4.2 Amplification par PCR en temps réel	49
5. Analyse protéique.....	51

5.1 Extractions protéiques	51
5.2 Western blot	51
5.3 Dosage de la périostine par enzyme-linked immuno assay (ELISA)	52
6. Analyse par microscopie électronique à transmission	52
7. Analyse statistique.....	53
Chapitre IV : RESULTATS	54
1. Résultats initiaux et hypothèse de travail.....	54
2. Présentation	56
3. Absorption cellulaire de la SAS pyrogénée NM-203	57
4. Transformation des cellules Bhas 42 induite par un traitement unique avec les SAS précipitées NM-200, NM-201, les SAS pyrogénées NM-202, NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5®, la silice amorphe DE et TPA	57
5. Validation des réplicats biologiques par RT-qPCR	60
6. Analyse transcriptomique.....	62
6.1 Principal component analysis (PCA)	62
6.2 Regroupement hiérarchique non supervisé des données	63
6.3 Effet moléculaire induit par la SAS pyrogénée NM-203	64
6.3.1 Comparaison des signatures moléculaires obtenues avec des données de la littérature (GSEA).....	64
6.3.2 Gènes dérégulés par la SAS pyrogénée NM-203	66
6.3.3 La SAS pyrogénée NM-203 induit une modification de voies de signalisation liées au cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN (Analyse IPA)	67
6.3.4. Réseaux de gènes impactés par la SAS pyrogénée NM-203	70
6.3.5 La SAS pyrogénée NM-203 induit une modification de voies de signalisation liées à l'inflammation et à l'adhésion cellulaire (Analyse DAVID et Panther)	71
6.3.6 Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203	72
6.4 Comparaison des signatures moléculaires induites par la SAS pyrogénée NM-203 avec la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA	74
6.4.1 Comparaison des signatures moléculaires obtenues avec des données de la littérature (GSEA).....	75
6.4.2 Gènes dérégulés par la silice cristalline Min-U-Sil 5®, la silice amorphe DE et le TPA... 77	77
6.4.3 La SAS pyrogénée NM-203 induit une modification de voies de signalisation communes à la silice cristalline Min-U-Sil 5® et au TPA.....	77
6.4.4 Réseaux de gènes impactés	80
6.5 Comparaison des signatures moléculaires et sélection des gènes communs.....	82
6.5.1 Signature commune de la transformation cellulaire.....	82
6.5.2 Fonction principale des 12 gènes communs sélectionnés.....	83
6.6 Validation des résultats de transcriptomique par RT-qPCR	87
6.7 Validité de la signature commune pour d'autres SAS	87
6.8 Cinétique d'expression des 12 gènes communs.....	88
6.9 Étude de la corrélation entre ARNm et protéines.....	89

Chapitre V : DISCUSSION	93
1. Tests de transformation et approche transcriptomique.	93
2. Les SAS induisent la transformation cellulaire <i>in vitro</i>	94
3. Pénétration cellulaire de la SAS pyrogénée NM-203	95
4. Signatures moléculaires induites et voies de signalisation modifiées par la SAS pyrogénée NM-203.....	95
5. c-MYC et mécanismes épigénétiques	102
6. Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203.....	103
7. Signature des 12 gènes communs.....	104
8. Avantages et limites de l'utilisation du test de transformation et du modele Bhas 42.....	107
Chapitre VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	109
Chapitre VII: REFERENCES	111
Chapitre VIII : ANNEXES	131

Liste tableaux

Tableau 1 : Caractérisations physico-chimiques des particules de silice.	7
Tableau 2 : Etudes <i>in vivo</i>	15
Tableau 3 : Etudes <i>ex vivo</i>	15
Tableau 4 : Etudes <i>in vitro</i> sur des lignées humaines.....	19
Tableau 5 : Etude <i>in vitro</i> sur des lignées animales	19
Tableau 6 : Tableau comparatif des différents tests de transformaiton	36
Tableau 7 : Caractérisations physico-chimiques de la silice cristalline Min-U-Sil 5 [®] et de la silice amorphe DE.....	44
Tableau 8 : Normalisation, filtration des données et tests statistiques.	48
Tableau 9 : Référence et séquences nucléotidiques des amorces utilisées.....	50
Tableau 10 : Résumé des résultats des tests de transformation cellulaire en trois ou un traitement... 54	
Tableau 11 : Résultats du test de survie cellulaire suite au traitement des cellules Bhas 42 avec les SAS précipitées NM-200, NM-201, les SAS pyrogénées NM-202, NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5 [®] , la silice amorphe DE et TPA en condition de promotion.	59
Tableau 12 : Liste des 20 premières signatures de la SAS pyrogénée NM-203, score d'enrichissement et grandes fonctions associées.....	65
Tableau 13 : Nombre de gènes significativement dérégulés dans les cellules traitées par rapport aux cellules témoins.....	66
Tableau 14 : Principales voies de signalisation modifiées et principaux réseaux de gènes impactés suite à une exposition des cellules Bhas 42 durant 48h à la SAS pyrogénée NM-203	67
Tableau 15 : Caractéristiques des gènes impliqués dans les différentes voies de signalisation	69
Tableau 16 : Caractéristiques des gènes <i>AKT</i> , <i>MEK</i> et <i>RAD51</i> impliqués dans le réseau de gènes figure 26.....	71
Tableau 17 : Caractéristiques des gènes impliqués dans différentes voies de signalisation mises en évidence grâce au logiciel Panther.	72
Tableau 18 : Nombre de gènes significativement dérégulés dans les cellules traitées par rapport aux cellules témoins.....	77
Tableau 19 : Principales voies de signalisation modifiées et principaux réseaux de gènes impactés suite à une exposition des cellules Bhas 42 durant 48h à la SAS pyrogénée NM-203, à la silice cristalline Min-U-Sil 5 [®] et au TPA mis en évidence grâce à IPA.	78
Tableau 20 : Caractéristiques des gènes identifiés comme étant au coeur des réseaux de gènes communs à la SAS pyrogénée NM-203 et à silice cristalline Min-U-Sil 5 [®] et à la SAS pyrogénée NM-203 et au TPA.....	82
Tableau 21 : Caractéristiques des 12 gènes communs sélectionnés.....	85
Tableau 22 : caractéristiques des gènes communs non sélectionnés.....	86
Tableau 23 : Corrélation entre les données de micropuces et les résultats de RT-qPCR.....	87
Tableau 24 : Récapitulatif de la corrélation entre protéines et ARNm.....	92

Liste figures

Figure 1 : Représentation schématique des différents nanomatériaux existants.	2
Figure 2 : Les différentes formes de silice. La silice existe sous deux formes : cristalline et amorphe (naturelle ou synthétique).	4
Figure 3 : Représentation bidimensionnelle de la silice.	4
Figure 4 : Prédiction des dépôts des particules dans la voie respiratoire chez l'Homme en fonction de la taille des particules.	9
Figure 5 : Schéma du corps humain présentant les différentes voies d'exposition aux nanoparticules, les différents organes affectés, et les maladies associées.	11
Figure 6 : Modes d'internalisation cellulaire des particules.	12
Figure 7 : Pourcentage de neutrophiles dans le lavage pulmonaire de rats (A, B) et de souris (C, D) comme indicateur de l'inflammation 24 heures après l'instillation intra-trachéale de différentes doses de particules de TiO ₂ de 20 nm et 250 nm chez le rat et la souris.	13
Figure 8 : Représentation des différentes étapes de la cancérogenèse.	23
Figure 9 : Mécanisme de méthylation et de déméthylation de l'ADN.	27
Figure 10 : Implication des modifications épigénétiques dans le développement de cancer.	28
Figure 11 : Structure du plasmide pBR322.	32
Figure 12 : Foyers de cellules BHas 42 positifs (transformants).	33
Figure 13 : Voie d'activation des protéines RAS.	34
Figure 14 : Comparaison des performances obtenues avec un test de transformation sur les cellules Bhas 42 et sur des cellules BALB/c 3T3.	35
Figure 15 : Protocole du test de transformation cellulaire dans des conditions de promotion standards sur les cellules Bhas 42 (cellules en phase stationnaire).	41
Figure 16 : Photo d'un foyer après 21 jours de culture et une coloration au Giemsa.	41
Figure 17 : Principe du test de transformation cellulaire dans des conditions de promotion en traitement unique sur cellules Bhas 42.	42
Figure 18 : Les différentes étapes de la préparation d'une puce à ADN.	46
Figure 19 : Absorption cellulaire et localisation de la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm ²) dans des cellules Bhas 42 après un traitement de 48h.	57
Figure 20 : Test de transformation à traitement unique des cellules Bhas 42 en condition de promotion.	58
Figure 21 : Niveaux d'expression des gènes c-MYC et DNMT1.	61
Figure 22 : PCA obtenu grâce au logiciel Genespring et présentant la répartition des différents réplicats dans l'espace.	62
Figure 23 : Regroupement hiérarchique des cellules Bhas 42 après exposition.	63
Figure 24 : Analyse d'enrichissement de gènes suite à un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg / cm ²).	65
Figure 25 : Schématisation du cycle cellulaire et des différentes voies de signalisation activées suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203.	68
Figure 26 : Réseaux de gènes identifiés <i>via</i> l'analyse IPA suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203.	70
Figure 27 : Voies de signalisation modifiées suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm ²) (déterminées à l'aide de la base de données Panther version 14.1). .	72
Figure 28 : Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203 (1-5 µg/cm ²).	74
Figure 29 : Analyse d'enrichissement de gènes suite à un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg / cm ²), la silice cristalline Min-U-Sil 5® (20 µg / cm ²) et le TPA (0,05 µg / mL).	76
Figure 30 : Comparaison des voies de signalisation modifiées suite à un traitement de 48h des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA mises en évidence grâce au logiciel IPA.	79
Figure 31 : Réseaux de gènes communs identifiés <i>via</i> l'analyse IPA suite aux traitements des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA.	81
Figure 32 : Comparaison des signatures moléculaires et sélection de gènes communs.	83
Figure 33 : Changements d'expression induits par les SAS précipitées NM-200, NM-201 et les SAS pyrogénées NM-202, NM-203.	88
Figure 34 : Cinétique d'expression des 12 gènes communs sélectionnés.	89
Figure 35 : Analyse des protéines.	91

Figure 36 : Expression du gène <i>RAD51AP1</i> des Bhas 42 après traitement par NM-200, NM-201 et NM-202.....	100
Figure 37 : Hypothèse des mécanismes impliqués dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par les SAS.....	110

Liste des annexes

Tableau annexe 1: Liste des 50 premières signatures de la SAS pyrogénée NM-203, de la silice cristalline Min-U-Sil 5 [®] et du TPA, score d'enrichissement et p-value.	131
Tableau annexe 2 : Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203.	132
Tableau annexe 3 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les cellules Bhas 42 suite à l'exposition à la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm ² en comparaison avec son témoin H ₂ O (p-value < 0,005 et FC >4).	135
Tableau annexe 4 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les cellules Bhas 42 suite à l'exposition à la silice cristalline Min-U-Sil 5 [®] à 20 µg/cm ² en comparaison avec son témoin H ₂ O (p-value < 0,005 et FC >4).	137
Tableau annexe 5 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les cellules Bhas 42 suite à l'exposition Au TPA en comparaison avec son témoin DMSO (p-value < 0,005 et FC >4).	138

Article (Fontana et al., 2017) : In vitro cell transformation induced by synthetic amorphous silica Nanoparticles.

Article (Seidel et al., 2017) : Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation.

Article (Kirsch et al., 2019) : Predictive early gene signature during mouse Bhas 42 cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles.

Liste des abréviations

BSA	Albumine de sérum bovin
AmpR	Gène de résistance à l'ampicilline
BET	Brunauer-Emmet-Teller
CARSAT	Caisses d'Assurance Retraite et de la Santé Au Travail
CdTe QD	Cadmium Telluride quantum dots
CECA	Communauté Européenne du Charbon et de l'Acier
CI50	Concentration Inhibitrice 50
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CRAN	Centre de Recherche en Automatique de Nancy
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceine di-acétate
DE	Terre de Diatomée; Diatomaceous Earth
DF5F	Milieu DMEM supplémenté en SVF et pénicilline-streptomycine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière; Dynamic Light Scattering
DMBA	7,12-diméthylbenz [a] -anthracène
DMEM	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC-JRC	The european commission's joint research center
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ES	Score d'enrichissement
GPX	Glutathion peroxydase
GSEA	Gene Set Enrichement Analysis
GSH	Glutathion
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HRP	Horseradish Peroxidase
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
J	Jour
LDH	Lactate Déshydrogénase
LPO	Peroxydation lipidique
LTR	Long Terminal Repeats
M10F	Milieu MEM supplémenté en SVF et pénicilline-streptomycine
MCA	3-Méthylcholanthrène
MDA	Malondialdehyde
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	Minimum Essential Medium
NO	Oxyde nitrique
NOAEL	Dose sans effet toxique observable
OA	Okadaic acid
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
Ori	Origine de répllication
Panther	Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships
PBS	Tampon phosphate salin
PCA	Principal Component Analysis
Pré	Précipitée
PVDF	PolyVinylideneFluoride
Pyr	Pyrogénée
RIN	RNA Integrity Number
RIPA	RadioimmunoPrecipitation Assay buffer
RLT	Tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidium

ROS	Espèces Réactives de l'Oxygènes; Reactive Oxygen Species
SAS	Nanoparticules de silice amorphes synthétiques; Synthetic Amorphous Silica nanoparticles
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SiCl ₄	Tétrachlorure de silicium
SiO ₂	Nanoparticules de silice
SOD	Superoxyde dismutase
STEM	Microscope électronique à balayage à émission de champ
STR	Stéptavidine
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAE	Tris acétate EDTA
TEM	Microscope électronique à transmission
tet	Gène de résistance à la tétracycline
TiO ₂	Dioxyde de Titane
TMB	3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidine
TPA	12- O- tétradécanoylphorbol-13-acétate
γH2AX	Histone Gamma-Histone 2A, membre X

Articles soumis à comité de lecture (Publications disponibles en annexes)

1. Fontana C, **Kirsch A**, Seidel C, Marpeaux L, Darne C, Gaté L, Remy A, Guichard Y. In vitro cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles. *Mutat Res.* 2017, 823:22-27. doi:10.1016/j.mrgentox.2017.08.002.
2. Seidel C, **Kirsch A**, Fontana C, Visvikis A, Remy A, Gaté L, Darne C, Guichard Y. Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation. *Nanotoxicology.* 2017, 11(7):923-935. doi: 10.1080/ 17435390.2017.1382599.
3. **Kirsch A**, Dubois-Pot-Schneider H, Fontana C, Schohn H, Gaté L, Guichard Y. Predictive early gene signature during mouse Bhas 42 cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles. *Chem. Biol. Interact.* 2019, 108900. doi : 10.1016/j.cbi.2019.108900.

Communications/affiches avec acte dans un congrès/colloque international

Kirsch A, Dubois-Pot-Schneider H, Fontana C, Schohn H, Gaté L, Guichard Y. Biomarkers involved in cell transformation induced by nano-silica materials in the murine Bhas 42 model. NanoTox 2018 - 9th International Conference on Nanotoxicology - Dusseldorf, 18-21 september **Affiche**

Kirsch A, Dubois-Pot-Schneider H, Fontana C, Schohn H, Gaté L, Guichard Y. Biomarkers involved in cell transformation induced by nano-silica materials in the murine Bhas 42 model. IPTC 2019- 12th International Particle Toxicology Conference, Salzburg, 11-13 september **Affiche**

Communications orales dans le cadre institutionnel

A. Kirsch, Y. Guichard. Etude EL2018-006: Mécanismes moléculaires de la transformation de cellules Bhas 42 induite par des nanoparticules de silice.– Présentation de l'étude de Thèse à la direction scientifique à l'INRS, 17 janvier 2017

A. Kirsch, C. Fontana, Y. Guichard Etude des mécanismes moléculaires de la transformation cellulaire induite par une nanoparticule de silice dans la lignée Bhas 42. – Journée des doctorants de l'INRS, 28 Mars 2017

A. Kirsch, Y. Guichard. Etude EL2018-006: Mécanismes moléculaires de la transformation de cellules Bhas 42 induite par des nanoparticules de silice.– Présentation de l'étude de Thèse au groupe de suivi à l'INRS, 8 Septembre 2017

A. Kirsch, H. Dubois-Pot-Schneider, C. Fontana, H. Schohn, Y. Guichard. Molecular mechanisms involved in cell transformation using Bhas 42 cells exposure to silica nanoparticle NM-203.– Journée de l'Ecole Doctorale BioSE, 13 Novembre 2017

A. Kirsch, Y. Guichard. Etude EL2018-006: Mécanismes moléculaires de la transformation de cellules Bhas 42 induite par des nanoparticules de silice.– Présentation de l'étude de Thèse à la direction scientifique à l'INRS, 17 janvier 2018

A. Kirsch, Y. Guichard. Etude EL2018-006: Mécanismes moléculaires de la transformation de cellules Bhas 42 induite par des nanoparticules de silice.– Présentation de l'étude de Thèse au groupe de suivi à l'INRS, 13 Septembre 2018

A. Kirsch, H. Dubois-Pot-Schneider, C. Fontana, H. Schohn, Y. Guichard. Signatures moléculaire de la transformation de cellules Bhas 42 induite par des nanoparticules de silice.– Séminaire des doctorants du CRAN, 07 Février 2019

A. Kirsch, Y. Guichard. « Flash info, cas de transformation des cellules Bhas 42, un gang de silice a été interpellé, il aurait porté atteinte à 12 gènes ». – Journée des doctorants de l'INRS, 26 Mars 2019

Encadrement scientifique

2017 : **Marie Perceau** ; étudiante en troisième année de licence professionnelle ; Caractérisation des cellules Bhas 42 exposées à des agents initiateurs ou promoteurs de tumeur : indépendance d'ancrage et profils d'expression de gènes ; stage d'une durée de 6 mois.

2018 : **Hami Musaoglu** ; étudiant en Master 2 Génie Cellulaire ; Mécanismes moléculaires de la transformation cellulaire induite par des nanoparticules de silice dans les cellules Bhas 42 ; stage d'une durée de 6 mois.

Diffusion & animation

Ma thèse en 180 secondes : A. Kirsch, H. Dubois-Pot-Schneider, C. Fontana, H. Schohn, Y. Guichard. Etude des mécanismes moléculaires de la transformation cellulaire induite par une nanoparticule de silice dans la lignée Bhas 42. 16 janvier 2018 **Communication orale**

A. Kirsch 1^{ère} Journée de la Recherche du Master Sciences du Vivant (JRM) Université de Lorraine, Etude des mécanismes moléculaires de la transformation cellulaire induite par une nanoparticule de silice dans la lignée Bhas 42. 21 janvier 2019 **Communication orale et affiche**

Journée Doctorale de l'INRS : Conception et organisation de la 10^{ème} journée des doctorants de l'INRS, Janvier-Mars 2019

Enseignements & formations pédagogiques

Enseignements

- **Vacataire** de l'enseignement en 1^{ère} année de licence, Bureautique (36 h) - UFR SciFA L1SV, en 2017

Formations pédagogiques

- Formation à la communication orale et corporelle en milieu professionnel- Nancy, 27 février 2017
- Initiation à l'enseignement universitaire : construire un cours, l'animer, évaluer, 23 janvier 2017, Nancy
- Innovations pédagogiques et outils numériques - Metz, 15 novembre 2017
- Le numérique pour apprendre et enseigner, 15 janvier 2018 - ESPE de Lorraine

Diplôme & formation

- **Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale** Niveau 1 Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine - 6 juillet 2018
- **Culture de l'intégrité scientifique**, 20 novembre 2018 - formation en ligne - ARCHE

Formations dans le cadre institutionnel

- Formation à la culture de prévention, Nancy, 19 janvier 2017
- Sauveteur secouriste du travail (SST), Nancy, 20 janvier 2017
- Azote liquide: agir en cas d'urgence et savoir utiliser les gaz purs et mélanges, INRS, 5 avril 2017
- Prévention des risques biologiques, INRS, novembre 2016
- Formation risques chimiques, INRS, juin 2019
- Formation risques professionnels, juin 2019

Présentation du contexte des travaux

Les travaux présentés dans ce mémoire sont le résultat d'une collaboration entre l'Unité Mixte de Recherche 7039 associée au CNRS, intitulée Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), et l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Le CRAN est composé de plusieurs départements dont le Département de Biologie, Signaux et Système en Cancérologie et Neurosciences (BioSiS). Les travaux s'inscrivent au sein de ce département dans l'axe *cancérogenèse expérimentale*. L'INRS, association loi de 1901 à but non lucratif créée en 1947, travaille sur la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. L'INRS concentre son activité sur la santé, la sécurité au travail, et la prévention des risques professionnels, au profit des salariés et des entreprises du régime général de la sécurité sociale. De plus, l'INRS apporte ses compétences à d'autres acteurs de la prévention tels que les caisses d'assurance retraite et de la santé au travail (CARSAT), les médecins du travail et les services de l'inspection du travail. Parmi les thématiques de recherche en santé-travail, l'INRS s'intéresse aux risques cancérigènes associés aux agents chimiques auxquels sont exposés les salariés. L'institut a développé un certain nombre d'essais expérimentaux *in vivo* et *in vitro* visant à qualifier le potentiel cancérigène des agents chimiques incluant les particules, fibres et nanoparticules. *In vitro*, les effets des composés sont étudiés sur des modèles cellulaires adaptés capables de reproduire les premières étapes de la cancérogenèse chimique. Le développement de ces modèles pourrait être une alternative à l'utilisation du modèle animal.

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse concernent le risque toxicologique lié à l'exposition à des nanoparticules de silice amorphes synthétiques (SAS), retrouvées dans la composition de nombreux objets, de produits cosmétologiques et alimentaires. Plusieurs études ont montré que ces composés présentent une toxicité, dépendante du type de nano-objet. Les silices de type cristalline sont des composés capables d'induire une cancérogenèse chimique. A l'inverse, il existe peu de données sur le potentiel cancérogène des SAS. C'est ce potentiel qui a été étudié au cours de ces travaux, en utilisant un modèle de transformation cellulaire, la lignée murine Bhas 42.

Nous avons montré que la lignée Bhas 42 peut être utilisée pour mettre en évidence le potentiel des SAS dans la transformation des cellules Bhas 42, première étape de la cancérogenèse chimique. Par une analyse globale de transcriptomique, nous avons mis en évidence une signature génique commune aux SAS testées. Au terme de cette étude, les avantages et les limites du modèle cellulaire Bhas 42 seront discutés, à l'instar des résultats.

Chapitre I : INTRODUCTION : ETAT DE L'ART

1. LES NANOMATERIAUX : Définitions et propriétés

C'est en 1974 que le terme « nanotechnologie » a été utilisé pour la première fois. « Nano » vient du grec *nannos* qui signifie nain. Les nanomatériaux sont des objets ayant au moins une dimension dont la taille est inférieure à 100 nm et peuvent être retrouvés dans l'environnement naturel ou produits de façon synthétique. Il existe deux types de nanomatériaux : les nano-objets et les matériaux nanostructurés (**Figure 1**). Les nano-objets présentent une, deux ou trois dimensions externes (longueur, largeur, profondeur/hauteur/épaisseur) à l'échelle du nanomètre. Parmi les nano-objets, il est possible de distinguer quatre catégories :

- les nanoparticules de forme sphérique qui possèdent les trois dimensions externes à l'échelle nanométrique et regroupent par exemple les **nanoparticules de silice (SiO₂)** ;
- les nanofibres, nanotubes, nanofilaments, nanobâtonnets qui sont des nano-objets dont deux dimensions externes sont de taille nanométrique et la troisième est significativement supérieure comme par exemple les nanotubes de carbone ;
- les nanofeuillets, nanoplats ou nanoplaquettes dont une seule dimension est de taille nanométrique tandis que les deux autres sont significativement supérieures comme par exemple les nanofeuillets d'argile ;
- les « quantum dot », qui sont des nanoparticules de taille extrêmement réduite, dont l'addition ou la perte d'un seul électron des atomes qui les constituent suffit pour changer leurs propriétés physiques.

Ces nano-objets peuvent être utilisés sous la forme de poudre, de suspension liquide ou de gel.

Les matériaux nanostructurés sont, quant à eux, des matériaux qui possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. Parmi eux, il est possible de distinguer plusieurs familles :

- les agrégats et agglomérats de nano-objets qui possèdent une forme individuelle ou sont sous forme d'agrégats ou d'agglomérats, comme c'est le cas des **particules de SiO₂ que nous avons étudiées** ;
- les nanocomposites ;
- les matériaux nanoporeux qui, eux, possèdent des pores nanométriques comme les aérogels de silice.

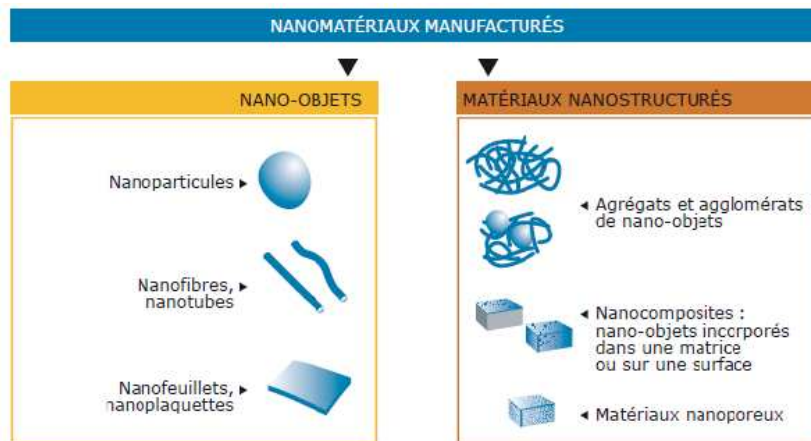


Figure 1 : Représentation schématique des différents nanomatériaux existants.

Le groupe des nano-objets comprend les nanoparticules qui sont sous forme sphérique, les nanofibres ou nanotubes qui sont, comme leur nom l'indique, sous forme de fibre ou de tube et les nanofeuillets ou nanoplaquettes sous forme plane. Dans le groupe des nanomatériaux nanostructurés, il est possible de retrouver des agrégats ou agglomérats de nano-objets, des nanocomposites qui sont des nano-objets incorporés dans une matrice ou sur une surface et les matériaux nanoporeux qui possèdent des pores nanométriques au niveau de leur structure (Witschger and Ricaud, 2012).

2. LES NANOMATERIAUX DE SILICE

2.1 Enjeux et domaines d'application

Les nanomatériaux sont, aujourd'hui, en pleine expansion car leurs propriétés permettent des avancées technologiques bénéfiques dans de nombreux domaines industriels ou de la santé. En effet, depuis une quinzaine d'années, les nanomatériaux ne sont plus seulement utilisés en laboratoire mais également en industrie où ils sont incorporés à de nombreux produits (Anses, 2014; Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie, 2018). Leur commercialisation est de plus en plus importante et elle favorise un développement économique considérable, notamment du fait du nombre et de la diversité des secteurs industriels concernés. Parmi les différents domaines industriels, nous pouvons citer l'informatique et l'électronique, la médecine, la cosmétique, l'alimentation, les bâtiments et travaux publics, les sports et loisirs. Dans cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux nanoparticules de silice car leurs domaines d'application sont nombreux notamment en raison de leur facilité de production et d'un coût faible (Chang et al., 2007). En effet, les nanoparticules de silice sont utilisées dans les peintures, les vernis, la colle, les déshydratants, les plastiques, le caoutchouc, les encres d'imprimerie, dans les dentifrices, les produits pharmaceutiques. Elles sont souvent employées comme agents isolants capables de minimiser la conduction de chaleur, agents de suspensions, agents épaississants et agents anti-coulures ; elles permettent de renforcer le caoutchouc et on les utilise aussi dans les emballages alimentaires ou comme additifs alimentaires (Dekkers et al., 2011). Jusqu'en 2012, près de 1,5 millions de tonnes de nanoparticules de silice avaient déjà été produites sur le marché mondial et en 2013, elles sont devenues l'un des trois nanomatériaux les plus produits au monde (Liljenström et al., 2013). De plus, les nanoparticules de silice sont synthétisées avec une biocompatibilité et une haute stabilité et sont donc prometteuses pour diverses applications diagnostiques ou thérapeutiques en médecine. Par exemple, elles sont utilisées en thérapie

anticancéreuse (Hirsch et al., 2003), pour la transfection d'ADN (Bharali et al., 2005) et en imagerie moléculaire (Shi et al., 2010) ou pour l'administration de médicaments (Venkatesan et al., 2005). La production industrielle à grande échelle et la commercialisation mondiale des nanoparticules de silice augmentent le risque d'expositions humaines et soulèvent l'inquiétude concernant leurs potentiels effets nocifs sur la santé (Murugadoss et al., 2017; Napierska et al., 2010). Ainsi, l'utilisation des nanoparticules de silice comme additifs alimentaires suscite beaucoup de débats (Dekkers et al., 2011).

Ainsi, les salariés des industries où sont manufacturées les nanoparticules de silice, le personnel des laboratoires de recherche ainsi que les consommateurs, sont exposés aux nanoparticules de silice. Mais à ce jour, il est difficile d'évaluer la durée et la fréquence des expositions ainsi que les mesures de protection mises en œuvre.

2.2 Les différentes formes de silice

La SiO_2 est une forme naturelle qui entre dans la composition de nombreux minéraux. Elle est retrouvée en grande majorité au niveau du manteau ou de l'écorce terrestre puisque cette dernière est en effet composée de plus de 60% de silice. La silice est un minéral très dur blanc ou transparent, pouvant se présenter sous différentes formes. Le quartz, la cristobalite et la tridymite existent sous forme cristalline tandis que la terre de diatomée (DE), une silice naturelle, est sous forme amorphe (Ricaud, 2007) **(Figure 2)**.

Le terme cristallin désigne le fait que les constituants sont assemblés de manière régulière comme le tétraèdre SiO_4 , qui se répète de façon périodique dans les trois dimensions de l'espace, alors que dans une structure amorphe, les tétraèdres SiO_4 n'ont pas de structure spatiale fixe (Institut de veille sanitaire, 2010) **(Figure 3)**.

Afin de tester un ensemble représentatif de nanomatériaux manufacturés, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux nanoparticules de silice amorphes synthétiques (SAS) précipitées (NM-200 et le NM-201) et pyrogénées (NM-202 et le NM-203) fortement produites à l'échelle industrielle (Tableau 1 caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules étudiées). Chacun de ces nanomatériaux provient d'un lot respectif de SAS fabriquées dans l'industrie.

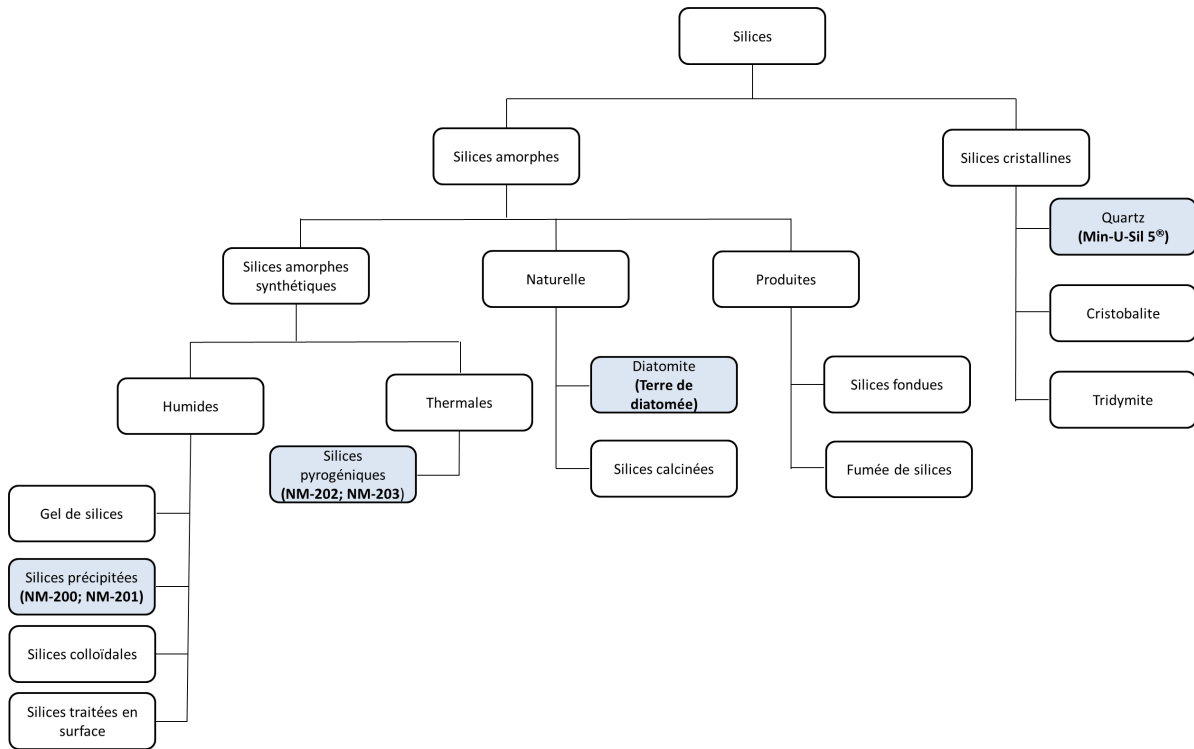


Figure 2 : Les différentes formes de silice. La silice existe sous deux formes : cristalline et amorphe (naturelle ou synthétique).

Parmi les silices cristallines, citons le quartz, la cristobalite et la tridymite. Les silices amorphes peuvent être naturelles comme la terre de diatomée, et obtenues suite à un procédé de production comme les fumées de silice ou synthétisées par une industrie. Les SAS sont obtenues à partir de deux principaux procédés industriels : par voie humide (silices précipitées, colloïdales et gels de silice) et par voie thermique (silices pyrogénées). En bleu sont représentées les particules étudiées au cours de cette thèse.

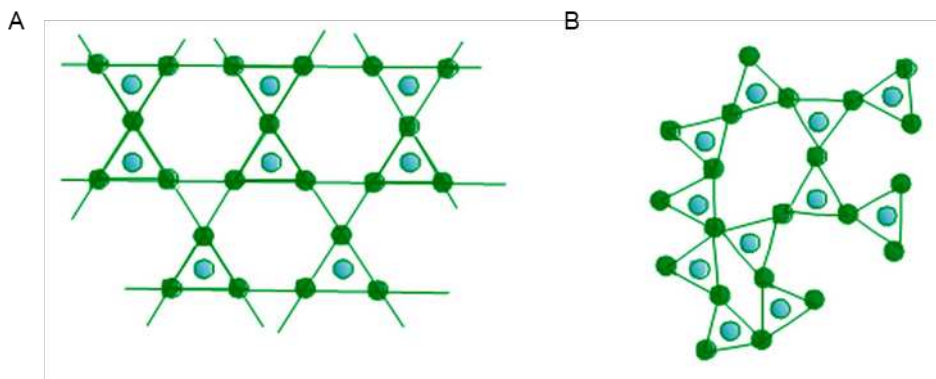


Figure 3 : Représentation bidimensionnelle de la silice.
A) Silice cristalline ; B) Silice amorphe.

2.3 Les nanoparticules de silice amorphes

2.3.1 Procédés de synthèse

Les SAS sont principalement synthétisées par un procédé à haute température, pour produire de la silice pyrogénée ou par un procédé humide à basse température pour former de la silice précipitée, colloïdale, ou des gels de silice (Napierska et al., 2010).

A. Les SAS précipitées

Le procédé de fabrication des silices précipitées consiste à faire réagir un acide sulfurique avec une solution de silicate de sodium. L'acide sulfurique permet l'acidification du silicate de sodium, dissous dans l'eau, qui produit un précipité gélatineux. Cette étape de synthèse est suivie d'une seconde étape de filtration permettant de récupérer la dispersion de silice, d'une étape de lavage consistant à éliminer les sels et les impuretés, puis des étapes de déshydratation et de broyage. Ensemble, ces différentes étapes permettent la formation progressive d'un dépôt et donc contribuent à la formation de silices précipitées contenant des pores de différentes tailles (Napierska et al., 2010; Rasmussen et al., 2013; Ricaud, 2007). Les SAS précipitées NM-200 et NM-201 sont produites par cette méthode.

B. Les SAS colloïdales

Afin d'obtenir des SAS colloïdales, une solution de silicate de sodium est passée sur des résines échangeuses de cations. Les SAS colloïdales sont des suspensions de particules de forme quasiment sphérique avec un diamètre compris entre 10 et 100 nm. Leur concentration en SiO_2 est, la plupart du temps, inférieure à 50 % en masse et elles sont stables dans l'eau (Napierska et al., 2010; Ricaud, 2007).

C. Les gels de silice

Le gel de silice est un polymère d'acide silicique $\text{Si}(\text{OH})_4$ formé à partir de silicate de sodium. La fabrication des gels de silice se fait de la même manière que celle de la silice précipitée mais à un pH différent. L'acide sulfurique va donc réagir avec la solution de silicate de sodium à un pH inférieur à 7 (Napierska et al., 2010; Ricaud, 2007). Suite à cette étape de synthèse est obtenue une suspension d'hydrogel correspondant à de très fines particules de silice qui subiront par la suite des étapes de filtration, de lavage et de séchage afin d'obtenir un gel de silice poreux (Napierska et al., 2010; Ricaud, 2007).

D. Les SAS pyrogénées

Les SAS pyrogénées ou de pyrohydrolyse sont synthétisées industriellement par hydrolyse du tétrachlorure de silicium (SiCl_4) à très haute température ($> 1000^\circ\text{C}$) dans une flamme d'hydrocarbure riche en oxygène. Sous la flamme, des molécules d'hydrogène réagissent avec les molécules d'oxygène de l'air pour former de l'eau qui en réagissant avec le SiCl_4 entraînent la formation du SiO_2 en éliminant des groupements HCl formés (Rasmussen et al., 2013; Ricaud, 2007).

Ce processus peut être exprimé par les équations simples suivantes :

- $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{SiCl}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiO}_2 + 4 \text{HCl}$
- $2\text{H}_2 + \text{O}_2 + \text{SiCl}_4 \rightarrow \text{SiO}_2 + 4 \text{HCl}$

Une des caractéristiques du procédé de synthèse des SAS pyrogénées est que les substances sont introduites dans la flamme à l'état gazeux. Dans la chambre de combustion, le SiCl_4 est vaporisé en premier puis mélangé avec l'air et l'hydrogène. Au fur et à mesure que les composés progressent dans la chambre de combustion, de minuscules particules se forment et restent à l'état liquide à haute température. Elles fusionnent entre elles et forment des gouttelettes plus grosses. Dans les zones plus froides de la flamme, les gouttelettes commencent à se solidifier et fusionnent partiellement entre elles pour former des agrégats. Dans les zones encore plus froides de la flamme, les agrégats se solidifient totalement et se lient les uns aux autres par des interactions faibles pour former des agglomérats. La variation de la concentration des réactifs, de la température de la flamme et du temps de séjour du gaz dans la chambre de combustion permet aux fabricants de contrôler les propriétés physico-chimiques de ces SAS telles que la surface spécifique et la taille des particules (Rasmussen et al., 2013). Ce procédé permet de produire les SAS pyrogénées NM-202 et NM-203.

2.3.2 Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules étudiées

Les principales caractéristiques des SAS précipitées NM-200, NM-201, et des SAS pyrogénées NM-202 et NM-203, sont présentées dans le **tableau 1** (Fontana et al., 2017). Ces 4 SAS existent sous forme amorphe et leur taille primaire est d'environ 20 nm. Leur surface spécifique est du même ordre de grandeur (de 189 à 204 m^2/g) sauf celle de la SAS précipitée NM-201 qui se distingue des autres, avec une surface spécifique de 140 m^2/g . Les impuretés des échantillons de SAS en sodium, soufre, calcium et aluminium, sont inférieures à 1%. L'analyse de la diffusion dynamique de la lumière (en anglais, *dynamic light scattering* ; DLS) des SAS dispersées dans l'eau montre qu'elles se présentent sous forme d'agrégats avec un diamètre de 252,9 à 318,7 nm. L'indice de polydispersion des SAS est d'environ 0,5, indiquant la présence d'une population hétérogène en taille. La SAS précipitée NM-200 n'est pas analysable en DLS.

Tableau 1 : Caractérisations physico-chimiques des particules de silice.
(Fontana et al., 2017)

Silices	Origine	Principale Phase	Taille particule ^a (nm)	Impurtés (wt%) ^b	BET SSA (m ² /g) ^c	DLS ^d	
						Z-average dans l'eau (nm)	Indice de polydispersion
NM-200	précipitée	amorphe	18,3 ± 4,5	Al (0,87); Na (0,88); S (0,46)	189	ND ^e	ND
NM-201	précipitée	amorphe	18,0 ± 1,0	Al (0,74); Na (0,44); S (0,46)	140	252,9 ± 11,3	0,583 ± 0,019
NM-202	pyrogénée	amorphe	17,7 ± 2,5	Al (0,45); Ca (0,18)	204	232,8 ± 7,3	0,441 ± 0,012
NM-203	pyrogénée	amorphe	24,7 ± 17,7	Al (0,43); S (0,04)	204	318,7 ± 4,9	0,423 ± 0,026

^a La taille a été déterminée par microscopie électronique à transmission.

^b La nature des impurtés a été déterminées par spectrométrie de dispersion d'énergie.

^c La surface spécifique Brunauer-Emmet-Teller (BET) a été déterminée par adsorption d'azote. En injectant un nombre connu de molécules d'azote gazeuses dans un tube contenant des nanoparticules, l'azote s'adsorbe sur la surface de l'ensemble des particules en formant une monocouche. Après dégazage des molécules non adsorbées et en connaissant la valeur de la surface des molécules de gaz adsorbées en monocouche, la surface spécifique va alors pouvoir être déterminée par l'équation suivante :

$S = n \times S_m$; Où : S = surface totale de l'échantillon ; n = nombre de molécules de gaz adsorbées en monocouche ; S_m = surface d'une molécule de gaz.

^d La DLS a été réalisée à l'aide d'un Nanozetasizer (Malvern). Les échantillons ont été dispersés dans de l'eau comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs représentent la moyenne ± écart type de trois analyses DLS. La DLS est une technique d'analyse spectroscopique utilisée afin de déterminer le diamètre apparent de particules en suspension dans un liquide.

^e Non déterminé, les données obtenues par analyse DLS ne répondaient pas aux critères de qualité.

3. TOXICITE DES NANOPARTICULES : LE «RISQUE NANO»

3.1 Généralités

Les nanomatériaux sont utilisés dans divers domaines d'application, impliquant des risques pour la santé et l'environnement. De nombreuses études se sont intéressées à la toxicité des nanomatériaux ainsi qu'à la caractérisation de l'exposition de la population générale ou des travailleurs en industries afin de définir leurs risques pour la santé, même si les résultats de ces études sont souvent discutés. En effet, la mesure des expositions aux nanomatériaux dans l'air ambiant étant complexe, les doses auxquelles les populations sont susceptibles d'être exposées sont difficiles à évaluer. Il est souvent reproché que les doses de nanomatériaux employées dans les systèmes expérimentaux sont trop élevées par rapport aux concentrations présentes dans l'environnement. Par ailleurs, les études toxicologiques montrent qu'il est difficile de définir des profils toxicologiques généraux pour les nanomatériaux car l'ensemble des paramètres physico-chimiques qui les caractérisent (composition

chimique, taille, forme) influencent les mécanismes de toxicité mis en jeu (Anses, 2014; Krug and Wick, 2011). Des incertitudes sur les risques que pourraient représenter les nanomatériaux existent.

3.2 Voies d'exposition

La peau humaine, les poumons et le tractus gastro-intestinal sont en contact permanent avec l'environnement. Alors que la peau est généralement une barrière efficace contre les substances étrangères, les poumons et le tractus gastro-intestinal sont plus vulnérables. Ces trois voies sont les points d'entrée les plus probables des nanomatériaux naturels, anthropiques ou manufacturés dans l'organisme.

3.2.1 La voie respiratoire

De nombreuses études, en milieu professionnel, se sont appuyées sur la voie respiratoire plutôt que sur les autres voies, car les nanomatériaux pénètrent principalement par cette voie chez les travailleurs exposés (Anses, 2014). Les modèles de dépôt des particules dans les poumons en fonction de leur taille (ICRP, 1994) montrent que les nanomatériaux sont susceptibles de se déposer à tous les niveaux de l'arbre trachéo-bronchique : trachée, bronches et alvéoles pulmonaires et également dans des régions extrathoraciques telles que les fosses nasales (**Figure 4**) (Krug and Wick, 2011; Oberdörster et al., 2005). Environ 90% des particules de 1 nm inhalées se déposent ainsi dans le compartiment nasopharyngé, et seulement 10% se déposent dans la région trachéobronchique et aucune dans la région alvéolaire (Oberdörster et al., 2005). Quant aux particules inhalées de 5 nm, elles se déposent de façon comparable (environ 30%) dans les trois régions. Enfin, les particules de 20 nm se déposent majoritairement dans la région alvéolaire (50%), tandis qu'elles se déposent plus faiblement (15%) dans les régions trachéobronchiques et nasopharyngées. La taille influe donc sur la quantité déposée et cela peut avoir des conséquences sur les effets toxicologiques induits par les nanomatériaux inhalés et sur leur répartition dans les différents organes.

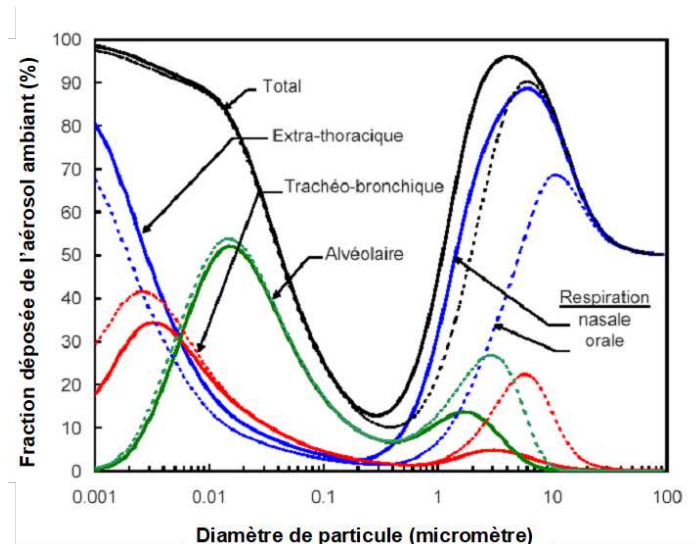


Figure 4 : Prédiction des dépôts des particules dans la voie respiratoire chez l'Homme en fonction de la taille des particules.
(ICRP, 1994)

Les SAS étudiées durant cette thèse présentent un risque d'inhalation en raison de leur structure extrêmement fine (taille d'environ 20 nm) et les travailleurs qui les synthétisent ou les utilisent sous forme de poudre, sont la première population exposée. En conséquence, une attention devrait être portée aux deux autres voies de pénétration compte tenu de l'utilisation croissante des SAS dans les divers domaines tels que la cosmétique et l'alimentation.

3.2.2 La voie cutanée

La pénétration percutanée des nanomatériaux a été étudiée en particulier pour les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) (d'environ 20 nm) qui rentrent dans la composition de nombreux produits cosmétiques. Les nanoparticules de TiO₂ n'ont pas la capacité de traverser les couches supérieures de l'épiderme, mais elles peuvent s'accumuler au niveau des follicules pileux. De faibles quantités peuvent alors entrer par l'orifice du follicule et atteindre l'intérieur du derme. La pénétration cutanée des nanomatériaux peut aussi être facilitée dans les zones où la peau subit des frottements répétitifs et dans les zones lésées (Pflücker et al., 2001).

3.2.3 La voie orale

Par la voie orale, les nanomatériaux rejoignent le système gastro-intestinal. Les nanomatériaux contenus dans les aliments ingérés peuvent être absorbés par le tractus gastro-intestinal selon leur taille, leur hydrophobicité et leur charge. En règle générale, les nanomatériaux sont éliminés en majorité *via* les fèces ou les urines (Hillyer and Albrecht, 2001; Krug and Wick, 2011; Volkheimer, 1974). De plus, bien qu'il soit difficile pour les nanoparticules de migrer dans la circulation sanguine en raison des nombreuses couches de cellules constituant les vaisseaux sanguins, des particules de silice cristallines d'un diamètre de 150 µm ont été trouvées dans la lumière des vaisseaux lymphatiques et sanguins, mais avec une répartition hétérogène dans l'intestin (Krug and Wick, 2011; Volkheimer, 1974). A l'heure

actuelle, il n'est pas possible d'établir le mode de pénétration et l'accumulation de nanomatériaux au niveau du tractus digestif.

3.2.4 Le franchissement des barrières biologiques

La taille des nanomatériaux facilite leur pénétration dans les cellules. Les nanomatériaux ont la capacité à passer les barrières biologiques afin de rejoindre le sang ou la lymphe et ainsi être véhiculés vers différents organes (Geiser et al., 2005). Ils peuvent alors rejoindre des organes fortement irrigués comme le foie, la rate, le cœur (Oberdörster et al., 2005). Ils peuvent également passer la barrière nasale et emprunter les nerfs olfactifs, et gagner le système nerveux central et les ganglions (Elder et al., 2006; de Lorenzo, 1970; Oberdörster et al., 2004).

3.2.5 Les nanomatériaux pourraient être impliqués dans certaines maladies

Buzea et ses collaborateurs en 2007 ont publié une revue dans laquelle ils résument les effets nocifs possibles sur la santé, associés à l'inhalation, à l'ingestion et au contact avec divers nanomatériaux d'origine naturelle ou produits non intentionnellement (par exemple les nanoparticules des fumées de diesel). Les maladies potentiellement associées aux nanomatériaux inhalés seraient l'asthme, la bronchite, l'emphysème, le cancer du poumon et les maladies neurodégénératives, telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (**Figure 5**). La présence de nanomatériaux dans le tractus gastro-intestinal a été associée à la maladie de Crohn et aux cancers du côlon. Les nanomatériaux qui pénètrent dans le système circulatoire ont été liés à l'apparition de l'artériosclérose, aux caillots sanguins, à l'arythmie, aux maladies cardiaques (Buzea et al., 2007; Waalkes, 2003). Les nanomatériaux pénétrant à l'intérieur des autres organes comme le foie et la rate pourraient également être à l'origine de maladies telles que le cancer (Buzea et al., 2007; Waalkes, 2003). Enfin, l'exposition à certains nanomatériaux a été associée à l'apparition de maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie et l'arthrite rhumatoïde (Buzea et al., 2007).

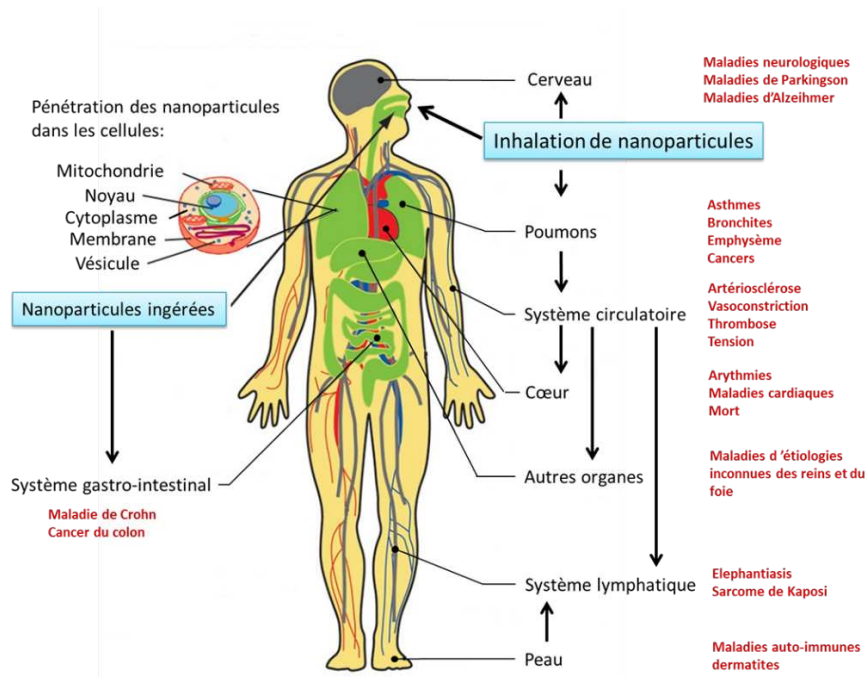


Figure 5 : Schéma du corps humain présentant les différentes voies d'exposition aux nanoparticules, les différents organes affectés, et les maladies associées.

Les effets mentionnés dans cette figure sont issus de données concernant les nanomatériaux d'origines naturelle ou anthropique et ne concernent pas encore les nanomatériaux manufacturés. Ce schéma résume les effets néfastes possibles sur la santé associée à l'inhalation, à l'ingestion et au contact avec des nanoparticules (Buzea et al., 2007).

3.3 Propriétés des nanomatériaux pouvant influencer leur toxicité

Tous les nanomatériaux ne sont pas toxiques ; la toxicité dépend de différents paramètres biologiques physico-chimiques. Comme mentionné plus haut, la distribution des nanomatériaux dans le corps dépend de leur taille (De Jong et al., 2008; Hillyer and Albrecht, 2001). Les nanomatériaux sont alors plus toxiques que les particules de taille supérieure (micrométriques) et sont redistribués plus facilement dans tout l'organisme. De plus, selon (Hsiao and Huang, 2011; Lam et al., 2004; Yang et al., 2009), la forme fibreuse ou filamenteuse des nanoparticules peut influencer leur toxicité. Les particules longues comme les nanotubes ou les nanofilaments sont plus toxiques que les particules sphériques de composition chimique identique. La toxicité peut également être influencée par leur degré d'hydrophobicité ainsi que leur état de charge. Les nanoparticules chargées positivement sont plus cytotoxiques que celles chargées négativement. En effet, les particules chargées positivement se retrouvaient en quantité plus importante dans l'estomac, le foie, la rate, l'intestin grêle que les particules anioniques (Jani et al., 1989). En revanche, ces dernières entraîneraient une perturbation plus prononcée de l'intégrité de la membrane plasmique, des dommages plus importants aux mitochondries et aux lysosomes que les nanoparticules anioniques (Fröhlich, 2012). Des SAS chargées positivement se sont par exemple avérées plus cytotoxiques dans une lignée de macrophages alvéolaires de rat (NR8383) en terme de réduction de l'activité métabolique mitochondriale que des SAS neutres, tandis que les SAS chargées négativement n'ont montré que très peu ou pas de cytotoxicité (Bhattacharjee et al., 2010).

Par ailleurs, (Krug and Wick, 2011) ont décrit trois paramètres biologiques importants justifiant la toxicologie particulière des nanomatériaux vis-à-vis des autres agents chimiques :

- La pénétration intra-cellulaire :

Différents mécanismes de pénétration cellulaire peuvent être envisagés dans le cas des nanomatériaux (Krug and Wick, 2011) (**Figure 6**). Outre la phagocytose qui s'applique aussi aux particules de taille micrométrique, le passage transmembranaire des nanomatériaux est possible par pinocytose ou *via* la formation de vésicules de clathrine ou de calvéoline. Bien que moins probable, le passage par diffusion libre ou par l'intermédiaire de récepteurs membranaires a également été proposé. Le principe du « Cheval de Troie » est souvent cité dans le mode d'action de la toxicité des nanomatériaux (Krug and Wick, 2011). Dans le cytoplasme, les vésicules de calvéoline contenant les nanomatériaux fusionnent entre elles pour former des lysosomes. Or, le milieu intérieur acide des lysosomes facilite la dissolution de certains nanomatériaux tels que l'oxyde de zinc ou de cuivre, qui verraient ainsi leur activité toxique accrue par cette voie détournée.

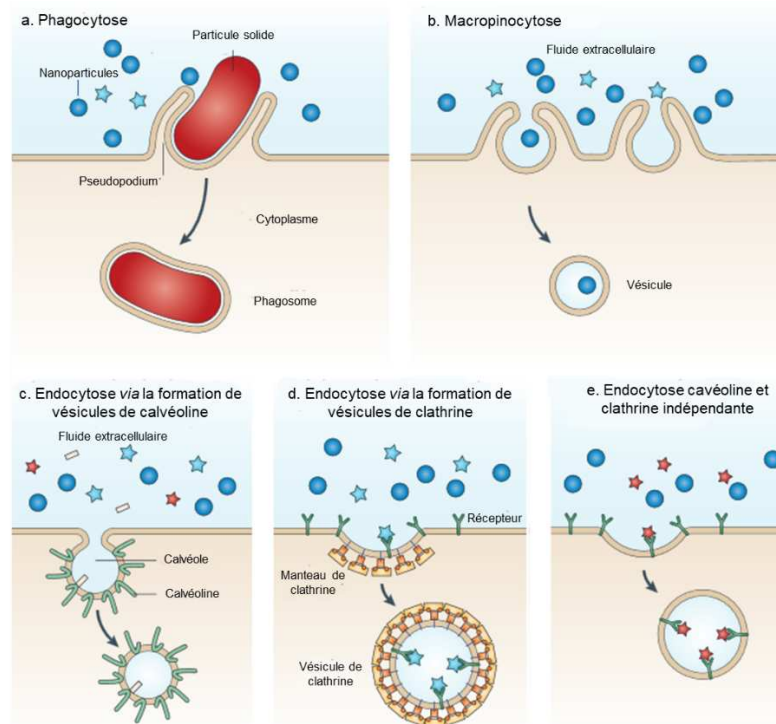


Figure 6 : Modes d'internalisation cellulaire des particules.

(a) Internalisation des particules d'une taille $>$ à $0,5 \mu\text{m}$ par phagocytose; (b) Internalisation non-spécifique de particules d'une taille de $1 \mu\text{m}$ de diamètre par macropinocytose. Internalisation des petites particules par endocytose *via* la formation de vésicules de calvéoline (c), par endocytose *via* la formation de vésicules de clathrine (d), par endocytose calvéoline et clathrine indépendante (e), chacune ayant des contraintes de taille spécifiques. D'après (Petros and DeSimone, 2010).

- Effets « surface » :

La surface spécifique des particules (rapport surface/masse) augmente de manière exponentielle inversement avec leur taille (Krug and Wick, 2011). Ainsi, à masse égale, une particule de 100 nm se retrouve avec une surface spécifique calculée 100 fois supérieure à une particule de 1 μm . Ce paramètre intervient comme facteur de toxicité. Il est admis que de nombreux nanomatériaux exercent leur activité toxique *via* des réactions chimiques entre leur surface et le milieu physiologique. Dans ces conditions, à masse égale (et à composition chimique identique), l'effet toxique sera en théorie d'autant plus élevé que sa surface spécifique sera élevée (et par conséquent sa taille petite). De ce fait, de nombreux auteurs pensent que la surface spécifique est la métrique la plus pertinente dans les essais toxicologiques avec des nanomatériaux (**Figure 7**).

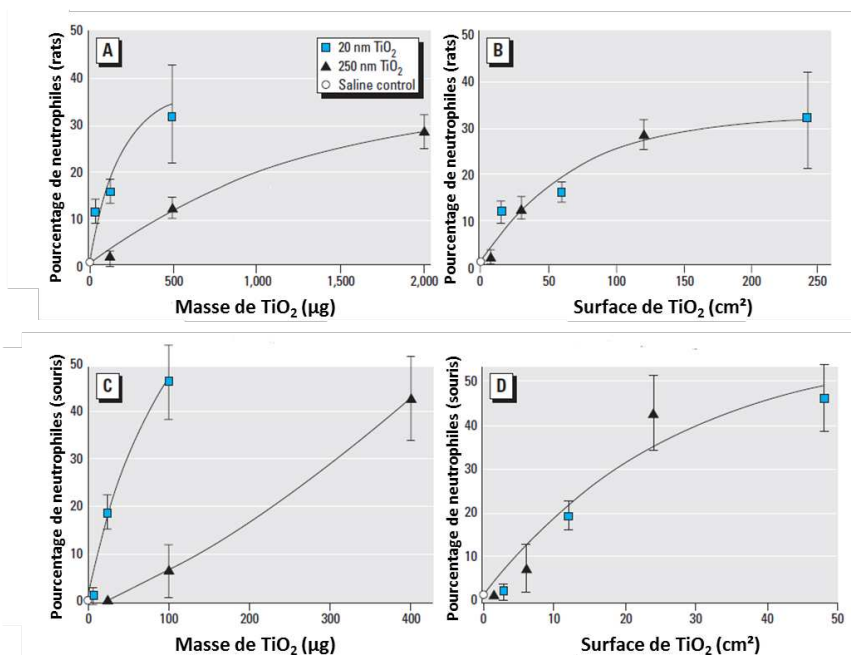


Figure 7 : Pourcentage de neutrophiles dans le lavage pulmonaire de rats (A, B) et de souris (C, D) comme indicateur de l'inflammation 24 heures après l'instillation intra-trachéale de différentes doses de particules de TiO₂ de 20 nm et 250 nm chez le rat et la souris.

(A, C) À dose égale, le TiO₂ (20 nm) entraîne une augmentation plus importante du nombre de neutrophiles comparée au TiO₂ (250 nm). (B, D) L'effet inflammatoire est corrélé avec la surface des deux particules suggérant que la surface de la particule, semble être une métrique plus appropriée afin de comparer les effets de particules de tailles différentes, à condition qu'elles soient de même structure chimique (le dioxyde de titane dans ce cas).

- Le matériau considéré :

L'impact de la composition chimique sur les systèmes biologiques l'emporte souvent sur la taille ou la forme du nanomatériau. La composition des nanomatériaux est un déterminant critique de la réponse intra-cellulaire, du degré de cytotoxicité et des mécanismes potentiels de toxicité (Sohaebuddin et al., 2010). Ceci contribue à rendre les études toxicologiques difficiles, puisque chaque groupe est associé à une chimie de surface particulière capable d'influencer la toxicité des nanoparticules de façon spécifique. Par exemple, l'effet exercé par l'oxyde de zinc sera complètement différent de celui exercé par d'autres nanomatériaux de tailles et de formes comparables mais constitués d'atomes de fer, d'aluminium, de silicium, de cérium ou d'autres éléments (Krug and Wick, 2011).

Enfin, la réactivité de surface des nanomatériaux avec le milieu environnant sera aussi fonction de la disposition spatiale, du nombre des atomes réactifs en surface de la particule et également du degré d'agrégation des particules. En effet, du fait de leur grande réactivité de surface, les nanoparticules se trouvent rarement sous forme individuelle : elles sont capables de former très rapidement des agrégats, c'est-à-dire un ensemble de particules de petite taille fortement liées ou encore des agglomérats qui sont, un ensemble d'agrégats faiblement liés de plus grande taille. La taille de ces agrégats et agglomérats est comprise entre environ 0,1 et plusieurs dizaines de microns (INRS, 2013). La surface spécifique totale d'un agrégat étant la somme des surfaces des nanoparticules qui le composent, les propriétés physico-chimiques ainsi que les effets biologiques des nanoparticules agrégées peuvent alors être considérablement modifiés. La toxicité des agrégats de nanoparticules doit alors être prise en considération (Witschger and Fabries, 2005). La grande taille des agglomérats rend difficile leur internalisation par les cellules, modifiant ainsi leur toxicité. La taille et l'état d'agglomération de nanoparticule conditionnent le site de dépôt dans les voies respiratoires et affectent la réponse pulmonaire, les mécanismes de clairance pulmonaires ainsi que l'endocytose (Noël et al., 2013).

3.4 Toxicité des SAS

Bien que les SAS aient d'abord été considérées comme faiblement toxiques, de nombreuses études récentes menées sur des modèles animaux ou des lignées cellulaires ont montré qu'elles peuvent provoquer des effets biologiques indésirables. La littérature sur la toxicité des SAS a été abondamment revue et récemment mise à jour (Murugadoss et al., 2017; Napierska et al., 2010). La réponse toxique aux SAS dépend également du type de cellules et des voies d'exposition des animaux (Murugadoss et al., 2017).

3.4.1 Etudes épidémiologiques

Les premières données de santé chez des travailleurs exposés professionnellement aux SAS ont été rapportées dans les années 1980. Les études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre l'exposition aux SAS et le développement de fibrose pulmonaire. (Brambilla et al., 1980) ont montré que 10 travailleurs d'une usine de fabrication de silices ont développé une fibrose interstitielle et une inflammation pulmonaire. De même, (Song et al., 2009) ont réalisé une étude épidémiologique, en

Chine, pour laquelle ils ont suivi un groupe de jeunes femmes exposées, sans aucune mesure de protection, à des SAS pendant 5 à 13 mois lors du recouvrement de nanocomposites utilisés en imprimerie. Hospitalisées pour dyspnée, épanchements pleuraux et péricardiques itératifs, les examens histologiques des poumons ont montré en plus une inflammation, une fibrose et la formation de granulomes (tumeurs inflammatoires au niveau du tissu pulmonaire).

Par ailleurs, la première cohorte professionnelle des travailleurs exposés aux différents nanomatériaux industriellement produits a été mise en place à Taiwan dans les années 2010 dans 14 entreprises de production et/ou utilisation de TiO₂, SAS, nanotubes de carbone, nano argent et nano résines (Liou et al., 2014). L'étude montrait une relation entre l'exposition, l'éternuement et l'aggravation de la dermatite allergique (Liao et al., 2014). Le suivi sur 6 mois des sujets montrait un effet de l'exposition sur des biomarqueurs de l'inflammation pulmonaire, du stress oxydant/activités anti-oxydantes, des marqueurs cardiovasculaires, de la génotoxicité, et un effet sur les épreuves fonctionnelles pulmonaires et les tests neurocomportementaux (Liao et al., 2014; Liou et al., 2014). En revanche, plus récemment, une étude transversale a été conduite en Allemagne pour analyser l'effet de l'exposition aux différentes formes de SAS (basée sur des données historiques d'exposition) et la santé respiratoire (hors cancer) (Taeger et al., 2016). Chez les salariés de cinq usines de production de SAS pyrogénées et précipitées, le seul effet montré sur la fonction pulmonaire a été une modeste diminution de la capacité vitale forcée (Volume d'air expulsé avec force jusqu'au volume résiduel), mais sans signe radiologique de silicose. Peu d'études épidémiologiques ont été réalisées et il est difficile de statuer sur les risques pour la sécurité et la santé des travailleurs exposés aux nanoparticules de silice amorphes. Pourtant, à l'exception de (Taeger et al., 2016), l'ensemble des études mettent en évidence une toxicité des nanoparticules de silice amorphe. De plus, bien que (Song et al., 2009) soient les seuls à avoir mis en évidence la formation de granulomes pulmonaires, le risque de développer un cancer suite à une exposition aux SAS est donc patent.

3.4.2 In vivo

Tableau 2 : Etudes in vivo

LDH: Lactate déshydrogénase; LPO: Peroxydation lipidique; Pyr: Pyrogénée; Pre: Précipitée

Animaux	Type SAS	Taille	Doses et durée	Résultats obtenus							
				Cytotox ↑	Viabilité cellulaire ↓	Intégrité membranaire	Génotoxicité	Cycle cellulaire	Stress oxydant	Inflammation	Références
Rats	Pyr AEROSIL 200® AEROSIL R974® Pre Sipernat 22S	-12nm -18 nm	-1, 6 ou 30 mg/m ³ -30 mg/m ³ -30 mg/m ³ pendant 6 h / jour, 5 jours / semaine pendant 13 semaines par inhalation							oui	(Reuzel et al., 1991)
Rats Wistar	Pre Zeosil 45 Pyr Cab-O-SilM5	Taille des agglomérats : -20 à 50 µm -100 µm	1, 5, 25 mg/m ³ pendant 6h/jour pendant 5 jours par inhalation	oui	oui	LDH ↓				oui	(Arts et al., 2007)
Rats	Pre Zeofree 80	1000 à 3000 nm	1 ou 5 mg/kg pendant 24h par instillation intra-trachéale	oui	oui	LDH ↓				oui	(Sayes et al., 2007)
Rats mâles Sprague-Dawley	Pre NM-200, NM-201 Pyr NM-202 NM-203	18 à 24 nm	3, 6, et 12 mg/kg pendant 3h, 24h et 48h par instillation intra-trachéale 5, 10, and 20 mg/kg par injection intra-veineuse				Comètes et micronoyaux : Non			oui	(Guichard et al., 2015)
Rats	Pyr		3 mg par instillation intra- trachéales (5 instillations)	Augmentation de l'incidence des tumeurs							(Pott and Roller, 2005)
Rats	Pyr		0,5 mg par instillation intra-trachéale (30 instillations) pendant 29 mois	Augmentation de l'incidence des tumeurs							(Kolling et al., 2011)
Rats femelles âgées de 38 jours et rats mâles âgés de 42 jours.	Pyr AEROSIL R972® Pre Sipemat D 17	-7 à 16 nm -22 nm.	2500 mg/kg ou 5000 mg/kg 5040, 6350, ou 7900 mg/kg durant 4 jours par gavage	Pas de formation de tumeurs			Non			non	(Lewinson et al., 1994)
Rats Sprague-Dawley	Pyr Pre NM-202	-7 nm - 10 à 25 nm	100, 1000, 2500 mg/kg bw durant 28 jours 2500 mg/kg bw durant 84 jours via la nourriture	non	non					oui fibrose	(van der Zande et al., 2014)
Rat Sprague-Dawley	Pre NM-200, NM-201 Pyr NM-202 NM-203	18 à 24 nm	5, 10 et 20 mg/kg bw durant 0, 24 et 45h par gavage oral				Comètes : Non Micronoyaux : Oui dans le côlon		Non Test LPO		(Tarantini et al., 2015a)

3.4.3 Ex vivo

Tableau 3 : Etudes ex vivo

LDH: Lactate déshydrogénase ; HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase ; Pyr : Pyrogénée ; Pre : Précipitée

Cellules	Type SAS	Taille	Doses et durée	Résultats obtenus								
				Cytotox ↑	Viabilité cellulaire ↓	Intégrité membranaire	Génotoxicité	Cycle cellulaire	Stress oxydant	Inflammation	Références	
-Cellules épithéliales alvéolaires -Macrophages -Cellules épithéliales bronchiolaires terminales de rats	Pyr AEROSIL 200®		3 mg / m ³ ou 50 mg/m ³ pendant 6 h / jour, 5 jours / semaine, pendant une durée allant jusqu'à 13 semaines par inhalation subchronique	oui	oui	LDH ↓	HPRT : Non				oui	(Johnston et al., 2000)
érythrocytes humains obtenus à partir de sang frais	Pre FK320 Pyr A50	-15 nm -40 nm	6,25 ; 12,5, 25 ; 50 ; 100 ; 200 cm ² /mL							Oui Spectroscopie par résonance paramagnétique		(Pavan et al., 2013)

En lien avec les études épidémiologiques, des études *in vivo* ont également mis en évidence la toxicité des SAS. Les effets pulmonaires chez le rat après exposition par inhalation pendant 13 semaines à différentes SAS (1 ; 6 et 30 mg/m³), incluant l'AEROSIL 200® (SAS pyrogénée), indiquaient par exemple une augmentation du poids des poumons, une accumulation de macrophages alvéolaires ainsi que des affections pulmonaires telles qu'une inflammation, une bronchiolisation alvéolaire (épaississement des parois alvéolaires), une fibrose et des lésions granulomateuses. Parmi les SAS testées, la SAS pyrogénée NM-203 produisait les effets les plus aigus (Reuzel et al., 1991) (**Tableau 2**). Les effets sur le tissu pulmonaire ont aussi été étudiés par inhalation de SAS pyrogénées et précipitées chez des rats à des doses de 1 ; 5 et 25 mg/m³ pendant 5 jours. L'exposition a entraîné des changements histopathologiques sévères au niveau des poumons tels qu'une accumulation intra-alvéolaire de macrophages et de granulocytes, ainsi qu'une hypertrophie bronchiale et bronchiolaire (Arts et al., 2007). Les SAS précipitées NM-200, NM-201, ou pyrogénées NM-202 et NM-203 ont toutes induit une inflammation chez des rats exposés à 6 et 12 mg/kg de particules après 3h, 24h et 48h par instillation intra-trachéale mise en évidence par l'augmentation du nombre de neutrophiles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (Guichard et al., 2015; Johnston et al., 2000). De plus, l'exposition de rats, *via* la nourriture, à la SAS pyrogène NM-202 induisait une fibrose hépatique (van der Zande et al., 2014). Quelques études se sont intéressées à la cytotoxicité induite par les SAS et on mis en évidence la capacité du Zeosil 45, du Cab-O-SilM5, du Zeofree 80 et de la SAS pyrogénée NM-203 à induire une cytotoxicité cellulaire avec perte d'intégrité membranaire (Arts et al., 2007; Johnston et al., 2000; Sayes et al., 2007) (**Tableau 2 et 3**). En revanche, seules deux études *in vivo* se sont intéressées au stress oxydant. Alors que (Pavan et al., 2013) ont montré la capacité de deux SAS, FK320 (précipitée) et A50 (pyrogénée) à induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ; Reactive Oxygen Species), (Tarantini et al., 2015a, 2015b) n'ont pas mis en évidence la capacité des SAS précipitées, NM-200 et NM-201, ou pyrogènes, NM-202 et NM-203, à induire une peroxydation lipidique (**Tableau 2 et 3**). Concernant les effets génotoxiques *in vivo*, l'AEROSIL 200® (SAS pyrogénée) n'a pas induit de mutation du gène hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) dans les cellules épithéliales alvéolaires de rats exposés par inhalation 6 heures/jour, 5 jours/semaine pendant 13 semaines, mis en évidence grâce au test HPRT (Johnston et al., 2000). De plus, la réalisation d'un test des comètes sur les cellules du poumon, du sang, de la rate, du foie, de la moelle osseuse, des reins et du liquide de lavage bronchoalvéolaire et d'un test des micronoyaux sur les érythrocytes a permis d'établir qu'aucune SAS pyrogénée (NM-202, NM-203) ou précipitée (NM-200, NM-201) n'a induit de cassures de l'ADN et de formation de micronoyaux chez des rats exposés à 6 ou 12 mg/Kg de SAS par instillation intra-trachéale 6 heures/jour, 5 jours/semaine pendant 13 semaines (Guichard et al., 2015). De même, l'exposition aux SAS n'a induit aucune cassure de l'ADN des cellules du sang, de la moelle osseuse, du foie, de la rate, des reins, du duodénum et du côlon quels que soient la dose ou l'organe étudié chez des rats gavés à 5, 10 ou 20 mg/kg de poids corporel/jour pendant trois jours (Tarantini et al., 2015a). De manière concomitante, la réalisation d'un test des micronoyaux sur la moelle osseuse et le côlon n'a montré aucune augmentation des dommages chromosomiques dans la moelle osseuse. Cependant, une faible augmentation du pourcentage de cellules micronucléées a été observée dans le côlon de rats traités avec les deux SAS pyrogénées à la dose la plus faible (5 mg / kg de poids corporel/jour) (Tarantini

et al., 2015a) (**Tableau 2 et 3**). Sur l'ensemble des études *in vivo* et *ex vivo*, peu se sont intéressées au potentiel cancérigène des SAS. Alors que (Lewinson et al., 1994) n'avaient pas observé de formation de tumeurs suite à l'exposition de rats femelles à l'AEROSIL R972® (pyrogénée) et au Sipemat D 17 (précipitée), deux études de cancérogenèse à long terme chez le rat, ont montré que l'instillation intra-trachéale répétée de SAS pyrogénées; cinq instillations (Pott and Roller, 2005) ou trente instillations (Kolling et al., 2011) augmentaient l'incidence des tumeurs du poumon chez les rats exposés (**Tableau 2**).

3.4.4 *In vitro* sur des lignées humaines

Tableau 4 : Etudes *in vitro* sur des lignées humaines

GSH : Glutathion ; DCFDA : 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceine di-acétate ; SOD : Superoxyde dismutase ; LDH: Lactate déshydrogénase; Pyr : Pyrogénée ; Pre : Précipitée

Lignées cellulaires	Type SAS	Taille	Doses et durée	Résultats obtenus							Références
				Cytotox ↑	Viabilité cellulaire ↓	Intégrité membranaire	Génotoxicité	Cycle cellulaire	Stress oxydant	Inflammation	
Caco-2 (carcinome colique)	Pyr	14nm	20 et 80 µg/cm ² pendant 4h ou 24h			LDH ↓	Comètes :Oui		Oui GSH ↓		(Gerloff et al., 2009)
clone C2BBE1 isolé de lignée Caco-2	Pyr	12 nm	10 µg/cm ² durant 24 h	non	non	non					(McCracken et al., 2013)
Caco-2	Pyr ou Pre	10 à 50 nm	10 à 600 µg/mL durant 24, 48 et 72h	oui	oui	LDH ↓		arrêt en phase G2/M	Non (DCFDA)		(Yang et al., 2014)
HT-29 (carcinome colique)	Pyr AEROSIL 200® AEROSIL Ox50®	12 et 40 nm	0,03 à 156,3 µg/cm ² durant 24h	oui	oui	LDH ↓	Comètes : Non		Non (DCFDA)		(Gehrke et al., 2013)
HepG2 (hepatoblastome)	Pre	14 nm	1 à 200 µg/mL durant 72h	Oui	oui				Oui (DCFDA)		(Ahmad et al., 2012)
GES-1 (carcinome gastrique)	Pyr ou Pre	10 à 50 nm	10 à 600 µg/mL durant 24, 48 et 72h	oui	oui			Arrêt en phase S	Non (DCFDA)		(Yang et al., 2014)
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	Pyr	7 nm	1mg/L pendant 24h						Oui (DCFDA) et marqueur de stress tel que SOD		(Eom and Choi, 2009)
A549 (carcinome pulmonaire)	Pre	15 nm	25 à 200 µg/mL durant 72h	oui	oui				Oui (DCFDA) GSH ↓		(Ahamed, 2013)
A549	Pyr NM-203	12 nm	25 et 117 µg/cm ² durant 5 ou 7h	oui	oui					oui	(Panas et al., 2014)
Wy38 (fibroblastes embryonnaire de poumon)	Pyr E551= NM-203	10 à 50 nm	50, 100, 200, 400 µg/mL pendant 24 ou 48 h.	oui	oui			Arrêt en phase S et G2/M	Oui DCFDA		(Athinarayanan et al., 2014)
Lymphocytes humains	Pyr ou Pre	14 à 16 nm	200 à 1250 µg/mL durant 24h				Micronoyaux : Non				(Tavares et al., 2014)

3.4.5 *In vitro* sur des lignées animales

Tableau 5 : Etude *in vitro* sur des lignées animales

DCFDA : 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceine di-acétate; LDH: Lactate déshydrogénase; Pyr : Pyrogénée ; Pre : Précipitée

Lignées cellulaires	Type SAS	Taille	Doses et durée	Résultats obtenus							
				Cytotox ↑	Viabilité cellulaire ↓	Intégrité membranaire	Genotoxicité	Cycle cellulaire	Stress oxydant	Inflammation	Références
Lignée cellulaire fibroblastique BALB/c 3T3	Pre NM-200 Pyr NM-203	-10 à 25 nm -5 à 30 nm	1 ,10 et 100 µg/mL pendant 72h	non			Micronoyaux : Non		Pas de transformation cellulaire		(Uboldi et al., 2012)
Lignée de macrophages alvéolaires de souris (MH-S)	Pyr AEROSIL 300® 300 AEROSIL Ox50®	7 et 40 nm	De 0 à 160 µg/cm ² pendant 24h	Oui		LDH ↓			Oui Péroxydation lipidique (mesure de la teneur en acide thiobarbituriques)	oui	(Gazzano et al., 2012)
Macrophages de souris (MH-S et RAW 264.7)	Pyr NM-203 NM-200 : Pre	14 nm	5 ou 10 µg/cm ² durant 24h	oui					Oui (Induction de Hmox1) et (DCFDA)	oui	(Di Cristo et al., 2016)
Fibroblastes pulmonaires de hamster chinois (cellules V79)	Pyr NM-203 (Pyr 20) Pre NM-200 (Pre 20)	20 nm	12,5 à 100 µg/cm ² pendant 24h	oui	oui		Oui (dommage à l'ADN uniquement avec Pyr 20)		non		(Guichard et al., 2016)
Lignée cellulaire fibroblastique Bhas 42	Pre NM-200, NM-201 Pyr NM-202, NM-203	20 nm	2 à 80 µg/cm ²	Oui	Oui		Transformation cellulaire en condition de promotion			(Fontana et al., 2017)	

Les effets liés au stress oxydatif sont souvent cités dans les études *in vitro* de toxicité des SAS précipitées et pyrogénées (Murugadoss et al., 2017) (**Tableau 4 et 5**). Ainsi, l'exposition de macrophages alvéolaires de souris à une SAS pyrogénée (A50) induit une production d'oxyde nitrique (NO) (Gazzano et al., 2012). De plus, l'exposition des cellules provenant d'hépatoblastomes (HepG2) à une SAS précipitée de 14 nm a produit d'autant plus de ROS intracellulaire que la dose de SAS était grande ; le stress oxydant a été mesuré par la fluorescence du 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine di-acétate (DCFDA) et la déplétion en glutathion (GSH) (Ahmad et al., 2012). De même, des cellules fibroblastiques provenant de poumons humains normaux exposées à des SAS utilisées comme additifs dans l'alimentation (E551, correspondant à la SAS pyrogénée NM-203) génèrent une production de ROS (mesurée par DCFDA). Le traitement provoque également une modification de l'expression de gènes codant des enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (*SOD*) et de la glutathion peroxydase (*GPX*) (Athinarayanan et al., 2014). Une augmentation de la production de ROS a également été observée suite au traitement d'une lignée cellulaire de macrophages alvéolaires de souris (MH-S) avec la SAS pyrogénée NM-203 (Di Cristo et al., 2016). En revanche, des SAS pyrogénées (NM-202 et NM-203) et précipitées (NM-200 et NM-201) n'induisent pas la génération de ROS dans des cellules issues de carcinomes coliques (HT-29) (Gehrke et al., 2013) ou dans des lignées de cellules fibroblastiques pulmonaires de hamster chinois (V79) (Guichard et al., 2016). Par ailleurs, le traitement de cellules épithéliales alvéolaires humaines adénocarcinomiques (A549) avec la SAS pyrogénée NM-203 induit une cytotoxicité dose dépendante ainsi qu'une réponse inflammatoire mise en évidence par l'augmentation de l'interleukine-8 (IL-8) (Panas et al., 2014). De même, (Di Cristo et al., 2016) ont montré que la SAS pyrogénée NM-203 et la SAS précipitée NM-200, étaient capables de déclencher une réponse inflammatoire et cytotoxique dans des lignées cellulaires de macrophages alvéolaires de souris (MH-S et RAW264.7). De plus, l'exposition de macrophages alvéolaires de souris à une SAS pyrogénée (A50) a induit une réponse inflammatoire caractérisée par la libération de cytokines tel que le tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Gazzano et al., 2012).

Les effets génotoxiques des SAS de différentes formes ont beaucoup été étudiés sur différentes lignées de cellules animales ou humaines. Les SAS peuvent induire des cassures de brins d'ADN (évalué par le test des comètes) (Gong et al., 2012; Guichard et al., 2016b; Hashimoto and Imazato, 2015; Maser et al., 2015; Nabeshi et al., 2011a) ; la formation de micronoyaux (Tarantini et al., 2015b), des effets mutagènes (Demir and Castranova, 2016), la formation de 8-hydro-2'-désoxyguanosine (Gong et al., 2012; Nabeshi et al., 2011b) ; et la phosphorylation de l'histone gamma-Histone 2A, membre X (γ H2AX) (Gong et al., 2012; Sergent et al., 2012; Tarantini et al., 2015b). En revanche, des SAS pyrogénées et précipitées n'ont pas induit de formation de micronoyaux dans la lignée cellulaire fibroblastique (BALB/c 3T3) (Uboldi et al., 2012). De plus le test de micronoyaux réalisé sur des lymphocytes humains a montré qu'un traitement avec les SAS précipitées NM-200, NM-201 et les SAS pyrogénées NM-202, NM-203 n'induisait pas de génotoxicité, même à des doses élevées (jusqu'à 1250 μ g/mL) (Tavares et al., 2014). Des effets apoptotiques des SAS ont également été rapportés. Les cellules HepG2 exposées à la SAS précipitée de 14nm entraînent en apoptose, expliqué par les auteurs par la production de ROS d'une part, par l'augmentation de l'expression de *P53*, Bcl-2-associated X (*BAX*) et *CASPASE 3*, et par la diminution de l'expression de B cell lymphoma-2 (*BCL-2*) d'autre part (Ahmad et al., 2012). Les mêmes

auteurs ont également observé une cytotoxicité, un stress oxydatif et une apoptose des cellules A549 et des cellules issues de carcinomes épidermiques (A431) traitées avec une SAS précipitée de 15 nm dont les effets étaient proportionnels à la dose appliquée (Ahamed, 2013). De même, l'exposition des cellules V79 à des SAS pyrogénées ou précipitées induit une apoptose mesurée par l'augmentation de l'activité de la CASPASE-3 dont les effets étaient proportionnels à la dose appliquée (Guichard et al., 2016). En revanche, le traitement de cellules issues de carcinomes coliques (C2BBE1 ; clone isolé des cellules Caco-2) avec une SAS pyrogénée de 12 nm n'a eu aucun effet sur l'apoptose (McCracken et al., 2013).

Enfin, l'exposition de cellules issues de carcinomes gastriques (GES-1) et de cellules provenant de carcinomes coliques (Caco-2) à des SAS précipitées et pyrogénées, telles que la SAS pyrogénée NM-203, a arrêté le cycle cellulaire en phase S (Yang et al., 2014). De même, un traitement d'une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires de poumon (WI-38) avec E551 a induit une augmentation de la population cellulaire en phase S après 24h de traitement et en phase G2/M après 48h de traitement (Athinarayanan et al., 2014). Les SAS modifient de manière significative la progression du cycle cellulaire et entraînent une prolifération cellulaire.

Par ailleurs, les SAS synthétisées par voie humide (précipitées) semblent présenter des effets biologiques différents de ceux provoqués par des SAS synthétisées par voie thermique (pyrogénées). Effectivement, Reuzel *et al.* ont montré que des SAS pyrogénées NM-203 provoquent davantage de lésions pulmonaires que la SAS précipitée (AEROSIL R 974), telles qu'une augmentation du poids des poumons, une accumulation de neutrophiles et de macrophages alvéolaires et la formation d'une fibrose chez des rats ayant inhalés 30 mg de SAS (Reuzel et al., 1991). Cette observation a également été faite suite aux instillations intratrachéales consécutives de rats avec 3, 6 ou 12 mg/kg de SAS précipitées (NM-200 et NM-201) et pyrogénées (NM-202 et NM-203) durant 3h, 24h et 48h. Bien que les auteurs n'aient pas mis en évidence de génotoxicité, ils ont montré que les SAS pyrogénées entraînent une augmentation du nombre de macrophages et de neutrophiles dans le liquide broncho-alvéolaire plus importante que les SAS précipitées (Guichard et al., 2015).

De même, (Di Cristo et al., 2016) ont mis en évidence après traitement des cellules MH-S et RAW264.7 des effets biologiques systématiquement plus importants avec la SAS pyrogénée NM-203. Il ressort que, la SAS pyrogénée NM-203 entraînait une diminution plus importante de la viabilité cellulaire dans les deux types cellulaires et une modulation du taux de protéines pro-inflammatoires, (tels que le TNF α , IL-6 et IL-1 β) plus importante que la SAS précipitée NM-200 de taille et de surface spécifique comparables. Cependant, malgré les études publiées ces dernières années, il est encore difficile de faire le lien entre les propriétés physico-chimiques des différentes SAS, leur toxicité, la biodisponibilité ou les effets sur la santé humaine (Murugadoss et al., 2017).

Par ailleurs, le test de transformation cellulaire (utilisé pour mettre en évidence le potentiel cancérigène de molécules chimiques et qui sera décrit par la suite) réalisé sur les cellules BALB/c 3T3 n'a pas montré de formation de foyers de transformation cellulaire suite au traitement avec la SAS précipitée NM-200 et pyrogénée NM-203 (Uboldi et al., 2012). En revanche, le test réalisé sur les cellules Bhas 42 révèle des propriétés transformantes des SAS précipitées NM-200, NM-201, et pyrogénées NM-202 ou NM-

203 (Fontana et al., 2017). Ceci est en accord avec une étude antérieure qui a montré que des SAS modifient la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Athinarayanan et al., 2014; Yang et al., 2014).

4. CANCEROGENESE CHIMIQUE

La cancérogénèse chimique peut être définie comme l'ensemble des phénomènes conduisant à des tumeurs résultant de l'exposition à un composé chimique, quelle que soit son origine. La cancérogénèse chimique est un processus en plusieurs étapes (**Figure 8**) (Harris, 1991). Nous pouvons conceptuellement identifier trois étapes principales : l'initiation, la promotion et la progression (Sugimura, 1992). Un oncogène peut être activé par mutation avec une substance chimique « initiatrice » pour former des tumeurs bénignes, qui elles, sont susceptibles de former des carcinomes sous l'action d'une substance « promotrice ». Les cellules acquièrent de multiples altérations génétiques et progressent jusqu'à former des tumeurs (Oliveira et al., 2007). Nous développerons uniquement les étapes d'initiation et de promotion, car ce sont les deux étapes auxquelles nous sommes particulièrement intéressés *via* l'utilisation du test de transformation *in vitro*.

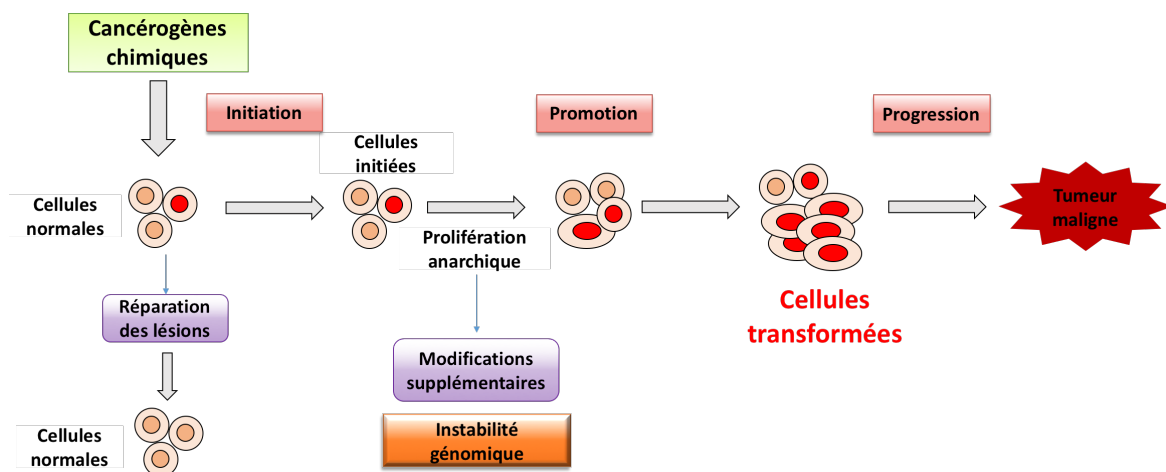


Figure 8 : Représentation des différentes étapes de la cancérogénèse.

Lorsque des cellules sont soumises à des cancérogènes chimiques, des dégâts au niveau du génome peuvent être induits. Elles peuvent réparer les erreurs dans leur génome. Cependant, si les lésions persistent, la cellule entre en phase d'initiation de la cancérogénèse. A ce stade, les cellules sont dites initiées. Les cellules initiées peuvent entrer en phase de promotion au cours de laquelle les cellules prolifèrent de façon anarchique et accumulent des erreurs supplémentaires. Les cellules sont alors dites néoplasiques (cellules précancéreuses), elles sont transformées et sont très différentes de la cellule normale d'un point de vue génétique. Plus la cellule est transformée plus elle va se différencier et perdre ses critères d'origines. Si ces cellules ne sont pas éliminées, elles seront à l'origine d'une tumeur. La dernière étape est l'étape de progression où les cellules sont suffisamment différenciées pour devenir malignes et coloniser d'autres tissus, elles sont alors métastatiques.

4.1 Initiation

L'initiation est la première étape de la cancérogénèse et peut se définir par l'acquisition par une cellule unique de modifications génétiques irréversibles, la prédisposant à une évolution maligne et à l'immortalité (Shacter and Weitzman, 2002; Trosko, 2001, 2003). La cellule initiée n'est pas une cellule néoplasique, mais a fait ses premiers pas vers cet état, après que des modifications génotypiques successives se sont produites (Trosko, 2003). D'un point de vue phénotypique, la cellule initiée est

similaire aux cellules normales. Les dégâts engendrés par les initiateurs sur l'ADN se font aléatoirement et les changements génétiques qui s'opèrent peuvent être transmis au cours de la division cellulaire (Oliveira et al., 2007). L'altération de l'ADN peut être due à des mutations de l'ADN (insertions, inversions, délétions...), des réarrangements chromosomiques, des adduits, des cassures, des réactions d'oxydations... Ainsi, des lésions de l'ADN conduisent, en l'absence de systèmes efficaces de réparation, à des mutations pouvant induire l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme *P53*, rétinoblastome (*RB*), wilms' tumor *protein 1* (*WT1*) ou l'activation de proto-oncogènes tels que rat sarcoma viral oncogene homolog (*RAS*), *BCL-2*, myelocytomatosis oncogene (*c-MYC*) ou human epidermal growth factor receptor (*HER2*) qui ont un rôle important dans le développement de tumeurs ou une altération des gènes contrôlant l'apoptose.

Les agents initiateurs sont généralement des composés chimiques mutagènes comme le 3-méthylcholanthrène (MCA) par exemple. Le MCA est un hydrocarbure aromatique polycyclique qui a été utilisé chez la souris pour analyser la cancérogenèse chimique (DiGiovanni, 1992). La transformation maligne par un agent initiateur comme le MCA résulte de l'accumulation progressive de nombreuses mutations aléatoires par exemple dans des proto-oncogènes tels que *RAS* ou des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *P53* (Halevy et al., 1991; Watanabe et al., 1999). En effet, parmi les oncogènes responsables de la transformation cellulaire, les mutations du gène *RAS* ont été signalées pour la première fois dans le cancer il y a plus de 30 ans et de nombreuses études ont depuis mis en évidence que le gène mutant de *RAS* était un moteur de l'initiation et du maintien de la tumeur (Cox and Der, 2010; Hobbs et al., 2016). De plus, la sur-expression du gène *c-MYC* a été largement observée dans différents types de cancer (20% des cancers humains) et a été associée à une agressivité et à un mauvais pronostic. Le gène *c-MYC* code un facteur de transcription impliqué dans l'expression de nombreux gènes et notamment ceux impliqués dans la prolifération cellulaire (Pelengaris et al., 2002). Pour qu'une mutation soit fixée de façon irréversible, il est nécessaire qu'elle soit suivie d'un cycle de division cellulaire.

4.2 Promotion

Un agent initiateur seul ne permet pas d'induire la formation de tumeurs. Il est important de comprendre que l'avantage sélectif qu'a une cellule initiée par rapport aux cellules normales ne s'exprime qu'en présence d'agents promoteurs. Les promoteurs peuvent stimuler sélectivement la prolifération et/ou empêcher le déclenchement de l'apoptose des cellules initiées. En effet, dans le modèle de la cancérogenèse chimique cutanée en deux étapes, la tumeur est initiée suite à un traitement des cellules avec un agent initiateur, le 7,12-diméthylbenz [a] -anthracène (DMBA). Cet événement irréversible ne provoque l'apparition de tumeurs visibles qu'après l'application répétée d'un agent promoteur, tel que l'ester de phorbol, le 12- O- tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) (Neagu et al., 2016). La cancérogenèse a longtemps été considérée comme la conséquence d'altérations directes du génome. Cependant, les mutations ne sont pas les seules causes d'apparition de cancers. Plus récemment, les mécanismes épigénétiques ont également été suspectés comme étant impliqués dans la modulation de l'expression des gènes dans différents types de cancers comme le cancer celui du sein, du poumon, de la tête et du cou, du cerveau et des ovaires (Casciello et al., 2015). La promotion ne résulte pas de la

modification de l'ADN (processus dits « non-génotoxiques » ou épigénétiques). Tous les agents cancérigènes ne sont pas reconnus comme étant génotoxiques. En effet, une enquête sur des produits pharmaceutiques commercialisés a révélé que seulement un tiers des produits reconnus comme étant cancérigènes étaient également positifs lors des tests de génotoxicité (Benigni and Bossa, 2011; Snyder and Green, 2001), ce qui suggère qu'une proportion significative de cancérigènes présentent leur activité cancérigène par des mécanismes non génotoxiques.

Tout comme les cancérigènes génotoxiques, les cancérigènes non-génotoxiques perturbent les mécanismes de régulation du cycle cellulaire, de prolifération, de différenciation, d'apoptose... (Bertram, 2000; Vanparys et al., 2012). Pour cela, ils agissent à travers des mécanismes multiples incluant :

- la perturbation des signaux de transduction qui contrôlent la croissance cellulaire. Comme cité précédemment, le TPA peut agir comme promoteur de tumeur par activation de la protéine kinase c (PKC) (Blumberg, 1988). En effet, le TPA se lie à la PKC de manière similaire à son ligand naturel, le diacylglycérol, et active la kinase (Li et al., 2010). Les PKC sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Clemens et al., 1992; Nishizuka, 1992) ;
- la perturbation des mécanismes de réplication, de transcription et de réparation de l'ADN favorise les erreurs au cours de la réplication de l'ADN et conduit à une instabilité génique. En effet, suite à des dommages de l'ADN, les agents promoteurs de tumeurs, dont le TPA, peuvent inhiber la réparation de l'ADN. Cette inhibition de la réparation de l'ADN peut être mise en évidence par la méthode de synthèse de l'ADN non programmée, qui permet d'étudier la réparation par excision de nucléotides *via* l'incorporation de nucléotides radiomarqués durant l'étape de synthèse réparatrice, non-répllicative (Gaudin et al., 1971; Langenbach and Kuszynski, 1975) ;
- l'inhibition des télomérases empêche le raccourcissement des télomères et conduit ainsi à une prolifération cellulaire anarchique. Ainsi, un traitement de la lignée cellulaire immortelle dérivée de cancer du col utérin (HeLa) et de la lignée cellulaire du cancer des cervicales Humain (CUMC-6) durant 24h avec 1µM de TPA a pour effet une diminution significative de l'activité de la télomérase (Kim et al., 2001) ;
- l'inhibition des mécanismes apoptotiques. Un traitement d'une lignée de cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE) avec le TPA entraîne une diminution de l'apoptose, observée suite à une augmentation du taux de BCL-2 (protéine inhibitrice de l'apoptose) (Dhalluin et al., 1997) ;
- l'inhibition des communications intercellulaires. Le TPA inhibe la communication intercellulaire des cellules de la lignée BALB/c 3T3 (Murray and Fitzgerald, 1979) ;
- l'induction d'un stress oxydant et la production de radicaux libres. Une application topique de TPA induit un stress oxydant *via* une augmentation de la peroxydation lipidique mise en évidence par l'augmentation significative du niveau de malondialdéhyde (MDA), *via* une diminution du niveau de GSH et *via* une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes telles que la SOD (Khan et al., 2013). De plus, Sun *et al.*, ont mis en évidence qu'un traitement de kératinocytes humains (HaCaT) avec du TPA induit la production de ROS telles que l'anion superoxyde (Sun et al., 2018) ;

- l'activation de proto-oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Il a été montré que le TPA induit une sur-expression du proto-oncogène *c-JUN* (Lamph et al., 1988) et une sous-expression du gène suppresseur de tumeur *P53* (Kim et al., 2012) ;
- la modification des mécanismes épigénétiques. L'acide okadaïque (OA), un autre agent promoteur de tumeur, a induit une augmentation de l'acétylation des histones H4 sur la lysine 5 (H4K5ac) (Zhang et al., 2016).

4.2.1 Notions de régulation épigénétique

Les mécanismes épigénétiques peuvent être impliqués dans le développement et la progression du cancer (Deltour et al., 2005). Ces dérégulations sont la conséquence d'une sur-expression des enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques, de mutations ou de leur recrutement aberrant au niveau de la chromatine. L'épigénétique est définie comme un ensemble de modifications réversibles et héréditaires impliquées dans la modulation de l'expression des gènes sans altération de la séquence nucléotidique. Les principaux mécanismes épigénétiques sont les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN et la régulation transcriptionnelle par les ARN non-codants. Ces modifications agissent ensemble afin de réguler le fonctionnement du génome (Sharma et al., 2010). Nous décrivons surtout la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones, deux effets épigénétiques impliqués dans la transformation des SAS dans les cellules Bhas 42 (Seidel et al., 2017).

A) La méthylation et déméthylation de l'ADN

La méthylation et déméthylation de l'ADN sont des modifications épigénétiques qui limitent l'expression des séquences répétées (centromériques et télomériques) et qui permettent la conservation de l'intégrité du génome en rendant silencieux les éléments transposables perturbateurs (Bird, 2002). Cependant, une méthylation anormale de l'ADN peut provoquer plusieurs pathologies comme le cancer (Denis et al., 2011). La présence de groupements méthyles au niveau de l'ADN participe à la répression de l'expression génique en recrutant, entre autres, des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine et en empêchant la fixation des facteurs protéiques nécessaires à la transcription des gènes (Cheng, 2014). Ce sont les ADN méthyl-transférases (DNMT) qui catalysent l'addition de groupements méthyles aux cytosines en position 5' à partir de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) utilisée comme donneur de méthyle, formant ainsi une 5-méthyl-cytosine (5-mC) (Denis et al., 2011) (**Figure 9**). Dans les cellules de mammifères, trois DNMT ont été identifiées comme méthylases de l'ADN : DNMT1, 3a et 3b.

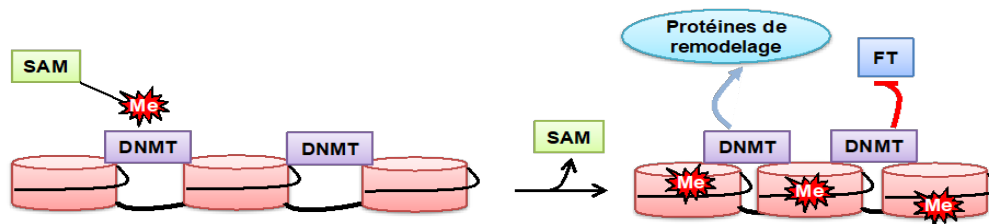


Figure 9 : Mécanisme de méthylation et de déméthylation de l'ADN.

(A) Les DNMT utilisent la SAM comme donneur de méthyle afin de transférer un groupement méthyle en position 5' de cytosines se trouvant dans un contexte de dinucléotide CpG. La méthylation de l'ADN est associée à une répression de l'expression génique dû à un recrutement de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine et à une inhibition du recrutement de facteurs de transcription (FT). Me : méthyle ; DNMT : ADN méthyl-transférases ; SAM : S-adenosyl-L-méthionine.

B) Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications des histones participent au remodelage de la chromatine et au changement d'accessibilité de la séquence nucléotidique. Les modifications les plus étudiées sont les méthylations et acétylations. Elles sont catalysées par des méthyl-transférases d'histones (HMT) et par des acétyl-transférases d'histones (HAT). La modification des histones peut mener à l'activation ou à la répression des gènes. En effet, l'acétylation des lysines entraîne généralement une activation transcriptionnelle, tandis que la méthylation des lysines mène à l'activation ou à la répression transcriptionnelle suivant le résidu modifié et le nombre de méthylations. Le rôle des HAT est lui contrecarré par les histones désacétylases (HDAC) qui sont impliquées dans la désacétylation des histones ayant un rôle de répresseur de l'expression (Sharma et al., 2010).

4.2.2 Implications des mécanismes épigénétiques dans la cancérogenèse

En situation tumorale, les étapes d'initiation et de progression du cancer sont accompagnées par des modifications de la méthylation de l'ADN (**Figure 10**). Une hypométhylation globale de l'ADN entraîne une instabilité chromosomique due à la réactivation d'éléments mobiles tels que les long interspersed nuclear element-1 (LINE-1), arthrobacter luteus (Alu) et la perte d'inhibition de la transcription des séquences répétées, qui représentent près de la moitié du génome. De plus, la déméthylation pourrait être associée à la réexpression d'oncogènes impliqués dans la prolifération cellulaire (sur-expression des récepteurs au facteur de croissance épithéliale (EGF ; Epithelial growth factor)) (Romani et al., 2015). D'une part, il a été montré une corrélation entre une dérégulation de l'expression des gènes codant les DNMT et le cancer de la prostate ou le cancer colorectal (Denis et al., 2011). D'autre part, il est observé une hyperméthylation localisée dans certains gènes, comme les gènes suppresseurs de tumeurs. Cette modification entraîne une inhibition de leur expression (Romani et al., 2015).

En plus des changements de méthylation de l'ADN, les cellules cancéreuses sont également caractérisées par une méthylation et acétylation aberrantes des histones. La diminution de l'acétylation des histones, qui aboutit à la répression de gènes et qui est observée dans divers types de cancer, est attribuée, entre autres, à une sur-expression des HDAC. L'activité des HAT peut également être modifiée dans les cellules cancéreuses (Sharma et al., 2010).

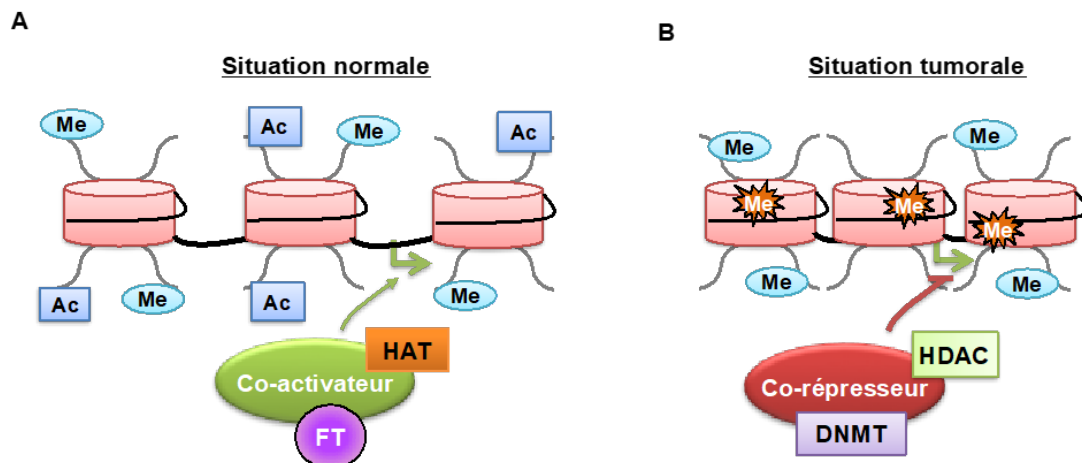


Figure 10 : Implication des modifications épigénétiques dans le développement de cancer.

(A) En situation normale au niveau d'un promoteur d'un gène suppresseur de tumeur, l'ADN est faiblement méthylé, ce qui permet le recrutement de co-activateurs, de facteurs de transcription et d'enzymes impliquées dans l'acétylation des histones. La combinaison de ces modifications participe à l'expression génique. (B) En situation tumorale, une hyperméthylation localisée au promoteur de certains gènes suppresseurs de tumeur peut être observée ainsi qu'une méthylation et acétylation aberrante des histones. Ces modifications permettent le recrutement de co-répresseurs et aboutissent à la répression du gène. HAT: Histone acétyl-transférase, HDAC: Histone désacétylase, FT: Facteur de transcription, DNMT: ADN méthyl-transférases, Me: Méthyle, Ac: Acétyle.

4.2.3 Connaissances sur les effets épigénétiques des nanomatériaux

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré des effets épigénétiques de nanomatériaux manufacturés. En particulier, une étude s'est intéressée aux effets d'une nanoparticule de silice de 15 nm sur la méthylation de l'ADN dans les kératinocytes humains HaCaT (Gong et al., 2010). Les résultats montrent que cette nanoparticule abaisse significativement d'une part, le nombre de cytosines méthylées dans l'ADN génomique et d'autre part, le niveau d'expression de différentes formes de DNMT. (Lu et al., 2016) ont montré que des nanoparticules d'oxydes métalliques, contenues dans des fumées de soudage ou manufacturées (dioxyde de titane, oxyde de cuivre), modulent la méthylation de l'ADN globale au niveau de promoteurs spécifiques ou des séquences des éléments transposables. Des études *in vitro* ont montré également pour certaines nanoparticules manufacturées des effets sur les modifications des histones. Par exemple, le Cadmium Telluride quantum dots (CdTe QD), une nanoparticule fluorescente utilisée en imagerie médicale, peut induire, *in vitro*, l'hypoacétylation globale des cellules d'adénocarcinomes du sein humain (MCF-7). Elle induit une diminution de l'expression d'ARNm de deux gènes, le gène cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (CIAP-1) et le gène codant les protéines de choc thermique 70 (HSP70), tous deux impliqués dans la prévention de la mort cellulaire. Tandis que le niveau d'expression de la *GPX* est totalement réprimé, le niveau d'ARNm du gène codant *P53* est augmenté, affectant ainsi les niveaux protéiques des cibles de P53 telles que BAX, P53 Upregulated Modulator of Apoptosis (PUMA) et NOXA impliquées dans la régulation de l'apoptose (Choi et al., 2008). Enfin, Seidel *et al.* ont mis en évidence qu'un traitement à court terme des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 n'entraîne pas de diminution de la méthylation globale de l'ADN et

n'augmente pas l'expression des DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. De plus, la SAS pyrogénée NM-203 n'induit pas de modification du statut d'acétylation global de l'histone H4 et du taux de protéines HDAC. Cependant, le traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 induit une forte expression de *c-MYC* au début de la transformation cellulaire, ce qui est en corrélation avec l'enrichissement en ARN polymérase II ainsi que les marques actives d'histones observées sur son promoteur (Seidel et al., 2017).

5. LES TESTS *IN VITRO* DE TRANSFORMATION CELLULAIRE

A ce jour, les tests *in vitro* sont pour la plupart orientés sur la recherche des altérations structurales de l'ADN. En effet, les tests de génotoxicité visent à mettre en évidence l'altération par des composés chimiques du matériel génétique (ADN et/ou chromosome). Ils permettent de détecter principalement les lésions de l'ADN et/ou des chromosomes ou ses conséquences (effets phénotypiques de mutation génique) (La and Swenberg, 1996). En revanche, les cancérrogènes non génotoxiques répondent négativement aux tests de mutagenèse. Il est donc plus difficile de détecter ces cancérrogènes non génotoxiques. Cependant, leur potentiel cancérrogène peut être mis en évidence par les tests *in vitro* de transformation cellulaire.

5.1 Définition

La transformation cellulaire est un événement majeur dans le processus de cancérogenèse. Elle est définie comme étant un processus de conversion de cellules normales cultivées *in vitro* en cellules qui présentent des propriétés morphologiquement propres aux cellules néoplasiques. De plus, il a été démontré que les cellules transformées *in vitro* induisent des tumeurs si elles sont injectées à des animaux de laboratoire immunodéprimés (Berwald and Sachs, 1963, 1965; Elias et al., 1989; Newbold et al., 1982). Cette caractéristique valide l'utilisation d'altérations phénotypiques observées *in vitro* comme caractère prédictif de la cancérogenèse *in vivo*.

5.2 Intérêt des tests *in vitro* de transformation cellulaire

L'évaluation de la cancérogénicité potentielle d'un composé est une déterminante pour évaluer la sécurité des produits chimiques. De nombreux tests *in vivo* sont pratiqués en recherche appliquée à la toxicologie afin de détecter le potentiel cancérrogène d'agents chimiques. Les études *in vivo* réalisées sur les animaux utilisent entre 600 et 800 animaux environ, l'expérimentation se déroule en moyenne sur 4 ans et coûtent environ 1 million d'euros par produit chimique. Par ailleurs, le 7^{ème} amendement à la directive européenne sur les cosmétiques limite l'utilisation de tests sur les animaux (EU, 2003). Cet amendement interdit même totalement les essais sur les animaux pour les produits cosmétiques depuis mars 2009 (Vanparys et al., 2011). Les tests de transformation cellulaire imitent certaines étapes clés de la cancérogenèse *in vivo*, et montrent une bonne concordance avec les résultats des essais biologiques sur les rongeurs, détectant les cancérrogènes génotoxiques et non génotoxiques (Barrett and Ts'o, 1978; Benigni et al., 2013; Combes et al., 1999; Maire, 2004; OECD, 2007). En effet, en

termes de prédiction de la cancérogénicité humaine, les tests de transformation permettent de détecter 90% des composés classés dans le groupe 1 (connus pour être cancérogènes chez l'Homme) par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) et 95% de ceux classés dans les groupes 2A (cancérogène probable pour l'Homme) et 2B (potentiellement cancérogène pour l'Homme) (Creton et al., 2012). Dans ce contexte, le développement de méthodes alternatives telles que les tests *in vitro* de transformation cellulaire peuvent permettre de réduire voire de remplacer l'utilisation d'animaux (Corvi et al., 2012; Mascolo et al., 2010; Russell, 1995). Lesdits tests sont également plus simples et rapides à mettre en œuvre en permettant le criblage d'un plus grand nombre d'agents chimiques.

5.3 Les différents modèles de transformation

5.3.1 Les cellules SHE

Le test de transformation cellulaire sur les SHE a été l'un des le plus utilisés. Le test SHE a été initialement développé par Berwald et Sachs en 1963 (Berwald and Sachs, 1963, 1965). Pour ce modèle, il a clairement été établi, pour de nombreuses substances, une corrélation entre les transformations morphologiques observées *in vitro* et l'induction de tumeurs *in vivo*. Les cellules SHE sont des cellules primaires prélevées après 13 jours de gestation. Ce sont des cellules normales, diploïdes, non différenciées et capables de métaboliser un grand nombre de cancérogènes (Barrett and Ts'o, 1978; Barrett et al., 1984). Le point final est la mise en évidence de colonies transformées obtenues après le développement clonal des cellules exposées pendant 7 jours à un produit testé. Les colonies sont caractérisées par une structure désorganisée en forme de fuseau dans une orientation aléatoire et par une croissance anarchique aboutissant à un empilement cellulaire dû à une perte d'inhibition de contact (Vasseur and Lasne, 2012). Cependant, comme ces cellules sont des cellules primaires, elles ne sont utilisables que sur un ou deux passages. Elles nécessitent également l'utilisation de cellules nourricières irradiées. Cela engendre donc des difficultés de stabilisation du test, puisque les cellules utilisées doivent être souvent renouvelées et doivent répondre aux critères de validation du test (Barrett et al., 1984; OECD, 2007).

5.3.2 La lignée C3H10T^{1/2}

La lignée cellulaire fibroblastique de souris C3H 10T^{1/2} a été développée par (Reznikoff et al., 1973). Après 24h d'ensemencement, les cellules sont traitées pendant 48h puis le milieu est changé de façon régulière. Les cellules sont conservées en culture jusqu'à six semaines ou plus. Enfin, au terme des 6 semaines, les foyers transformés sont colorés et dénombrés. Cette lignée cellulaire est sensible à la transformation spontanée, et très sensible à une large gamme de cancérogènes chimiques conduisant au développement de foyers issus de cellules transformées, recouvrant la monocouche cellulaire normale. Ces foyers présentent un modèle typique de cellules désorientées avec une croissance empilée (Vasseur and Lasne, 2012).

Les différentes catégories de foyers observables sont (Reznikoff et al., 1973) :

- ✓ les foyers de type I qui sont des foyers composés de cellules serrées ;
- ✓ les foyers de type II qui sont des foyers présentant une accumulation massive de multicouches pratiquement opaques;
- ✓ les foyers de type III qui sont des foyers composés de réseaux croisés de fibroblastes en multicouches.

Les foyers de type I ne sont pas classés comme ayant subi une transformation maligne, car ces cellules n'induisent pas la formation de tumeurs suite à leur inoculation chez l'animal.

Les foyers de types II et III sont classés comme ayant subi une transformation maligne et induisent la formation de tumeurs après inoculation chez l'animal.

5.3.3 La lignée BALB/c 3T3

La lignée BALB/c 3T3 a été établie à partir de la lignée de souris Aaronson et Todaro A31 (Aaronson and Todaro, 1968) et en particulier le sous type A31-1-1 établi par (Kakunaga and Crow, 1980). Les cellules BALB/c 3T3 ont été obtenues suite au prélèvement d'un embryon après 13-15 jours de gestation.

Pour le test de transformation, après 24h d'ensemencement, les cellules sont traitées pendant 72h puis des changements de milieu sont effectués durant 5 semaines. La lignée cellulaire BALB/c 3T3 est composée de cellules anormales et aneuploïdes ; elle présente des capacités de métabolisation limitées (Schechtman, 1985). Le critère de transformation est la formation de foyers au bout de 4 à 6 semaines. Les foyers transformés sont évalués en fonction de leur niveau de transformation morphologique. La transformation cellulaire est mise en évidence par des foyers de cellules multicouches, désorganisées, qui se développent sur la monocouche de cellules environnantes suite à une acquisition de l'indépendance d'ancrage et à une perte de l'inhibition de contact (Vasseur and Lasne, 2012) (Creton et al., 2012).

Les différentes catégories de foyers observables sont :

- ✓ les foyers de type I, n'ayant pas subi une transformation maligne. Ce sont de petits foyers non invasifs présentant une faible coloration basophile (les foyers étant colorés grâce au giemsa, un colorant basique capable d'interagir avec les constituants acides de la cellule tels que l'ADN) ;
- ✓ les foyers de type II, n'ayant pas subi une transformation maligne. Ces foyers sont denses, en multicouches et présentent une coloration basophile moins marquée que les foyers de type III. Les foyers de type II contiennent des cellules en forme de fuseau et présentent des empilements et des croisements de cellules, mais dans une moindre mesure ;
- ✓ les foyers de type III, ayant subi une transformation maligne. Ils présentent une coloration basophile profonde, des cellules fusiformes morphologiquement différentes des cellules présentes dans la monocouche confluyente, une multicouche dense de cellules (empilement), une orientation aléatoire des cellules et une croissance invasive de cellules au bord des foyers (entrecroisés) peuvent également être observées (Sasaki et al., 2012).

5.3.4 La lignée Bhas 42

Le test de transformation sur les cellules Bhas 42 fait l'objet d'un document guide de l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (OECD, 2016). Les cellules Bhas 42 sont des cellules fibroblastiques adhérentes établies à partir de cellules BALB/c 3T3 (clone A31-1-1), par la transfection stable de la séquence de l'oncogène viral *RAS* (*v-Ha-RAS*). L'ADN Ha-MuSV, clone H1 (*v-Ha-RAS*) est contenu dans un plasmide pBR322 contenant également un site de reconnaissance BamH1 à la fin de la séquence *RAS* d'intérêt (**Figure 11**). *v-Ha-RAS*, transfecté par la méthode de précipitation au phosphate de calcium, est présent dans tous les noyaux des cellules Bhas 42 sur les chromosomes 17 ou 19 avec une moyenne de 2,4 copies par noyau (Sasaki et al., 2015). Les cellules conservent leur inhibition de contact, et sont sensibles aux agents promoteurs (Sasaki et al., 1988).

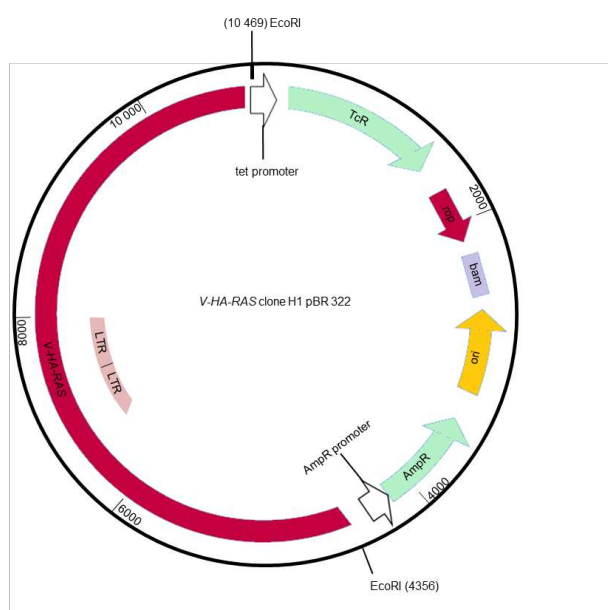


Figure 11 : Structure du plasmide pBR322.

AmpR : Gène de résistance à l'ampicilline ; tet : Gène de résistance à la tétracycline ; Ori : Origine de réplication ; LTR : Long Terminal Repeats (Sasaki et al., 1988).

A l'instar des cellules BALB/c 3T3, les cellules Bhas 42 non transformées peuvent proliférer jusqu'à confluence pour former une monocouche maintenue par l'inhibition de contact. De plus, une injection sous cutanée des cellules Bhas 42 non transformées issues de cette monocouche confluente, s'est révélée non tumorigène chez des souris nude. A l'inverse, après exposition à des agents cancérogènes, les cellules changent morphologiquement et perdent l'inhibition de contact. Les cellules Bhas 42 forment alors des foyers transformés qui se développent sur la monocouche confluente (Sasaki et al., 2015). Cependant, à notre connaissance, la capacité des cellules Bhas 42 transformées à induire la formation de tumeurs *in vivo* n'a pas encore été démontrée.

Les foyers transformés ont été jugés sur la base des caractéristiques morphologiques: (a) plus de 100 cellules ; (b) des cellules en forme de fuseau dont la morphologie diffère en apparence des cellules de la monocouche confluente ayant conservé une inhibition de contact ; (c) une coloration basophile

intense ; (d) une orientation aléatoire de cellules au bord des foyers ; (e) multicouches denses de cellules et (f) croissance invasive dans la monocouche confluyente environnante possédant une inhibition de contact (**Figure 12**).

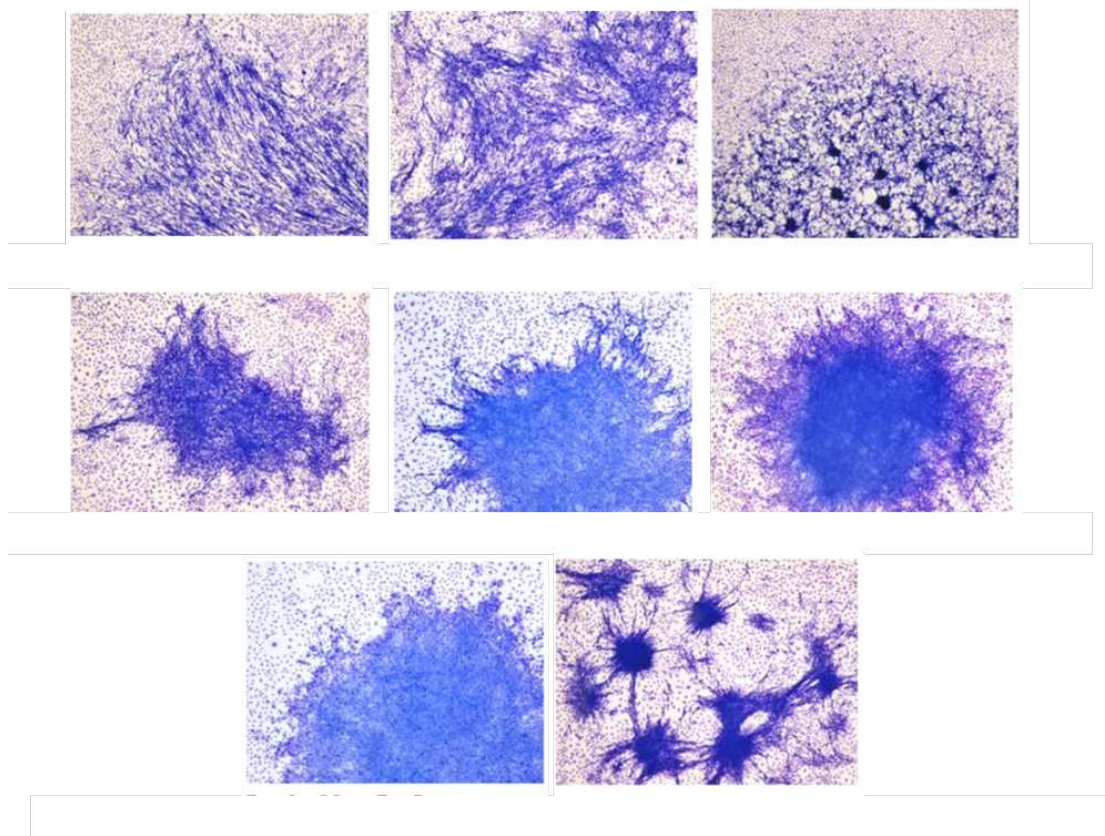


Figure 12 : Foyers de cellules BHas 42 positifs (transformants).

Les foyers présentent toutes les caractéristiques requises et fortement exprimées des cellules transformées à savoir une basophilie, une croissance en multicouche, une forme en fuseau et une orientation aléatoire.

5.4 Rôle du gène *v-Ha-RAS* dans la transformation des cellules Bhas 42

Les protéines RAS font partie de la famille des GTPases et sont constituées de 3 protéines de 21 kDa, K-RAS, H-RAS et N-RAS codées par trois gènes différents : Kirsten RAS (*KRAS*), Harvey RAS (*HRAS*) et Neuroblastoma RAS (*NRAS*). Les gènes *H-RAS* et *K-RAS* ont été découverts comme oncogènes, c'est-à-dire en tant que gènes d'origine cellulaire responsables du pouvoir transformant des rétrovirus dits de « Harvey » et de « Kirsten », ceux qui induisent des sarcomes chez le rat et la souris. À la suite d'un signal mitogénique reçu par un récepteur (comme, par exemple, EGFR), la protéine RAS se lie à une molécule de guanosine triphosphate (GTP) permettant son activation. RAS interagit alors avec plusieurs effecteurs conduisant à la prolifération cellulaire, à la survie cellulaire et à la biosynthèse de protéines (Colicelli, 2004; Downward, 2003) (**Figure 13**).

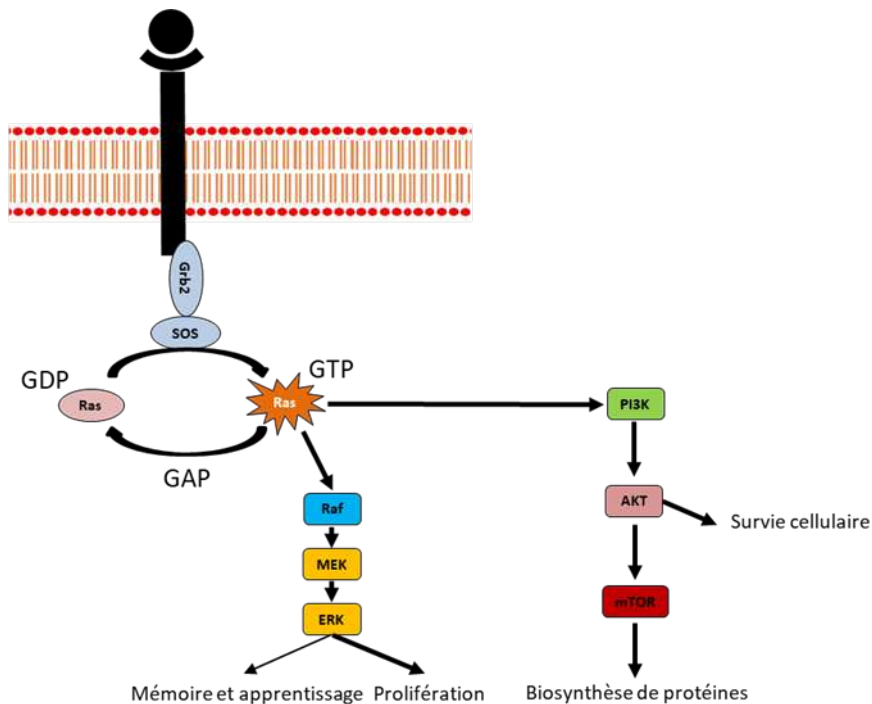


Figure 13 : Voie d'activation des protéines RAS.

Les protéines RAS sont des protéines liées à la guanosine nucléotidique qui alternent entre une conformation active liée à la guanosine triphosphate (GTP) et une conformation inactive liée à la guanosine diphosphate (GDP). Les protéines guanine nucléotide exchange factors (GEF) telles que les protéines son of sevenless (SOS) et growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) agissent ensemble afin de catalyser la libération du GDP et la fixation du GTP conduisant alors à une modification conformationnelle de la protéine, alors que les GTPase activating proteins (GAP) catalysent l'hydrolyse du GTP (Colicelli, 2004). Les protéines RAS sont activées en réponse à des signaux environnementaux. Elles peuvent être activées lorsqu'un facteur de croissance se lie à un récepteur tyrosine kinase tel que l'épidermal growth factor receptor (EGFR). Il en résulte une dimérisation et une autophosphorylation du récepteur, qui va alors permettre le recrutement des protéines GEF. RAS est alors activée grâce au recrutement de la GTP par GRB2/SOS, et active, à son tour, différents effecteurs pour réguler la prolifération cellulaire et la survie. Parmi ces effecteurs, la protéine RAF va activer la voie des Mitogen Activated Protein Kinase/Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal Regulated Kinase (MAPK/MEK/ERK). RAS active RAF en induisant un changement conformationnel de la protéine. La cascade d'activation des kinases qui en découle permet l'activation de la transcription des gènes du cycle cellulaire. RAS est également capable d'activer la voie de la phosphoinositol-3-kinase (PI3K) qui recrute la 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDK1) qui à son tour phosphoryle et active la PKB protéine kinase B (AKT). Cette voie sous-jacente conduit à une augmentation de la survie cellulaire et active la mammalian target of rapamycin (mTOR) augmentant la biosynthèse des ribosomes et la traduction des ARNm (Downward, 2003).

Les protéines RAS jouent un rôle clé dans la croissance cellulaire normale, la transformation maligne, l'apprentissage et la mémoire. Des mutations somatiques des gènes *RAS* et de plusieurs de leurs molécules en amont et en aval entraînent différentes malignités humaines (Denayer et al., 2008). L'activation du gène *RAS* est un événement important dans la transformation cellulaire. En effet, il semblerait que le gène *RAS* soit activé par des mutations dans des tumeurs *in vivo* induites par un agent chimique tels que des agents initiateurs de tumeurs (Halevy et al., 1991; Watanabe et al., 1999; Zarbl et al., 1985). Ces mutations peuvent conduire à des changements de conformation de la protéine RAS affectant le domaine de liaison au GTP et réduisant l'activité GTPase intrinsèque de la protéine. RAS devient alors résistante à l'action des GTPase activating proteins (GAP), nécessaire au retour à l'état inactif de la protéine (Mitin et al., 2005).

En parallèle de ces mutations, les mécanismes indirects d'activation de RAS permettent son activation chronique malgré l'absence de mutation. D'autre part, on soupçonne qu'une mutation ponctuelle, qui

distingue *v-Ha-RAS* de son homologue humain normal (*c-Ha-RAS1*), est seule responsable du potentiel transformant des cellules provenant de carcinomes de la vessie humaine (EJ et T24) (Newbold et al., 1982). C'est pourquoi les auteurs ont examiné les effets transformants de l'oncogène *v-Ha-RAS* dans des cellules de fibroblastes de hamster et ont mis en évidence que la transfection de ce gène dans des fibroblastes normaux ayant une durée de vie limitée n'induisait pas de transformation cellulaire, mais entraînait la transformation des fibroblastes nouvellement "immortalisés" par des agents cancérigènes. Cela sous-entend que l'expression de *RAS* seule ne conduit pas à l'apparition de tumeur. En effet, les promoteurs tumoraux pourraient compléter la fonction des oncogènes cellulaires activés (Hsiao et al., 1986).

C'est en 1988, suite à la transfection des cellules BALB/c 3T3 avec l'oncogène *v-H-RAS* activé constitutivement, qu'un traitement des cellules Bhas 42 avec un agent promoteur de tumeur, le TPA, a entraîné la formation de foyers de transformation (**Figure 14**), suggérant que le gène *RAS* agissait comme un initiateur de la cancérogénèse (Sasaki et al., 1988).

La présence du gène *v-Ha-RAS* dans les cellules Bhas 42 leur confère un statut de cellules initiées (Sasaki et al., 2015). Il n'est donc pas nécessaire de les prétraiter avec un agent initiateur de tumeur afin d'induire la transformation cellulaire par des agents promoteurs (Sasaki et al., 1988).

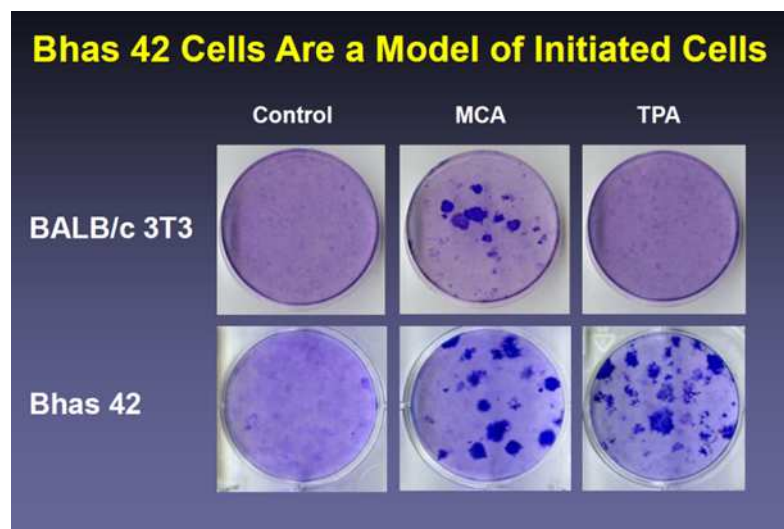


Figure 14 : Comparaison des performances obtenues avec un test de transformation sur les cellules Bhas 42 et sur des cellules BALB/c 3T3.

Les cellules ont été traitées avec un agent initiateur de tumeur, le MCA ou un agent promoteur de tumeur, le TPA, en suivant les recommandations de l'OCDE. Coloration avec du Giemsa après 21 jours de culture. MCA : 3-méthylcholanthrène ; TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate.

5.5 Avantages à l'utilisation de la lignée Bhas 42

Le test de transformation utilisant la lignée Bhas 42 modélise *in vitro*, les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse chimique et est particulièrement utile pour l'évaluation du potentiel transformant de produits chimiques pour lesquels les tests *in vivo* ne sont pas autorisés (Vanparys et al., 2012). Il existe de nombreux avantages à l'utilisation des cellules Bhas 42 :

(1) ce test permet de détecter à la fois, les agents initiateurs de tumeur (Asada et al., 2005) et les agents promoteurs de tumeur (Ohmori et al., 2004). Bien que les Bhas 42 soient initiées, elles répondent toujours à des traitements avec des initiateurs de tumeurs (Asada et al., 2005) (**Figure 14) (Tableau 6)** ;

(2) de plus, le prétraitement avec un agent initiateur de tumeur peut être omis pour détecter l'activité promotrice d'un agent ;

(3) la durée du test est relativement brève par rapport aux autres modèles, de 2,5 à 3 semaines après l'ensemencement cellulaire ;

(4) et enfin, le nombre de cultures témoins et traitées nécessaires pour évaluer le potentiel cancérogène d'un produit chimique est plus réduit comparé aux autres tests de transformation (Muramatsu et al., 2009; OECD, 2016; Ohmori et al., 2004). En conclusion, en comparaison avec les cellules BALB/c 3T3, le test de transformation réalisé sur les cellules Bhas 42 est un système sensible qui a permis de réduire les coûts et le temps de travail (Sasaki et al., 1988).

Tableau 6 : Tableau comparatif des différents tests de transformation

	Cellules SHE	Lignée C3H10T ^{1/2}	Lignée BALB/c 3T3	Lignée Bhas 42
Cellules	Cellules primaires	Lignée cellulaire	Lignée cellulaire	Lignée cellulaire
Pré-traitement	Oui	Oui	Oui	Non
Durée	10 jours	6 semaines	5 semaines	3 semaines
Stabilité	Utilisable sur un ou deux passages Besoin de cellules nourricières	Stable	Stable	Stable
Cellules nourricières	Oui	Non	Non	Non

5.6 Principe du test de transformation sur les cellules Bhas 42

Le test de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 repose sur deux essais menés en parallèle, le test d'initiation et le test de promotion (OECD, 2016; Sakai et al., 2011).

5.6.1 Test d'initiation

(Asada et al., 2005) ont découvert qu'une modification légère du protocole du test de transformation en deux étapes permet de détecter les initiateurs de tumeurs. Il est reconnu que les mutations induites par un agent chimique initiateur sont fixées après un ou plusieurs cycles de réplication cellulaire (Chu and Malling, 1968; Duncan and Brookes, 1973; Sasaki et al., 1990). Ainsi, dans le test d'initiation, les cellules sontensemencées à faible densité, puis traitées une fois au début de la phase de croissance permettant à la cellule d'effectuer plusieurs cycles cellulaires nécessaires à la fixation des dommages à l'ADN.

Selon ce protocole, un initiateur de tumeur tel que le MCA produit des foyers transformés. Cela peut être dû à des mutations de gènes liées à la transformation (Sasaki et al., 2015). Le TPA, quant à lui, n'induit pas la formation de foyers par ce protocole (**Figure 14**).

5.6.2 Test de promotion

Dans le test de promotion, les cellules sontensemencées à plus forte densité et traitées de façon répétée pendant la phase stationnaire. S'il est promoteur, l'agent testé va induire le développement des cellules initiées (Mondal et al., 1976; Ohmori et al., 2004; Yamasaki et al., 1996). Avec ce protocole, un traitement des cellules Bhas 42 avec un agent initiateur n'induit pas la formation de foyers (**Figure 14**).

Les données de ces deux tests de transformation en condition d'initiation et de promotion suggèrent que la division cellulaire est un aspect important dans l'initiation de la tumeur et que la communication cellulaire est un aspect important de la promotion de la tumeur. En effet, il est connu que les agents promoteurs de tumeurs inhibent des communications intercellulaires essentielles à l'homéostasie cellulaire. De ce fait, une cellule ayant perdu sa capacité à communiquer avec les autres cellules pourrait échapper au contrôle de prolifération cellulaire, ce qui favoriserait la formation d'une tumeur, ou dans le cas des cellules Bhas 42, la formation de foyers transformés (OECD, 2016; Ohmori et al., 2004; Trosko et al., 1990).

Dans les deux cas, après 21 jours de croissance, les foyers de transformation sont colorés et comptés.

5.7 Validation du test de transformation

Dans le but de valider le test de transformation sur les cellules Bhas 42, une étude internationale inter-laboratoire a été effectuée (Sakai et al., 2011). Au total, six laboratoires ont participé et douze agents chimiques ont été testés. Chaque agent a été testé par trois laboratoires. Ainsi, l'étude a permis de démontrer que le test de transformation sur les cellules Bhas 42 est transférable et reproductible entre les laboratoires et applicable à la détection à la fois de l'activité initiatrice et de l'activité promotrice des substances cancérigènes (Sakai et al., 2011). De plus, une étude menée sur 98 produits chimiques a montré que ce test pouvait distinguer ceux reconnus comme cancérigènes de ceux reconnus comme non cancérigènes chez l'Homme et/ou l'animal. La performance du test de transformation cellulaire Bhas 42 pour la prédiction de la cancérigénicité chimique a été étudiée à partir des résultats d'analyses de 52 substances cancérigènes et de 37 substances non cancérigènes. La concordance était de 78%, la sensibilité de 73% (proportion de vrais positifs parmi la totalité des substances étudiées), la spécificité de 84% (proportion de vrais négatifs parmi les substances négatives), la prédictivité positive de 86%, la prédictivité négative de 69%, le taux de faux négatifs de 27% et le taux de faux positif de 16%. Ces résultats étaient supérieurs ou équivalents à ceux des tests de génotoxicité. De plus, parmi les 52 substances cancérigènes testées dans ces études, environ la moitié était négative ou discordante dans le test d'Ames, un test de mutagénèse sur bactérie très utilisé permettant de détecter des mutations ponctuelles provenant de substitutions ou de délétions du cadre de lecture. Dans le test de transformation cellulaire Bhas 42, 17 des cancérigènes Ames négatifs ou Ames discordants ont été

jugés positifs (Sakai et al., 2010), ce qui souligne l'intérêt du test Bhas 42 pour détecter les agents promoteurs de tumeur.

6. Silices cristallines, SAS et cancer

La silice cristalline est connue pour provoquer des maladies pulmonaires, comme le cancer chez les travailleurs exposés à des particules respirables (Leung et al., 2012; Napierska et al., 2010; Rimal et al., 2005). De plus, des études *in vivo* impliquant une inhalation chronique de silice cristalline chez le rat ont montré que ces particules induisent des fibroses et des tumeurs pulmonaires (IARC, 1997; Reiser and Last, 1979; Saffiotti, 1992). *In vitro*, la silice cristalline, Min-U-Sil 5[®] induit une transformation néoplasique des cellules BALB/c 3T3 et des cellules SHE de façon dose dépendante (Darne et al., 2016; Saffiotti and Ahmed, 1995). Le mécanisme de cancérogénèse des silices cristallines serait lié à la production de ROS au niveau pulmonaire, conduisant à la formation de dommages à l'ADN (Fubini and Hubbard, 2003). Pour ces raisons, les microparticules de silice cristallines sont classées depuis 1997 par le CIRC dans le groupe 1, comme cancérogène avéré pour l'Homme (IARC, 1997).

Concernant le potentiel cancérogène des SAS, il n'existe que peu de données. *In vivo*, alors que (Lewinson et al., 1994) n'ont pas observé de formation de tumeurs suite à l'exposition de rats femelles à l'AEROSIL R972[®] (pyrogénée) et au Sipemat D 17 (précipitée), deux études de cancérogénèse à long terme chez le rat ont montré que l'instillation intra-trachéale répétée de SAS pyrogénées, cinq instillations (3 mg par instillation) (Pott and Roller, 2005) ou trente instillations (0,5 mg par instillation) (Kolling et al., 2011) augmente l'incidence des tumeurs du poumon (**Tableau 2**). *In vitro*, (Uboldi et al., 2012) n'a pas mis en évidence la formation de foyers de transformation suite au traitement des cellules BALB/c 3T3 avec la SAS précipitée NM-200 et la SAS pyrogénée NM-203. En revanche, (Fontana et al., 2017) ont mis en évidence la capacité des SAS précipitées NM-200 et NM-201 et des SAS pyrogénées NM-202 et NM-203 à induire une transformation suite à un traitement répété des cellules Bhas 42.

A ce jour, au même titre que les particules de silice amorphes naturelles (par exemple, la terre de diatomée), les SAS sont considérées comme n'ayant pas d'effet spécifique sur la santé humaine et sont classées dans le groupe 3 par le CIRC.

Chapitre II : OBJECTIFS DE L'ETUDE

Afin d'évaluer le danger des substances potentiellement cancérigènes, les tests de transformation cellulaires représentent une alternative pertinente aux essais *in vivo* de cancérigénèse à long terme. Les travaux de l'INRS s'inscrivent dans cette démarche de prévention. L'institut a mis en place le test de transformation des cellules Bhas 42. Une fois validée avec des substances chimiques connues pour leur effet cancérigène tel que le TPA (un agent promoteur de tumeur), la pertinence du test a été évaluée avec des agents microparticulaires, et en particulier avec deux silices, l'une cristalline, le Min-U-Sil 5[®], substance classée cancérigène, et l'autre, la DE, une silice amorphe non classée cancérigène. L'INRS s'est alors intéressé au potentiel transformant de différentes SAS (précipitées NM-200 et NM-201, et pyrogénées NM-202 et NM-203), susceptibles de représenter un risque pour les travailleurs exposés. Les 4 SAS testées se sont avérées toutes transformantes dans le modèle Bhas 42 en condition de promotion. De plus, la SAS pyrogénée NM-203 présentait la capacité de transformation la plus élevée (Fontana et al., 2017). Le test de transformation des cellules Bhas 42 est donc pertinent cependant il reste un test relativement long à réaliser. C'est pourquoi le développement d'un test de criblage rapide pour évaluer le potentiel transformant des substances chimiques, incluant les SAS, est requis. L'objectif de cette thèse était donc de rechercher par une approche transcriptomique une signature précoce de gènes impliqués dans les effets transformants des SAS sur les cellules Bhas 42 qui pourrait être utilisée pour le test de criblage.

Il s'agissait :

- de décrypter les effets moléculaires de la SAS pyrogénée NM-203 ;
- de comparer les changements d'expression des gènes dans les cellules Bhas 42 exposées à la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (témoin particulaire positif), le TPA (témoin positif) et la terre de diatomée (témoin particulaire négatif) ;
- d'identifier une signature de gènes prédictive des effets transformants des agents chimiques ;
- d'étudier la corrélation entre les ARNm et les protéines ;
- de définir la meilleure méthode de criblage permettant d'évaluer le potentiel transformant des SAS ;
- d'étudier si cette signature était retrouvée avec d'autres SAS (précipitées NM-200 et NM-201 et pyrogénée NM-202) ;
- et d'étudier l'évolution de cette signature en fonction du temps d'exposition des cellules Bhas 42 à la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA.

Chapitre III : MATERIELS ET METHODES

1. Culture de la lignée cellulaire Bhas 42

La lignée cellulaire Bhas 42 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank No.: JCRB0149) est une lignée murine issue des cellules BALB/c 3T3 transfectées avec l'oncogène viral *v-Ha-RAS* afin de rendre *RAS* actif constitutivement. La lignée de cellules Bhas 42 est constituée de cellules fibroblastiques adhérentes. Elles sont fournies par Harlan Laboratories (Rossdorf, Allemagne) au passage 19 par rapport au clone d'origine.

Afin d'obtenir un lot de cellules suffisamment important du même passage, les cellules Bhas 42 du passage P19 ont été décongelées puis cultivées dans le milieu M10F [minimum essential medium (MEM) (1 g/L de glucose - Gibco), (Invitrogen, France), supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine (v/v) (pénicilline : 10 000 U/mL ; streptomycine : 10 000 µg/mL - Gibco) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (v/v) (Dutscher, France)] dans un incubateur maintenu en atmosphère humide et à 5% de CO₂. Lorsque les cultures ont atteint environ 70% de confluence, les cellules ont été récupérées en utilisant de la trypsine/ ethylènediaminetétraacétique (EDTA) à 0,25% (v/v) (Invitrogen). Après amplification (quatre passages), les cellules ont été resuspendues à 5x10⁵ cellules/mL dans une ampoule contenant 0,5 mL de milieu M10F frais et 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO), Sigma Aldrich, France), congelées à -80°C et conservées dans de l'azote liquide.

Afin d'être utilisées pour le test de transformation, une ampoule, contenant des cellules Bhas 42 P23, a été décongelée 7 jours avant l'expérience puis les cellules ont étéensemencées à 2400 cellules/cm² (15 000 cellules/mL) dans un flacon de culture (75 cm²) contenant du milieu M10F. Après 4 jours de culture (soit 3 jours avant l'expérience), les cellules ont été trypsinées puis réensemencées à 4000 cellules/cm² (25 000 cellules/mL) dans des flacons de culture contenant du milieu de culture DF5F [Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium (DMEM/F12) (3 g/L de glucose - Gibco), (1/1) (Invitrogen) supplémenté de 1% pénicilline-streptomycine (v/v) (pénicilline : 10 000 U/mL ; streptomycine : 10 000 µg/mL - Gibco) et de 5% de SVF (v/v)].

2. Le test de transformation sur les cellules Bhas 42 et test de survie cellulaire

2.1 Test de transformation en trois traitements

Après décongélation des cellules et amplification, les cellules ont étéensemencées en condition de promotion à 1460 cellules/cm² dans 2 mL de milieu (soit 14 000 cellules/puits), au jour 0 dans des plaques 6 puits. Au jour 4, les cellules ont été traitées avec l'agent chimique à tester durant la phase stationnaire. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais contenant l'agent à tester. Le traitement a été renouvelé aux jours 7 et 10. Au jour 14, le milieu a été remplacé par du milieu seul. Au jour 21, les cellules ont été rincées au tampon phosphate salin (PBS) (144 mg/L KH₂PO₄, 9 g/L NaCl, 795 mg/L Na₂HPO₄-7H₂O (Invitrogen), puis fixées avec 2 mL d'éthanol absolu pendant 10 minutes. Elles ont ensuite été colorées pendant 30 minutes avec 2 mL de giemsa 5% (v/v). Après rinçage à l'eau

et séchage, les foyers ont été dénombrés à l'aide d'un microscope binoculaire (**Figure 15**). Une photo d'un foyer après 21 jours de culture et une coloration au giemsa est présentée **Figure 16**.

Au jour 7, un test de survie cellulaire a été effectué (cf paragraphe 2.3).

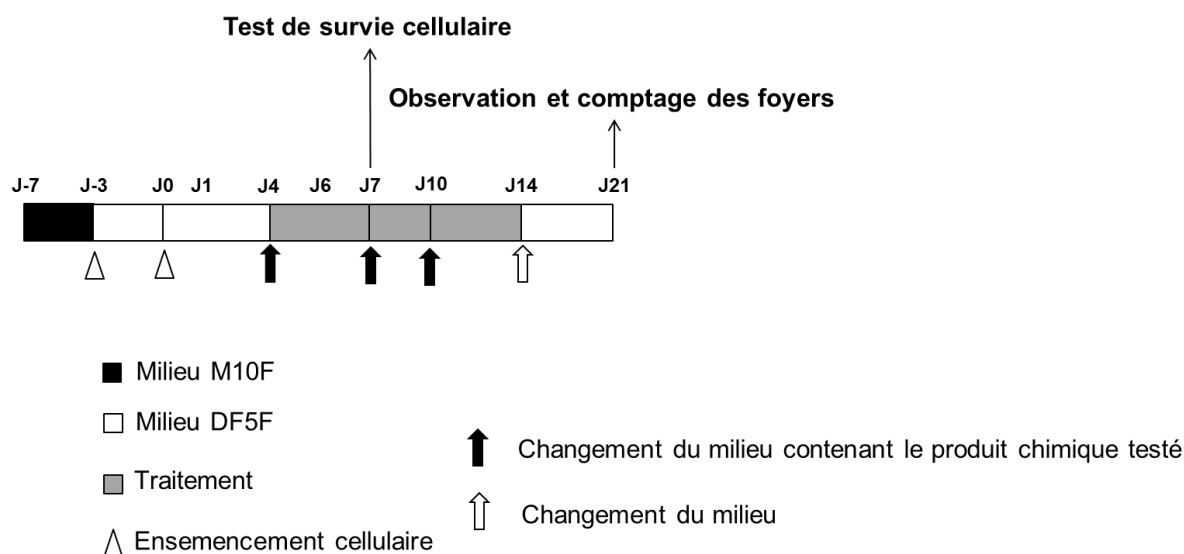


Figure 15 : Protocole du test de transformation cellulaire dans des conditions de promotion standards sur les cellules Bhas 42 (cellules en phase stationnaire).

7 jours avant l'expérience, les cellules sont décongelées dans du milieu M10F. Après 4 jours de culture, les cellules sont cultivées pendant 3 jours dans du milieu DF5F. Les cellules sont ensemencées à J0 en condition de promotion puis traitées trois fois à J4, J7 et J10 avec l'agent chimique présent dans le milieu frais. Le milieu contenant l'agent testé est remplacé par du milieu frais à J14. A J21, les cellules sont colorées avec du giemsa et un comptage des foyers est réalisé. M10F : milieu MEM (Minimum essential medium) supplémenté avec 1% pénicilline-streptomycine et 10% de SVF (sérum de veau fœtal) ; DF5F : milieu DMEM/F12 (Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium) supplémenté de 1% pénicilline-streptomycine et de 5% de SVF ; J : Jour

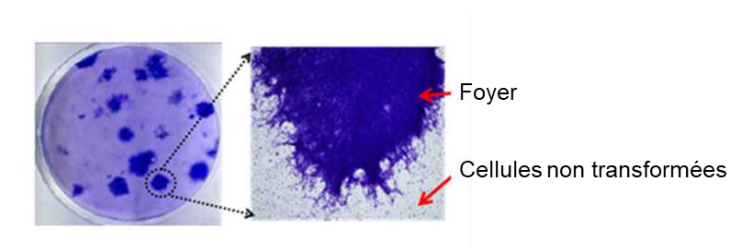


Figure 16 : Photo d'un foyer après 21 jours de culture et une coloration au Giemsa.

2.2 Test de transformation en un traitement

Afin de vérifier si un traitement unique avec les particules de silice peut conduire à une transformation cellulaire, une expérience a été réalisée en effectuant un seul traitement au jour 4 (comme dans le protocole classique). Aux jours 7, 10 et 14, le milieu a été changé, sans ajout de particules supplémentaires. Les cellules ont été ensuite colorées classiquement au jour 21 (**Figure 17**). Le test de survie cellulaire reste identique à celui effectué dans le protocole classique (cf paragraphe 2.3).

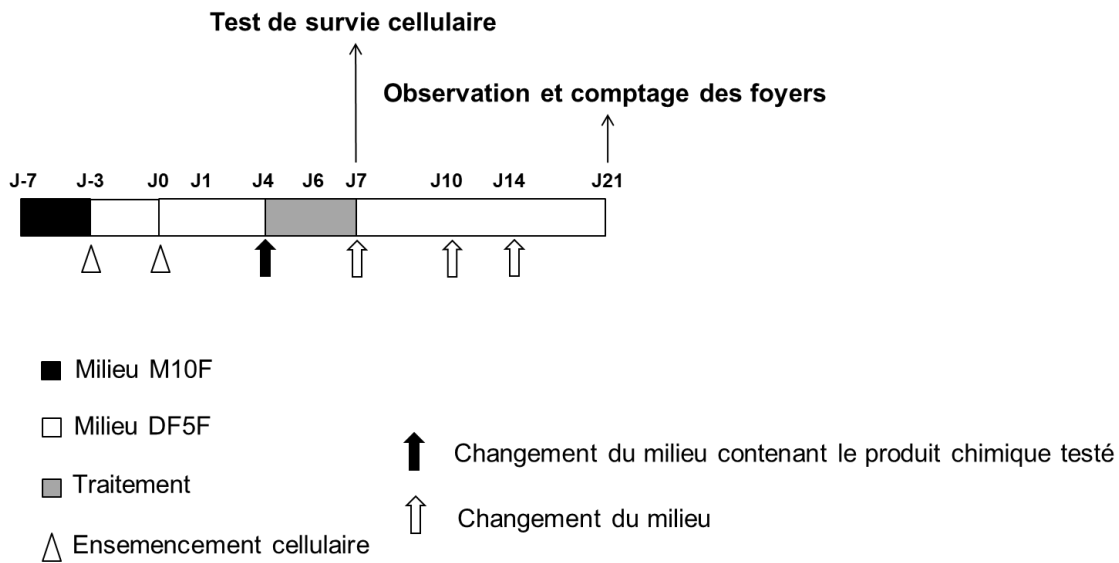


Figure 17: Principe du test de transformation cellulaire dans des conditions de promotion en traitement unique sur cellules Bhas 42.

Le début du test est identique au protocole classique. A J0, les cellules sont ensemencées en condition de promotion puis traitées une fois à J4 avec l'agent chimique. Le milieu contenant l'agent testé est remplacé par du milieu frais à J4, puis des changements de milieu sont également réalisés à J7, J10, et J14. A J21, les cellules sont colorées avec du giemsa et un comptage des foyers est réalisé. En parallèle un test de survie cellulaire est effectué dans les mêmes conditions que le protocole classique. Les critères de sélection des doses à tester dans le test de transformation sont également identiques.

2.3 Test de survie cellulaire à J7

Pour le test de survie cellulaire, les étapes précédentes étaient les mêmes jusqu'au jour 7. Les cellules ont été trypsinées et un aliquot de la suspension cellulaire a été coloré avec un mélange acridine orange/iodure de propidium puis analysé à l'aide d'un Cellometer[®] vision (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). L'acridine orange colore en vert toutes les cellules, l'iodure de propidium colore en rouge les noyaux des cellules mortes. La survie cellulaire est exprimée en pourcentage de cellules vivantes dans les cultures traitées par rapport aux cellules vivantes dans les cultures témoins.

2.4 Choix des concentrations pour le test de transformation

Les résultats des tests de cytotoxicité guident le choix des concentrations à sélectionner dans les tests de transformation. Le rapport de l'OCDE préconise de tester au moins deux doses en-dessous de la dose sans effet toxique observable (NOAEL) dans le test de transformation ; deux doses situées entre la NOAEL et concentration inhibitrice 50 (CI50) et une dose entre la CI50 et la CI90 (OECD, 2016).

2.5 Identification des foyers transformés et interprétation des résultats

Les foyers de transformation ont été observés en utilisant un microscope binoculaire. Comme décrit dans l'introduction (**Figure 12**), les foyers se caractérisent par différentes propriétés morphologiques. Un catalogue d'images représentant différents types de foyers négatifs et positifs a été publié afin

d'aider à la reconnaissance de ces foyers transformés et de les distinguer des foyers non transformés (Sasaki et al., 2012).

Selon la ligne directrice OCDE concernant le test de transformation cellulaire Bhas 42 (OECD, 2016), un composé est dit transformant si au minimum deux doses induisent une augmentation significative du nombre de foyers transformés par rapport aux cultures témoins. Si une seule dose induit une augmentation significative du nombre de foyers mais que la réponse est dose dépendante, il est aussi considéré comme positif. En revanche, dans le cas d'une seule dose significative mais sans dose réponse, le composé est alors classé comme équivoque et à confirmer en recommençant l'expérience et en élargissant la gamme de dose. De plus, pour être considéré comme valide, en condition de promotion, le nombre de foyers spontanés dans les conditions témoins doit être inférieur à 12 dans une plaque de 6 puits de 9,6 cm². Enfin, si aucune des doses n'induit d'augmentation significative, le composé est considéré comme non transformant.

3. Particules et traitements cellulaires

3.1 Caractéristiques physico-chimiques des particules de silice

Les échantillons de nanomatériaux de silice utilisés dans cette étude sont des nanoparticules de silice amorphes dite « précipitées » ou « pyrogénées ». Les SAS précipitées NM-200 et NM-201, et les SAS pyrogénées NM-202 et NM-203 ont été obtenues auprès du centre de recherche : the European commission's joint research center (EC-JRC, Ispra, Italie), un organisme qui référence des lots de nanomatériaux manufacturés et caractérise leurs principaux paramètres physico-chimiques. Une microparticule de silice cristalline, le quartz Min-U-Sil 5[®], a été obtenue auprès de US Silica Co. Une silice micrométrique amorphe, la silice amorphe DE a également été utilisée. La silice amorphe DE a été obtenue auprès de la communauté Européenne du charbon et de l'acier (CECA, Paris, France). Les caractéristiques physiques et chimiques des lots de SAS, de la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et de la silice amorphe DE ont été établies dans des études précédentes (Elias et al., 2006; Fontana et al., 2017; Rasmussen et al., 2013) et sont présentées dans les **Tableaux 1 et 7**.

Tableau 7 : Caractérisations physico-chimiques de la silice cristalline Min-U-Sil 5® et de la silice amorphe DE.

Silices	Origine	Principale Phase	Taille de la particule ^a	Impuretés (wt%) ^b	BET SSA (m ² /g) ^c	DLS ^d	
						Z-average dans l'eau (nm)	Indice de polydispersité
Min-U-Sil 5®	natural	crystalline	1,33 ± 0,85 µm	Al (0,16); Fe (0,05); Ca (0,04); Mg (0,01)	5	1385,7 ± 377,0	0,318 ± 0,130
DE	natural	amorphous	1,35 ± 1,48 µm	Al (1,4); Fe (1,3); Ca (2,2); Ti (0,3); Mg (0,2)	20	ND	ND

^a La taille a été déterminée par microscopie électronique à transmission.

^b Les impuretés ont été déterminées par spectrométrie de dispersion d'énergie.

^c La surface spécifique BET (Brunauer-Emmet-Teller) a été déterminée par adsorption d'azote. En injectant un nombre de molécule d'azote, sous forme gazeuse, connu dans un tube contenant des nanoparticules, l'azote va s'adsorber sur la surface de l'ensemble des particules sous la forme d'une monocouche. Après dégazage des molécules non adsorbées et connaissant la valeur de la surface de molécules de gaz adsorbées en monocouche, la surface spécifique va alors pouvoir être déterminée par l'équation suivante :

$S = n \times S_m$; Où : S = Surface totale de l'échantillon ; n = nombre de molécules de gaz adsorbées en monocouche ; S_m = surface d'une molécule de gaz.

^d La diffusion dynamique de la lumière (en anglais, *dynamic light scattering* ou DLS) a été réalisée à l'aide d'un Nanozetasizer (Malvern). Les échantillons ont été dispersés dans de l'eau comme décrit dans la section Matériels et méthodes. Les valeurs représentent la moyenne ± écart type de trois analyses DLS. La DLS est une technique d'analyse spectroscopique utilisée afin de déterminer le diamètre apparent de particules en suspension dans un liquide.

^e Non déterminé, les données obtenues par analyse DLS ne répondaient pas aux critères de qualité.

3.2. Préparation des échantillons et traitement cellulaire

Les suspensions de silice ont été préparées à la concentration appropriée avec de l'eau ultra-purifiée (Elga, France) filtrée à 0,22 µm (filtres Millipore, France). Ces suspensions ont été réalisées dans des tubes en verre, puis soumises à une ultra-sonication pendant 5 minutes à une amplitude de 10% à l'aide d'un sonicateur muni d'un système cuphorn (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, Connecticut).

Des dilutions en série ont été préparées dans de l'eau ultra-purifiée à partir de la suspension traitée aux ultrasons. Chaque dilution a été ajoutée dans le milieu de culture DF5F, permettant d'obtenir une concentration finale en eau de 2% (v / v). Les concentrations finales en particules ont été exprimées en masse par surface de culture cellulaire, dans un intervalle de concentration allant de 1 µg/cm² à 40 µg/cm², selon la particule étudiée. Le TPA a été dilué à 0,05 µg/mL dans du DMSO (Sigma Aldrich) à une concentration finale de 0,1% (v / v).

4. Analyse de l'expression génique

4.1 Extraction d'ARN pour les analyses par transcriptomique et RT-qPCR

Les échantillons d'ARN ont été obtenus à partir de quatre expériences indépendantes. Après 48h de traitement des cellules Bhas 42, le milieu a été aspiré et les cellules ont été lavées au PBS (144 mg/L KH_2PO_4 , 9 g/L NaCl, 795 mg/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Invitrogen)). Le PBS a été aspiré et les cellules ont été lysées dans 350 μL de tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidinium (tampon RLT). Puis les échantillons ont été vortexés et congelés à -80°C . Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) conformément aux instructions du fabricant.

Les échantillons ont été déposés sur des colonnes Qiasredder permettant d'éliminer les débris cellulaires. Les échantillons ont été ensuite centrifugés 1 min à 8000 g et l'éluat a été déposé sur des colonnes DNAg Eliminator afin d'éliminer l'ADN génomique. Les échantillons ont été alors centrifugés 1 min à 8000 g puis mélangés avec 350 μL d'éthanol 70% (v/v). Ce mélange a été déposé sur des colonnes RNeasy Mini spin qui ont une grande affinité pour les ARN. Les échantillons ont été centrifugés 1 min à 8000 g, lavés avec un tampon RW1 puis deux fois avec du tampon RPE contenant de l'éthanol. L'éluat a été jeté et les échantillons ont été centrifugés 1 min à 8000 g. Enfin, les ARN ont été élués avec 30 μL d'eau et dosés à l'aide d'un nanospectrophotomètre (NanoPhotometer® P-Class, Implen, France).

4.2 Vérification de la qualité des ARN

La qualité des ARN a été vérifiée dans un premier temps par un gel d'agarose (2%) contenant 0,001% de Gel Red (Biotum), un intercalant de l'ADN. Une quantité de 500 ng d'ARN mélangée à 1 μL de bleu de bromophénol a été déposée dans les puits du gel d'agarose. La migration a été effectuée pendant 30 minutes à 100 V dans du tampon Tris Acétate EDTA 1X (TAE, 40 mM de Tris, 20 mM d'acide acétique et 1 mM d'EDTA (BioRad)). Les échantillons ont été révélés à l'aide du système Gel Doc™ (BioRad) par exposition aux UV grâce au logiciel Quantity One™.

Une analyse de la qualité des ARN a également été réalisée avec un bio analyser 2100 expert (Agilent, Allemagne) en utilisant le Kit Agilent RNA 6000 nano Reagent. Le kit a été utilisé selon le protocole fourni. Une concentration de 100 ng/ μL d'ARN a été chauffée 2 min à 70°C afin de les dénaturer. Un volume de 65 μL de gel d'agarose a été déposé sur un filtre et centrifugé 10 min à 1500 g à température ambiante. Un volume de 1 μL de cyanine 3 a été mélangé au gel. Ce mélange a été ensuite vortexé 10 secondes et centrifugé 10 min à 13000 g à température ambiante. Un volume de 9 μL de gel a été déposé dans les puits correspondants sur la puce. Puis un volume de 5 μL de marqueur de fluorescence a été déposé dans chacun des puits. Enfin, un volume de 1 μL de marqueur de taille et un volume de 1 μL d'échantillons ont été déposés dans les puits correspondants. La puce a été vortexée 1 min à 2400 tours/min puis déposée dans l'appareil d'analyse.

Pour être considérés comme étant de bonne qualité, les échantillons d'ARN utilisés pour les analyses d'expression de gènes doivent avoir un RNA integrity number (RIN) supérieur à 7. Dans notre étude, tous les échantillons d'ARN possédaient un RIN supérieur à 8,0 et étaient donc de bonne qualité.

4.3 Analyse Transcriptomique

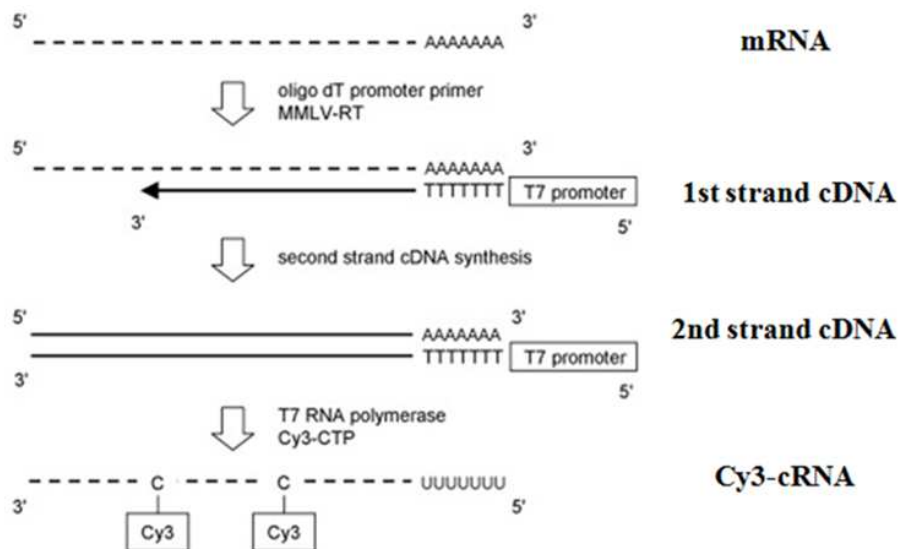


Figure 18 : Les différentes étapes de la préparation d'une puce à ADN.
(Plate-forme « Génomique Santé », Biosit Rennes)

4.3.1 Conditions expérimentales

L'analyse transcriptomique a été réalisée avec les ARN totaux extraits des cellules traitées durant 48h. Les cellules ont été exposées à de la SAS pyrogénée NM-203 (1, 2 et 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), la silice amorphe DE (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), TPA (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et à leur témoin associé, 2% (v / v) de H₂O pour la SAS pyrogénée NM-203, la silice amorphe DE et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et 0,1% (v / v) de DMSO pour le TPA. Les différentes étapes de la préparation d'une puce à ADN sont présentées **Figure 18**.

4.3.2 Synthèse de l'ARNc marqué

A l'aide du kit de marquage QuickAmp à une couleur (one-color low-input QuickAmp labeling kit (Agilent Technologies)), une quantité de 100 ng d'ARNm a été rétrotranscrite et amplifiée en ADNc simple brin à l'aide d'une amorce d'oligo dT contenant une séquence promotrice T7 qui est reconnue par la T7 RNA polymérase.

Puis, les échantillons ont été soumis à une étape de dénaturation afin de déshybrider l'ADNc de l'ARN encore présent à cette étape, et le second brin a été synthétisé grâce à la transcriptase inverse. Enfin les ADNc ont été transcrits en ARN marqués à la cyanine 3 (Cy3) grâce à la T7 RNA polymérase qui se fixe sur le promoteur T7 pour déclencher la transcription des ADNc. Durant cette étape, des désoxycytidines marquées à la cyanine 3 ont été incorporées dans les brins d'ARN nouvellement transcrits. Les ARN ainsi obtenus sont appelés ARNc.

4.3.3 Purification des ARNc et dosage

Les ARNc ont été purifiés à l'aide du Kit RNeasy mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) avec une adaptation du protocole présenté précédemment. Dans chaque tube, un volume de 84 µL d'eau a été ajouté afin d'obtenir un volume final de 100 µL. Puis 350 µL de tampon RLT ont été ajoutés à chaque échantillon qui ont été vortexés 5 à 10 secondes. A ce mélange ont été ajoutés 250 µL d'éthanol 95% (filtré) dans chaque tube qui ont été de nouveau vortexés 2 à 3 secondes. Le mélange a été ensuite transféré sur les colonnes RNeasy mini spin qui ont été centrifugées 30 secondes à 18000 g à 4°C. L'éluat a été conservé puis lavé une première fois avec 500 µL de tampon RPE. Les échantillons ont été centrifugés 30 secondes à 18000 g à 4°C, puis lavés une deuxième fois avec 500 µL de tampon RPE. Les échantillons ont été centrifugés 1 min à 18000 g à 4°C, l'éluat a été jeté et une deuxième centrifugation a été réalisée 30 secondes à 18000 g à 4°C. Enfin les ARN ont été élués dans 30 µL d'eau exempte de RNase.

Les échantillons ont été ensuite dosés au nanospectrophotomètre grâce au programme acide nucléique, RNA-dye pour avoir la concentration en cyanine 3. Un calcul du rendement a été effectué : $[\text{ARNc}] \text{ (ng/}\mu\text{L)} * \text{volume élution (30}\mu\text{L)} / 1000$, ce rendement devant être au moins supérieur à 0,825. L'activité spécifique en cyanine 3 a été également déterminée : $[\text{Cy3}] \text{ (pmol/}\mu\text{L)} / [\text{ARNc}] \text{ (ng/}\mu\text{L)} * 1000$, celle-ci devant être au moins supérieure à 6. Dans notre étude, tous les échantillons avaient un rendement supérieur à 0,825 et une activité spécifique supérieure à 6.

4.3.4 Hybridation

Les ARNc ont été ensuite fragmentés avec un tampon de fragmentation et chauffés 30 min à 60°C, avant d'être hybridés pendant 17h sur des puces Agilent de souris (sureprint G3 mouse gene expression v2 8x60k pangenomic microarray) (Agilent Technologies). Les lames ont été désassemblées de la chambre d'hybridation dans un tampon de lavage wash buffer 1 dans un premier bac. Les lames ont ensuite été transférées dans le wash buffer 1 dans un deuxième bac et lavées 1 minute sous agitation face hybridée vers le flux, à l'abri de la lumière. Puis les lames ont été transférées dans un troisième bac contenant une solution de wash buffer 2 à 37°C et lavées 1 minute sous agitation face hybridée vers le flux à l'abri de la lumière. Enfin, les lames ont été retirées délicatement et horizontalement du tampon de lavage mais avec rapidité et sans à-coups. Les lames ont été scannées à l'aide d'un scanner Agilent (laboratoire de génétique médicale ; Service de cytogénétique et génétique moléculaire ; CHU de Nancy - Hôpitaux de Brabois).

4.3.5 Extraction des données

Les données d'expression génique ont été extraites à l'aide de Feature Extraction 11.0.1.1 (Grid ID : Design 074809) et analysées à l'aide du logiciel GeneSpring 14.9-GX-PA (Agilent Technologies). Les données d'intensité brute ont été normalisées *via* la méthode des percentiles shift. Pour l'analyse globale des données (toutes les conditions), pour étudier l'effet dose de la SAS pyrogénée NM-203 et

pour déterminer les gènes modulés de manière significative entre deux conditions (traitement vs contrôle (H₂O ou DMSO)), les données ont été filtrées comme suit :

quand dans au moins une des conditions, les sondes présentaient une intensité de fluorescence détectable dans 75% des réplicats ;

quand dans au moins une des conditions les sondes présentaient une intensité de fluorescence supérieure au bruit de fond (>150) dans au moins 75% des réplicats ;

quand dans au moins une des conditions, les sondes présentaient une intensité de fluorescence inférieure ou supérieure aux valeurs les plus extrêmes (fixées à 20%) dans 75% des réplicats, les sondes ont été conservées dans l'analyse.

Un résumé des différentes étapes réalisées est disponible avec le **Tableau 8**. Les données obtenues ont été déposées dans le Gene Expression Omnibus du NCBI et sont accessibles *via* GEO à l'adresse suivante : (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE133279>).

Tableau 8 : Normalisation, filtration des données et tests statistiques.

	Normalisation	Filtre sur les flags	Filtre sur les expressions	Filtre sur les percentiles	Test statistique
Regroupement hiérarchique des données	Percentile shift	Conservation des valeurs détectées dans 75% des réplicats, dans au moins une condition	Conservation des valeurs supérieures au bruit de fond (<150) dans 75% des réplicats, dans au moins une condition	Conservation des valeurs inférieures ou supérieures aux valeurs les plus extrêmes dans au moins une condition dans 75% des réplicats	Pas de test statistique
Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203					ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey et d'un test de correction multiple de Benjamini-Hochberg (p-value <0,005 ; FC > 4)
NM-203 (1 µg/cm ²) vs Témoin H ₂ O					T-test non païré suivi d'un test de correction multiple de Benjamini-Hochberg (p-value < 0,05 ; FC > 2 et p-value <0,005 ; FC > 4)
NM-203 (2 µg/cm ²) vs Témoin H ₂ O					
NM-203 (5 µg/cm ²) vs Témoin H ₂ O					
Min-U-Sil 5 [®] (20 µg/cm ²) vs Témoin H ₂ O					
DE (5 µg/cm ²) vs Témoin H ₂ O					
TPA vs Témoin DMSO					

4.3.6 Principal component analysis (PCA)

Une analyse PCA a été réalisée à l'aide du logiciel Genespring dans le but d'obtenir une représentation graphique de la répartition des intensités de fluorescence correspondant aux différents réplicats dans l'espace. Sur le graphique de la **Figure 22 p 62**, chaque intensité de fluorescence pour chaque échantillon a des coordonnées en trois dimensions dans l'espace (axes x, y, z). Si les coordonnées des réplicats sont proches dans l'espace, on peut considérer qu'ils constituent un groupe homogène.

4.3.7 Test statistique

Pour déterminer l'effet dose de la SAS pyrogénée NM-203 (à 1, 2 et 5 µg / cm²), une ANOVA à un facteur, suivie d'un test post-hoc de Tukey et d'un test de correction multiple de Benjamini-Hochberg,

ont été réalisés avec une p- valeur < 0,005 et un fold change FC > 4. Pour déterminer les gènes modulés de manière significative entre 2 conditions (traitement vs témoins (H₂O ou DMSO)), un test t non apparié (correction Benjamini-Hochberg) avec une p-value <0,05, FC> 2 ou avec une p-value <0,005, FC> 4 a été utilisé.

4.3.8 Analyses bio-informatiques

Les données de la micropuce ont été regroupées avec le logiciel Gene Cluster 3.0 et l'arborescence a été visualisée à l'aide du logiciel TreeView 1.6. Une corrélation non centrée a été appliquée pour la mesure de la similarité et un couplage complet a été appliqué pour la classification génique. Les fonctions biologiques correspondant aux principaux groupes ont été évaluées à l'aide de l'outil FuncAssociate 2.0. Les principales voies de signalisation ont été identifiées à l'aide des logiciels, Ingenuity Pathway Analysis version 2019 (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, Californie, États-Unis), Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (Panther) v14.1 et The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 et une analyse d'enrichissement des signatures a été réalisée avec le logiciel Gene Set Enrichement Analysis (GSEA) v4.0.0 à l'aide de l'outil Java développé au Broad Institute (Cambridge, MA, États-Unis) sur une liste normalisée et filtrée de gènes. L'analyse GSEA non supervisée a été réalisée avec la collection d'ensembles de gènes C2 sélectionnés *via* la base de données des signatures moléculaires (MSigDB). Le score d'enrichissement (ES) est déterminé après 1000 permutations. Enfin les diagrammes de Venn ont été réalisés grâce au site internet : <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>.

4.4 RT-qPCR

4.4.1 Transcription inverse

Les ARN (500 ng) ont été rétrotranscrits en ADNc grâce au Kit iScript cDNA synthesis (BioRad) selon les recommandations du fournisseur. Aux ARN ont été ajoutés le tampon de la réaction et la transcriptase inverse. Deux contrôles ont été effectués, un sans enzyme et un sans ARN, afin de vérifier que les échantillons n'étaient pas contaminés par de l'ADN. Les échantillons ont été incubés suivant le programme : 5 min à 25°C, 30 min à 42°C, 5 min à 85°C puis sont conservés à -20°C.

4.4.2 Amplification par PCR en temps réel

L'amplification de 10 ng d'ADNc a été réalisée en présence de iQTM SYBR® Green Supermix (BioRad) additionné de 1 µL de PrimerPCR assay (selon les recommandation du fournisseur, BioRad) (les références sont fournies dans le **Tableau 9**) ou de 2,5 µM des amorces sens et anti-sens (Eurogentec, Anger, France) spécifiques des gènes d'intérêts (**Tableau 9**). L'amplification et la détection de la fluorescence des produits de PCR ont été réalisées dans un appareil à PCR en temps réel (CFX96 TouchTM (BioRad)) suivant le programme : 1 cycle de 2 min à 95°C afin d'activer l'enzyme et de dénaturer l'ADN, 40 cycles de 5 secondes à 95°C pour dénaturer les brins et de 30 sec à 60°C pour permettre l'hybridation et l'amplification, suivie d'une courbe de dissociation pour vérifier l'absence

d'amplification de produits aspécifiques ou la formation de dimères d'amorces. Les résultats de la PCR ont été analysés à l'aide d'une droite standard. Une gamme a été réalisée à chaque PCR afin de déterminer une quantité d'ADNc nommée Sq (une quantité arbitraire) par le logiciel. Les résultats de la PCR ont été analysés à l'aide de la méthode Sq. Les résultats ont été exprimés par rapport à ceux des cellules témoins traitées avec H₂O ou DMSO, fixées arbitrairement à 1. La β -Actine (ACTB), l' α -Tubuline (TUBA) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ont été utilisées comme gènes de ménage dont les valeurs ont été moyennées (moyenne géométrique). Le design des amorces a été effectué grâce à l'outil informatique Primer 3 plus. Les produits d'amplification et la taille des amplicons ont été vérifiés par dépôts sur gel d'agarose.

Tableau 9 : Référence et séquences nucléotidiques des amorces utilisées.

Gènes	Séquences des nucleotides ou Références des amorces	Numéro d'accession	Taille des amplicons
<i>ACTB</i>	Sens : GGCCAACCGTGAAAAGATGA Anti-sens : TACGACCAGAGGCATACAGG	NM_007393.5	104
<i>TUBA</i>	Sens : CACTACACCATTGGCAAGGA Anti-sens : GCTGTGGAAAACCAAGAAGC	NM_011653.2	102
<i>GAPDH</i>	Sens : CTGCACCACCAACTGCTTAG Anti-sens : GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	NM_001289726.1	108
<i>c-MYC</i>	Sens : CCCTAGTGCTGCATGAGGA Anti-sens : TGCCTTCTCCACAGACAC		103
<i>IL1RL1 Isoforme B</i>	Sens : TGTGTCTCTGCCTGAAGTGG Anti-sens : CTGGCCACCTAGGAATCAAA	NM_010743.3	246
<i>PRL2C1</i>	Sens : CTGCCACTCTTGCAATCTGA Anti-sens : AACGCACTTCAGGACGTTG	NM_001361045.1	120
<i>PRL2C3</i>	Sens : GGCTTCCAACCTCCAGTAAAG Anti-sens : CAGTATCCGGGAGCATGGTT	NM_011118.2	105
<i>PRL2C5</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Prl2c5, Mouse qMmuCID0041010	MGI:1858413	198
<i>AUNIP</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: 2610002D18Rik, Mouse qMmuCID0019311	MGI:1917135	70
<i>LGALS7</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Lgals7, Mouse qMmuCED0040994	MGI:1316742	61
<i>LUM</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Lum, Mouse qMmuCID0018636	MGI:109347	119
<i>MCM10</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Mcm10, Mouse qMmuCED0039695	MGI:1917274	99
<i>POSTN</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Postn, Mouse qMmuCID0026147	MGI:1926321	87
<i>RAD51AP1</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Rad51ap1, Mouse qMmuCID0013473	MGI:1098224	117
<i>SEMA3G</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Sema3g, Mouse qMmuCID0024300	MGI:3041242	77
<i>SPARCL1</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Sparcl1, Mouse qMmuCID0013589	MGI:108110	79
<i>TIMP4</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Timp4, Mouse Tissue inhibitor of metalloproteinase 4 qMmuCID0027280	MGI:109125	133

5. Analyse protéique

5.1 Extractions protéiques

Les cellules ont été exposées à J4 pendant 2 jours en présence de la SAS pyrogénée NM-203 (1, 2 et 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), la silice amorphe DE (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), du TPA (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et de leur témoin associé : H₂O à 2% (v / v) pour la SAS pyrogénée NM-203, la silice amorphe DE et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et DMSO à 0,1% (v / v) pour le TPA).

A J6, les milieux cellulaires ont été récoltés et conservés à -80 ° C. Les couches de cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS froid (1,44 mM de Na₂HPO₄, 0,2 mM de KH₂PO₄ contenant du NaCl à 0,148 M, 2 mM de KCl) et grattées avec un grattoir en caoutchouc dans du tampon radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) glacé (50 mM de Tris-HCl, pH 8 contenant 150 mM de NaCl, 1% (v / v) de Triton X-100, 0,5% (p / v) de désoxycholate de sodium, 0,1% (p / v) de dodécylsulfate de sodium (SDS) et 1% (v / v) d'un mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Thermo Scientific). Les homogénats obtenus ont été placés sous agitation pendant 30 min à 4°C, puis centrifugés à 16 000 g pendant 20 min à 4 °C. Un dosage colorimétrique des protéines a été effectué afin d'estimer la concentration en protéines dans chaque échantillon à l'aide d'un kit de quantification de protéines (Sigma-Aldrich) conformément au protocole du fabricant, en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme étalon (kit de quantification des protéines, Sigma-Aldrich).

5.2 Western blot

Une quantité de 50 μg de protéines a été mélangée avec le tampon de Laemmli 1X (BioRad) et une quantité de 15 μL de protéines du milieu a été mélangée avec ce même tampon. Dans les deux cas, les échantillons ont été dénaturés 5 min à 95°C avant d'être déposés sur un gel en gradient de polyacrylamide de 4 à 20% (Criterion[™] Stain-Free Protein Gel, BioRad). Les protéines ont migré selon leur poids moléculaire à 300 V dans du tampon de migration Tris-Glycine-SDS 1X (BioRad). Puis, le transfert a été réalisé dans des conditions « semi-liquides » à l'aide du système TransBlot Turbo (BioRad) sur une membrane de PolyVinylidèneFluoride (PVDF) à 2,5 A pendant 10 min. Les membranes ont été activées pendant 1 min dans de l'éthanol 100% puis rincées dans du PBS-Tween 1X pH 7 (PBS-T, 8% de NaCl (p/v); 0,2% de KCl (p/v); 1,44% de Na₂HPO₄ (p/v); 0,2% de KH₂PO₄ (p/v); et de 0,1% de Tween 20 (v/v)). L'étape de saturation a été réalisée dans le tampon PBS-Tween 1X pH 7 contenant 5% (p/v) de lait écrémé pendant 1 h à température ambiante.

Les membranes ont été ensuite lavées 3 fois 5 min dans du PBS-Tween 1X pH 7. Les solutions d'anticorps primaires ont été préparées dans le tampon PBS-Tween 1X pH 7 contenant 5% (p/v) de BSA et les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires dirigés contre la Aurora kinase A and Ninein interacting protein (AUNIP, Cell signaling; 1: 500), Galectin-7 (ab206435; Abcam; 1: 1000), Lumican (LUM, 7076P2, Cell signaling; 1: 250), Interleukin1 receptor-like 1 (IL1RL1, Cell signaling, 1: 1000), Mini Chromosome Maintenance deficient 10 (MCM10, Cell signaling; 1: 500), Proliférine (AF1623; R&D System; 1: 1000), Metallopeptidase inhibitor 4 (TIMP4, Abcam; 1: 2000), β -Actine (4970; Cell signaling; 1: 10000) pendant une nuit à 4°C sous agitation et lavées 3 fois 5 min dans du PBS-

Tween 1X pH 7. Les membranes ont été incubées pendant une heure à température ambiante avec des IgG anti-chèvre conjuguées à la horseradish peroxidase (HRP) (1 :5000) ou avec des IgG anti-lapin conjuguées à la HRP (1 :2000) dans du PBS-Tween 1X pH 7 contenant 5% (p/v) de lait écrémé puis lavées 3 fois 5 min dans du PBS-Tween 1X pH 7.

Enfin, les membranes ont été révélées par chimioluminescence par le système ChemiDoc™ grâce à un mélange de solution (v/v) contenant du luminol, le substrat de la HRP, et du peroxyde, permettant la catalyse de la réaction (Clarity™ Western ECL Substrate, Biorad). Le signal de chimioluminescence a été quantifié à l'aide du logiciel Image Lab™. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

5.3 Dosage de la périostine par enzyme-linked immuno assay (ELISA)

Les milieux de culture de trois expériences indépendantes ont été collectés après 48h de traitement. Le taux de périostine a été mesuré en utilisant le kit ELISA Mouse Periostin/OSF-2 DuoSet (R&D Systems). Brièvement, les anticorps de capture ont été fixés dans les puits de la plaque de 96 puits, une nuit à température ambiante. Trois lavages ont été effectués avec du tampon (0,05% Tween®20 dans du PBS, pH 7,2-7,4) en utilisant le laveur automatique (HydroFlex™, Tecan). Ces lavages ont été répétés à chaque étape. Les sites de liaisons non spécifiques ont été ensuite saturés par du PBS/BSA à 1% pendant une heure à température ambiante. Les différents points de gamme et les échantillons ont été déposés deux heures à température ambiante. L'anticorps de détection a été déposé pendant deux heures à température ambiante. La streptavidine (STR) couplée à la HRP a été déposée pendant 20 min à température ambiante. Le substrat de la HRP, le 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) a été déposé pendant 20 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Enfin, une solution STOP, composée d'acide sulfurique (2N H₂SO₄) a été déposée et une lecture de la plaque a été réalisée à 450 nm à l'aide du logiciel Gen5™. Les données ont été normalisées par rapport à la quantité en mg de protéines totales cellulaires (mesurée précédemment grâce au kit de quantification de protéines).

6. Analyse par microscopie électronique à transmission

Les cellules Bhas 42 ont été exposées à la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm² pendant 48h dans les mêmes conditions que pour l'analyse transcriptomique. À la fin du traitement, les cellules ont été trypsinées et centrifugées à 800 rpm / min pendant 5 min. Le culot cellulaire a été fixé dans une solution de 2,5% de glutaraldéhyde et de 2,5% de formaldéhyde tamponnée avec 0,2 M de cacodylate pendant 2h. Ensuite, les cellules ont été rincées trois fois avec le tampon de cacodylate. Après une post-fixation dans du tétroxyde d'osmium à 1% et dans du tampon phosphate à 0,1 M pendant 1 heure, le culot a été rincé dans des bains de tampon cacodylate et d'eau ultra-pure. Les cellules fixées ont été déshydratées dans une gamme de solutions d'éthanol pouvant aller jusqu'à 100%.

Les cellules ont été enrobées dans une résine époxy, après des bains intermédiaires de solutions de résine / oxyde de propylène (50% / 50% et 75% / 25%). La polymérisation de la résine a été effectuée

à 60°C pendant 24 h. Des coupes de 90 nm ont été débitées à l'ultra-microtome, puis contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Des coupes ultra-fines ont été observées au microscope électronique à transmission (TEM) HT 7700 (Hitachi, Tokyo, Japon) à 100 kV et à l'aide d'un microscope électronique à balayage à émission de champ (STEM) 2100-F (Jeol, Tokyo, Japon) à 100 kV équipé d'une spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie Spirit (Bruker, Billerica, US). Cette dernière technique nous a permis de cartographier chimiquement l'emplacement de l'élément de silice (Si) dans des images à haute résolution.

7. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism (version 8.0.1; Graphpad, San Diego, CA). Le seuil de significativité statistique a été défini à 5%. Pour les analyses du test de transformation et de survie cellulaire, une transformation logarithmique a été appliquée aux données. Pour les comparaisons multiples, la significativité a été évaluée par une ANOVA à un facteur suivie par un test de comparaisons multiples de Dunnett. Un test t non apparié a été utilisé pour la comparaison deux à deux (traitements vs témoin (H₂O ou DMSO)). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type.

Chapitre IV : RESULTATS

1. Résultats initiaux et hypothèse de travail

Une des missions de l'INRS est de prévenir les risques chimiques auxquels sont exposés les travailleurs. Les tests de transformation *in vitro* sont des outils pertinents afin d'évaluer le potentiel cancérigène des substances chimiques, incluant les nanoparticules ; ils pourraient être aussi une alternative à l'expérimentation animale. Les travaux de cette thèse se sont focalisés sur le test de transformation des cellules murines Bhas 42.



Précédemment, nous avons étudié si quatre SAS différentes, représentatives de la production industrielle, les SAS précipitées NM-200 et NM-201 et les SAS pyrogénées NM-202 et NM-203 pouvaient induire une transformation des cellules Bhas 42 (Fontana et al., 2017) (cf article en annexe). Comme précisé dans l'introduction, le test de transformation sur les cellules Bhas 42 repose sur deux essais, le test d'initiation et le test de promotion (OCDE, 2016; Sakai et al., 2011). Dans un premier temps, la mise en place du test de transformation sur les cellules Bhas 42 a été réalisée en utilisant des agents de référence positifs, le MCA, un agent initiateur de tumeur, et le TPA, un agent promoteur de tumeur ; une microparticule de silice cristalline Min-U-Sil 5[®], classée comme cancérigène, et la microparticule de silice amorphe DE, non classée comme cancérigène.

L'effet transformant du MCA, du TPA, de la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et l'effet non transformant de la silice amorphe DE ont été vérifiés, et pour la première fois, les SAS précipitées NM-200, NM-201, et les SAS pyrogénées NM-202 et NM-203 ont induit une transformation des cellules Bhas 42 mais uniquement en condition de promotion après trois traitements. De façon intéressante, parmi les SAS testées, la SAS pyrogénée NM-203 a le potentiel de transformation le plus élevé (Fontana et al., 2017). De plus, un traitement unique des cellules Bhas 42 en condition de promotion, avec la SAS pyrogénée NM-203 et la microparticule de silice cristalline Min-U-Sil 5[®] peut induire également une transformation cellulaire.

Un résumé des résultats obtenus avec le test de transformation en un et trois traitements est présenté **Tableau 10**. Ces résultats nous ont orienté sur le choix de la SAS pyrogénée NM-203 et des doses à étudier pour la suite des travaux de cette thèse.

Tableau 10 : Résumé des résultats des tests de transformation cellulaire en trois ou un traitement.

T : Transformant ; NT : Non Transformant.

	3 traitements	1 traitement
12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (référence « promoteur positif ») : TPA 	T (0,05 µg/mL)	T (0,05 µg/mL) (résultats non publiés)
Microparticule de silice cristalline : Min-U-Sil 5[®] 	T (15 µg/cm ²)	T (20 µg/cm ²)
Microparticule de silice amorphe : Terre de diatomée (DE)	NT	NT
Nanoparticules de silice amorphes pyrogénées: NM-203	T (dès 2 µg/cm ²)	T (dès 5 µg/cm ²)

Puisqu'un seul traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 induisait une transformation des cellules Bhas 42 en condition de promotion (Fontana et al., 2017), il nous a paru intéressant d'étudier les effets moléculaires consécutifs à un seul traitement dans le contexte du test de transformation. Nous avons alors recherché l'implication des mécanismes épigénétiques dans le potentiel transformant des SAS en étudiant dans un premier temps l'effet de la SAS pyrogénée NM-203 après 48h de traitement en comparaison avec la silice cristalline Min-U-Sil 5® (Kirsch, 2016; Seidel et al., 2017) (cf article en annexe). Il était important de vérifier si la transformation cellulaire par les SAS était associée à des mécanismes non-génotoxiques (Benigni and Bossa, 2011; Snyder and Green, 2001). Nos résultats ont montré que la SAS pyrogénée NM-203 n'affecte ni l'expression des DNMT et des HDAC, ni la méthylation globale de l'ADN et l'acétylation des histones H3 et H4. En revanche, elle augmentait à la fois l'expression de l'oncogène *c-MYC*, connu pour son implication dans la transformation cellulaire (Flores et al., 2004; Parfett et al., 2000) et les marques actives d'histones sur un des promoteurs de *c-MYC* telles que des acétylations ou des tri-méthylations d'histones H3 sur différentes lysines pouvant conduire à la sur-expression de ce gène (Seidel et al., 2017).

2. Présentation

Afin d'obtenir une compréhension plus large des effets moléculaires impliqués dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par les SAS, une approche transcriptomique globale et non supervisée a été réalisée sur la SAS pyrogénée la plus transformante, la SAS pyrogénée NM-203 (à différentes doses), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], le TPA et la silice amorphe DE. Notre choix s'est porté sur un temps de traitement de 48h car, dans cette condition, la SAS pyrogénée NM-203 et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] induisent des changements d'expression de gènes associés à des mécanismes épigénétiques (Seidel et al., 2017). Nous avons ainsi considéré qu'après 48h de traitement, d'autres modifications d'expression de gènes liés à la transformation des cellules Bhas 42 pourraient être mises en évidence.

Nous avons tout d'abord étudié la capacité des cellules Bhas 42 à internaliser les SAS en prenant pour exemple la SAS pyrogénée NM-203. L'internalisation des SAS, un paramètre de cytotoxicité important, n'avait pas encore été vérifiée dans les précédentes études. Par ailleurs, afin de valider les conditions expérimentales choisies (traitement unique et extraction après 48h de traitement), nous avons étudié l'expression des gènes *c-MYC* et *DNMT1*, deux gènes précédemment étudiés (Kirsch, 2016; Seidel et al., 2017). Par la suite, nous avons concentré nos analyses sur la SAS pyrogénée NM-203. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus pour la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], le TPA et la silice amorphe DE. L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence 21 gènes communs dont l'expression est modulée de manière similaire quel que soit le traitement testé. Parmi eux, 12 gènes ont été sélectionnés comme marqueurs précoces des propriétés transformantes des SAS (cf article en annexe).

3. Absorption cellulaire de la SAS pyrogénée NM-203

Une culture de cellules Bhas 42 a été traitée pendant 48h avec la SAS pyrogénée NM-203 à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ puis analysée par TEM (**Figure 19A et B**) et STEM (**Figure 19C**). Les images par TEM montrent la présence d'agrégats de particules internalisés dans les cellules, contenus dans des vésicules/vacuoles. La cartographie par rayons X établie à l'aide du STEM confirme la présence de nanoparticules de SiO_2 dans les cellules. Cette analyse montre que la SAS pyrogénée NM-203 a la capacité de pénétrer dans les cellules Bhas 42.

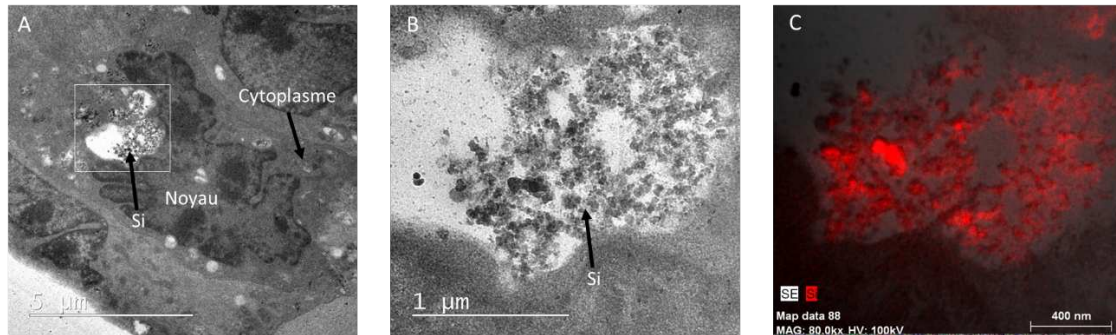


Image en niveau de gris obtenue sur le TEM

Cartographie par rayon X de l'élément de silice Si

Figure 19 : Absorption cellulaire et localisation de la SAS pyrogénée NM-203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dans des cellules Bhas 42 après un traitement de 48h.

(A) Image obtenue avec le TEM qui indique une internalisation de la SAS pyrogénée NM-203 par une cellule Bhas 42. (B) Image TEM à plus fort grossissement (5 fois) de la SAS pyrogénée NM-203 internalisée. (C) La cartographie par rayons X de l'élément Si de l'image B obtenue avec le STEM (mode TEM classique). L'élément Si apparaît en rouge. TEM : Microscope électronique à transmission ; STEM : Microscope électronique à balayage à émission de champ ; Si : Élément de silice.

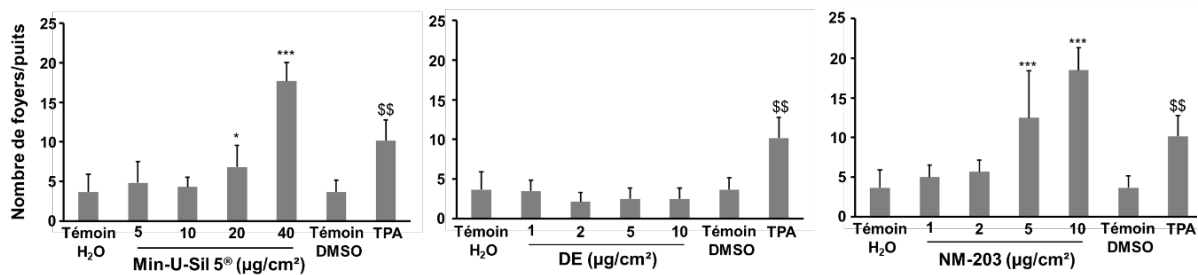
4. Transformation des cellules Bhas 42 induite par un traitement unique avec les SAS précipitées NM-200, NM-201, les SAS pyrogénées NM-202, NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE et TPA

Puisque nous projetons de réaliser une étude transcriptomique dès 48h après l'application du premier traitement (à J6) avec les agents testés (les SAS précipitées NM-200, NM-201, les SAS pyrogénées NM-202, NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE et TPA), il était nécessaire de connaître leur effet transformant dans les conditions d'un traitement unique. Bien que les résultats pour la SAS pyrogénée NM-203 et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] aient déjà été obtenus dans l'étude précédente (Fontana et al., 2017), ces deux substances ont été re-testées en même temps que les autres agents, à titre de comparaison et en tant que références positives.

Un test de transformation sur les cellules Bhas 42 à traitement unique (**Figure 20**) a été réalisé avec les SAS précipitées NM-200 et NM-201, et les SAS pyrogénées NM-202 et, NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE, et le TPA en condition de promotion. Le TPA (0,05 $\mu\text{g} / \text{mL}$) a été utilisé comme référence positive. En parallèle, un test de cytotoxicité a été réalisé à J7 (**Tableau 11**). Dans ces conditions expérimentales, le traitement avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] est associé à

une augmentation significative du nombre de foyers de façon dose dépendante (**Figure 20A**) en induisant une diminution significative de la survie cellulaire dès la dose à 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (**Tableau 11**). Ces résultats concordent avec les résultats de l'étude précédente (Fontana et al., 2017). La silice amorphe DE ne montre aucune activité de transformation, mais une diminution de la survie cellulaire dès 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Un traitement unique avec le TPA augmente significativement le nombre de foyers par rapport à son témoin DMSO, sans induire de diminution significative de la survie cellulaire. Enfin, le traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS précipitée NM-200, et les SAS pyrogénées NM-202 et NM-203 augmente le nombre de foyers de façon dose dépendante. Le nombre de foyer augmente dès la dose à 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les SAS précipitées NM-200 et pyrogénée NM-202 et dès 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour la SAS pyrogénée NM-203 (résultat concordant avec l'étude précédente, (Fontana et al., 2017)). Cet effet s'accompagne d'une diminution significative de la survie cellulaire dès la dose à 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour la SAS précipitée NM-200, dès 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour la SAS pyrogénée NM-202 et dès 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour la SAS pyrogénée NM-203 (**Figure 20A et B**) et (**Tableau 11**). En revanche, la SAS précipitée NM-201 ne diminue pas de manière significative la survie cellulaire et n'induit aucune augmentation significative du nombre de foyers quelle que soit la dose testée.

A



B

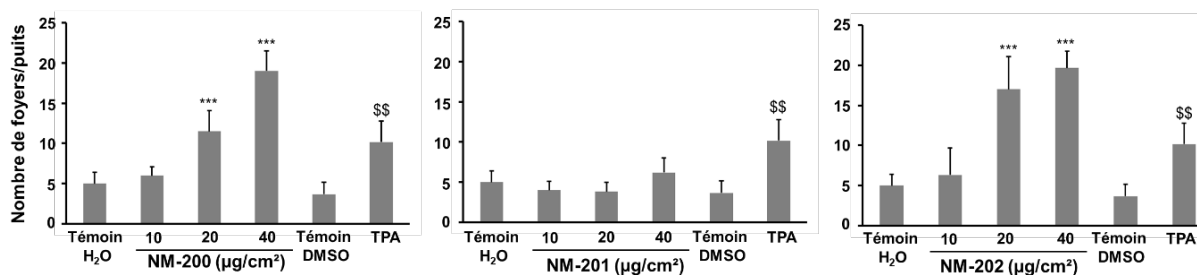


Figure 20 : Test de transformation à traitement unique des cellules Bhas 42 en condition de promotion.

(A) Les cellules Bhas 42, cultivées pendant 21 jours ont été traitées une fois avec des concentrations croissantes de la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] ou la silice amorphe DE. Chaque barre d'histogramme correspond au nombre de foyers identifiés. (B) Des expériences similaires ont été effectuées avec les SAS précipitées NM-200, NM-201 et la SAS pyrogénée NM-202. Les valeurs obtenues après exposition des cellules au TPA (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou au DMSO (utilisé comme véhicule du TPA) ont été ajoutées dans chaque histogramme. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart type ($n = 6$). * indique une p-value $< 0,05$, *** indique une p-value $< 0,005$ (comparaison des résultats obtenus à partir de cellules exposées à des nanoparticules en comparaison avec les cellules traitées avec H₂O) suite à une transformation logarithmique des données et un test ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett; \$\$ indique une p-value $< 0,01$ (comparaison des résultats obtenus à partir de cellules exposées au TPA avec ceux obtenus à partir des cellules traitées au DMSO) suite à un t-test non-pairé appliqué pour la comparaison deux à deux. DE : Terre de diatomée ; TPA : 12-O-Tétradécanoylphorbol-13-acétate ; DMSO : Diméthylsulfoxyde.

Tableau 11 : Résultats du test de survie cellulaire suite au traitement des cellules Bhas 42 avec les SAS précipitées NM-200, NM-201, les SAS pyrogénées NM-202, NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE et TPA en condition de promotion.

DE : Terre de diatomée ; TPA : 12-O-Tétradécanoylphorbol-13-acétate ; DMSO : Diméthylsulfoxyde.

Traitement	Viabilité cellulaire (%)
Témoin (H ₂ O)	100,0 ± 1,4
SAS précipitée NM- 200	
10 µg/cm ²	105,2 ± 1,9
20 µg/cm ²	101,9 ± 14,1
40 µg/cm ²	80,8 ± 4,0*
SAS précipitée NM-201	
10 µg/cm ²	88,8 ± 2,0
20 µg/cm ²	93,0 ± 18,4
40 µg/cm ²	84,0 ± 6,1
SAS pyrogénée NM-202	
10 µg/cm ²	71,6 ± 6,8**
20 µg/cm ²	80,9 ± 5,1
40 µg/cm ²	53,7 ± 8,5***
Témoin (H ₂ O)	100,0 ± 1,2
SAS pyrogénée NM-203	
1 µg/cm ²	103,4 ± 5,8
2 µg/cm ²	96,5 ± 5,4
5 µg/cm ²	85,4 ± 3,6**
10 µg/cm ²	67,1 ± 3,1***
Silice cristalline Min-U-Sil 5 [®]	
5 µg/cm ²	101,9 ± 6,9
10 µg/cm ²	100,3 ± 6,8
20 µg/cm ²	81,9 ± 1,7**
40 µg/cm ²	81,7 ± 4,0**
Silice amorphe DE	
1 µg/cm ²	98,5 ± 1,9
2 µg/cm ²	93,3 ± 3,0*
5 µg/cm ²	82,1 ± 2,5***
10 µg/cm ²	78,2 ± 0,4***
Témoin (DMSO)	100,0 ± 2,0
TPA (0.05 µg/mL)	115,8 ± 16,8

Les résultats exprimés en moyenne ± l'écart type (n= 3) par rapport aux cellules témoins traitées avec 2% de H₂O en tant que véhicule pour les SAS, la silice amorphe DE ou la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] respectivement, et avec le DMSO en tant que véhicule du TPA. Une transformation logarithmique des données a été réalisée avant l'ANOVA suivie d'un test post hoc à comparaisons multiples de Dunnett. * Indique une p-value < 0,05; ** une p-value < 0,005; *** une p-value < 0,001 par rapport aux témoins (H₂O). Un t-test non-pairé a été appliqué pour la comparaison deux à deux (TPA vs témoin (DMSO)).

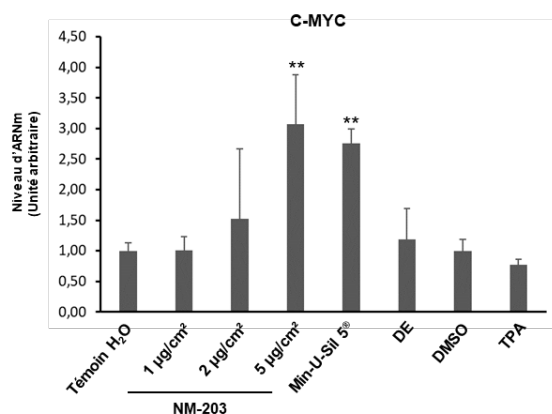
Ces tests de transformation nous ont permis de définir le choix des doses. L'étude transcriptomique a ainsi été réalisée avec la SAS pyrogénée NM-203 à 1 µg/cm² (dose non transformante en 1 et 3 traitements : comme témoin négatif), 2 µg/cm² (dose transformante en 3 traitements mais non

transformante en 1 traitement : comme témoin négatif) et 5 µg/cm² (dose transformante quel que soit le nombre de traitements), la silice amorphe DE à 5 µg/cm² et avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] à 20 µg/cm². La validation du choix des gènes signatures révélés par l'analyse transcriptomique a été réalisée avec les SAS précipitées NM-200 et NM-201 à 20 µg/cm² et les SAS pyrogénées NM-202 et NM-203, respectivement à 20 µg/cm² et 5 µg/cm².

5. Validation des réplicats biologiques par RT-qPCR

Les conditions expérimentales de l'étude transcriptomique ont été vérifiées en étudiant par RT-qPCR l'expression des gènes *c-MYC* et *DNMT1* (**Figure 21A et B**). En effet, dans une étude précédente, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de *c-MYC* suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (15 et 25 µg/cm²) et la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²) durant 48h (Seidel et al., 2017). Au cours de mon stage de Master 2, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de *DNMT1* suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm² durant 48h (Kirsch, 2016) et une augmentation du taux protéique de DNMT1 après traitement avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (Seidel et al., 2017).

A



B

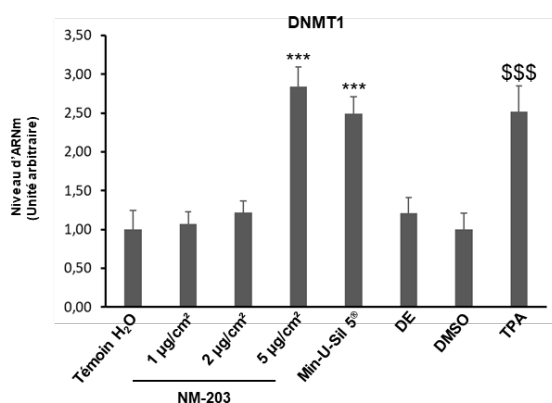


Figure 21 : Niveaux d'expression des gènes *c-MYC* et *DNMT1*.

Les niveaux d'ARNm ont été normalisés par rapport au gène de ménage puis rapportés au témoin: TPA vs DMSO, la SAS pyrogénée NM-203 aux doses 1, 2, et 5 µg / cm², la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE vs H₂O. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'écart type de quatre expériences indépendantes. ** indique une p-value < 0,01 ; *** une p-value < 0,005 par rapport aux cellules témoins suite à une ANOVA à un facteur suivie d'un test de comparaisons multiples de Dunnett. \$\$\$ indique une p-value < 0,005 suite à un t-test réalisé afin de comparer les échantillons traités TPA avec les échantillons témoins DMSO ; TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate; DE: Terre de Diatomées; DMSO : diméthylesulfoxyde ; *c-MYC* : myélocytomatosis ; *DNMT* : ADN méthyltransférases.

Le traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm² augmente bien significativement l'expression du gène *c-MYC* (Seidel et al., 2017). Nous observons également bien une augmentation de l'expression de *c-MYC* lorsque les cellules sont traitées avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®]. En revanche, le TPA n'entraîne pas la sur-expression du gène *c-MYC*. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus au cours du Master 2 (résultats non publiés). Enfin, comme attendu, la silice amorphe DE, ainsi que la SAS pyrogénée NM-203 à la dose 1 et 2 µg/cm² ne modifient pas l'expression de ce gène en comparaison avec leur témoin H₂O. D'autre part, le traitement des cellules Bhas 42 durant 48h avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA augmente significativement l'expression de *DNMT1*. La SAS pyrogénée NM-203 aux doses 1 et 2 µg/cm² et la silice amorphe DE n'augmentent pas l'expression de ce gène. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par (Seidel et al., 2017) et durant le stage de Master 2. De plus, aucune modification de l'expression de ces gènes n'a été observée suite au traitement des cellules Bhas 42 avec les conditions non-transformantes (la SAS pyrogénée NM-203 aux doses 1 et 2 µg/cm² et la silice amorphe DE). Cette étude par RT-qPCR a permis de valider les réplicats biologiques et nous avons donc considéré que l'ensemble des échantillons pouvaient être utilisés pour une analyse transcriptomique.

6. Analyse transcriptomique

6.1 Principal component analysis (PCA)

Afin d'étudier la répartition des différents réplicats dans l'espace, une analyse PCA a été réalisée à l'aide du logiciel Genespring sur les données de puces à ADN issues de quatre expériences indépendantes. Sur la **Figure 22**, chaque intensité de fluorescence pour chaque échantillon a des coordonnées x, y, z dans l'espace. Cette approche a permis dans un premier temps de constater que les réplicats testés ont des coordonnées similaires. Dans un second temps nous observons un regroupement des réplicats témoins dans une zone du graphe et un regroupement des réplicats traités dans une autre zone. Les réplicats du traitement TPA se situaient à la limite entre les réplicats témoins et les réplicats issus du traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ou avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] à 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Enfin, les réplicats traités avec la SAS pyrogénée NM-203 à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ou avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] à 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ont également des coordonnées proches dans l'espace. Ces résultats sont de bon augure pour la suite des analyses car ils permettent de constater que les conditions transformantes induisent des modifications similaires de l'expression des gènes dans les cellules Bhas 42 en comparaison avec les conditions non transformantes.

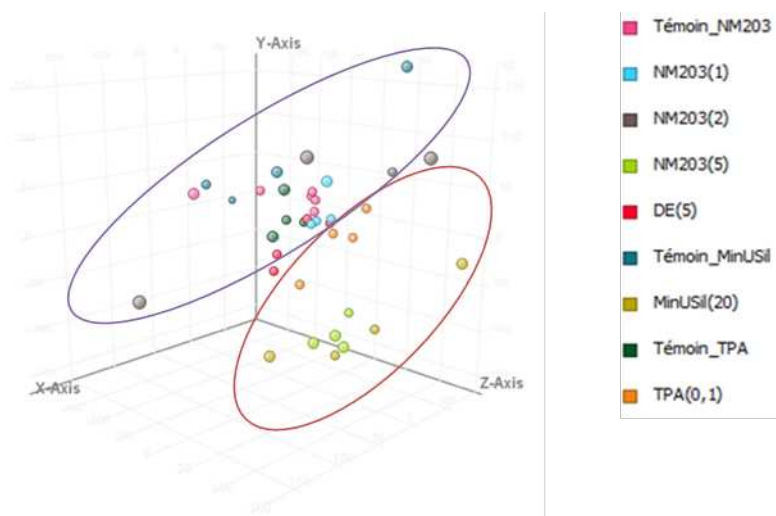


Figure 22 : PCA obtenu grâce au logiciel Genespring et présentant la répartition des différents réplicats dans l'espace.

Chaque réplicat possède des coordonnées x, y, z dans l'espace correspondant à l'intensité de fluorescence de chacun. Chaque réplicat est présent en quatre exemplaires et une couleur correspond à une condition. Le code couleur est présenté en légende. Les échantillons entourés en rouge correspondent aux conditions transformantes et ceux entourés en violet correspondent aux conditions non transformantes et témoins.

6.2 Regroupement hiérarchique non supervisé des données

Après normalisation et filtration des données transcriptomiques brutes à l'aide du logiciel Genespring, 19 569 sondes ont été répertoriées.

Le groupement hiérarchique non supervisé (**Figure 23**) réalisé sur ces 19 569 sondes montre deux branches principales divisant les échantillons en fonction de leur potentiel transformant. Un premier groupe avec des conditions témoins (H₂O et DMSO) et non transformantes (la silice amorphe DE à 5 µg/cm² et la SAS pyrogénée NM-203 à 1 µg/cm²) et un second groupe avec les conditions transformantes (la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm², la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et TPA). Le groupe silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (20 µg/cm²) est plus proche du groupe SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²) que du groupe TPA (0,05 µg/mL). Le groupe SAS pyrogénée NM-203 à 2 µg/cm² (transformant dans l'essai Bhas 42 en trois traitements mais non transformant en un traitement (Fontana et al., 2017)), induit une modulation de l'expression génique, même avec un traitement unique.

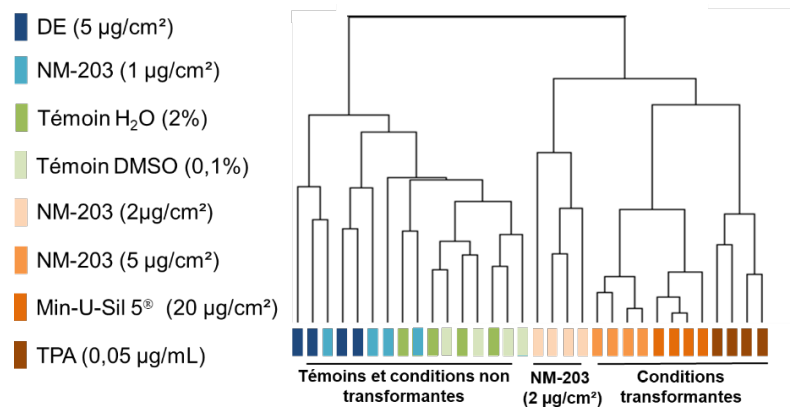


Figure 23 : Regroupement hiérarchique des cellules Bhas 42 après exposition.

Les cellules exposées à la SAS pyrogénée NM-203 (1, 2 ou 5 µg/cm²), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (20 µg/cm²), la silice amorphe DE (5 µg/cm²) et TPA (0,05 µg/mL). Regroupement hiérarchique non supervisé obtenu après filtration des données de la micropuce, avec le logiciel Gene Cluster 3.0 sur les 19 569 sondes. L'arbre est visualisé avec Treeview. Une corrélation non centrée a été utilisée pour mesurer la similarité et un couplage complet a été utilisé pour la méthode de regroupement. TPA: 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate; DE: Terre de Diatomée; DMSO: diméthylsulfoxyde.

6.3 Effet moléculaire induit par la SAS pyrogénée NM-203

6.3.1 Comparaison des signatures moléculaires obtenues avec des données de la littérature (GSEA)

Un des objectifs de ce travail de thèse était de décrypter les signatures moléculaires induites par une SAS d'intérêt, la SAS pyrogénée NM-203.

Nous identifions une signature moléculaire de la SAS pyrogénée NM-203 qui a été comparée avec des données de la littérature, *via* une analyse d'enrichissement. GSEA compare la signature obtenue pour la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm², dose transformante) (13 982 sondes) avec les signatures issues de la littérature et calcule un score d'enrichissement. Plus le score d'enrichissement est élevé, plus les signatures se ressemblent. Cette analyse GSEA permet d'identifier des enrichissements significatifs ($p < 0,01$) de signatures liées à des processus de cancérogenèse. En effet, parmi les 50 premières signatures sur-exprimées, 76% des signatures SAS pyrogénée NM-203 sont liées à la prolifération cellulaire, 12% des signatures sont liées à la progression tumorale, 2% des signatures sont liées à de l'inflammation et 2% des signatures sont liées à la réparation de l'ADN (**Figure 24**).

De façon intéressante, cette première analyse indique que le traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 influe majoritairement sur l'expression des gènes jouant un rôle dans la prolifération cellulaire et la progression tumorale, deux processus importants dans la transformation cellulaire. La liste des 20 premières signatures est présentée **Tableau 12**. Et la liste des 50 premières signatures est présentée **Tableau annexe 1 et Tableau A.1 supplémentaire**.

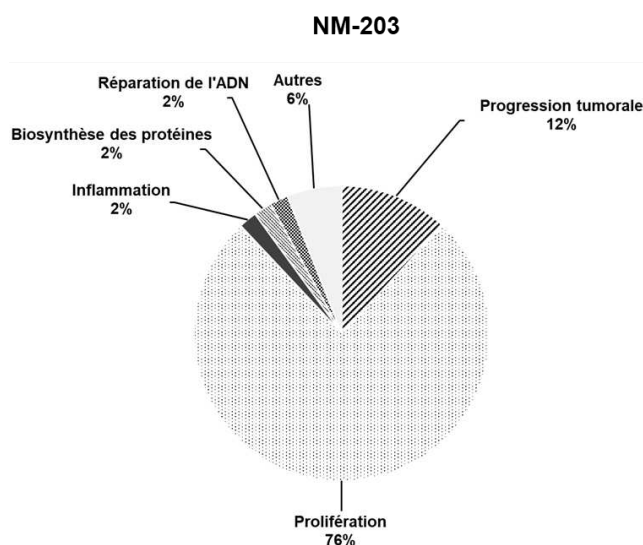


Figure 24 : Analyse d'enrichissement de gènes suite à un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg / cm²).

Les 50 premières signatures sur-exprimées significativement enrichies ont été associées à des grandes fonctions. Le diagramme circulaire représente le pourcentage de chacune de ces fonctions.

Tableau 12 : Liste des 20 premières signatures de la SAS pyrogénée NM-203, score d'enrichissement et grandes fonctions associées.

Signatures	Score d'enrichissement	Grandes fonctions
DUTERTRE_ESTRADIOL_RESPONSE_6HR_UP	0,5	Prolifération
BASSO_B_LYMPHOCYTE_NETWORK	0,5	Prolifération
BHATI_G2M_ARREST_BY_2METHOXYESTRADIOL_UP	0,5	Prolifération
WHITFIELD_CELL_CYCLE_S	0,5	Prolifération
KRIGE_AMINO_ACID_DEPRIVATION	0,6	Prolifération
FISCHER_G1_S_CELL_CYCLE	0,6	Prolifération
HORIUCHI_WTAP_TARGETS_DN	0,6	Prolifération
BASAKI_YBX1_TARGETS_UP	0,6	Prolifération
MARKEY_RB1_ACUTE_LOF_UP	0,6	Prolifération
ZHANG_TLX_TARGETS_36HR_DN	0,7	Prolifération
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	0,7	Prolifération
FUJII_YBX1_TARGETS_DN	0,7	Prolifération
REACTOME_CELL_CYCLE	0,7	Prolifération
DUTERTRE_ESTRADIOL_RESPONSE_24HR_UP	0,7	Prolifération
FURUKAWA_DUSP6_TARGETS_PCI35_DN	0,7	Prolifération
REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA	0,8	Prolifération
CHANG_CORE_SERUM_RESPONSE_UP	0,6	Progression tumorale
CHEMNITZ_RESPONSE_TO_PROSTAGLANDIN_E2_UP	0,6	Inflammation
GOBERT_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION_UP	0,7	Différenciation cellulaire
REACTOME_HOST_INTERACTIONS_OF_HIV_FACTORS	0,7	Autre

6.3.2 Gènes dérégulés par la SAS pyrogénée NM-203

Afin de déterminer les gènes modulés par le traitement avec la SAS pyrogénée NM-203, un t-test non pairé (correction de Benjamini) avec une p-value < 0,05, FC > 2 a été utilisé. Alors que la SAS pyrogénée NM-203 à 2 µg/cm² n'est pas transformante en un seul traitement, elle induit des changements significatifs de l'expression de 512 gènes avec une p-value < 0,05 et FC > 2 (**Tableau A.2 supplémentaire**). En comparaison avec son témoin, 1620 gènes sont modulés suite à un traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm² (**Tableau 13**) et (**Tableau A.3 supplémentaire**). Cependant, afin de mettre en avant les effets les plus pertinents et de réaliser une analyse des voies de signalisation modifiées, nous souhaitons obtenir une liste plus restreinte de gènes comprenant entre 100 et 300 gènes. C'est pourquoi un t-test non pairé plus stringent a été réalisé avec une p-value < 0,005, FC > 4. Avec ces paramètres, 257 gènes sont modulés suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (**Tableau annexe 3 et Tableau A.5 supplémentaire**) en comparaison avec leur témoin. Enfin, quels que soient la p-value et le FC, la SAS pyrogénée NM-203 à 1 µg/cm² n'induit aucune modification de l'expression des gènes.

Tableau 13 : Nombre de gènes significativement dérégulés dans les cellules traitées par rapport aux cellules témoins.

	Nombre de gènes sur et sous-exprimés					
	p < 0,05 FC > 2			p < 0,005 FC > 4		
	Nombre de gènes	Sur-exprimés	Sous-exprimés	Nombre de gènes	Sur-exprimés	Sous-exprimés
NM-203 vs H₂O (1 µg/cm²)	0			0		
NM-203 vs H₂O (2 µg/cm²)	512	318	194	2	0	2
NM-203 vs H₂O (5 µg/cm²)	1620	912	708	257	160	97

Nombre de gènes significativement dérégulés entre deux conditions (p < 0,05, FC > 2 ou p < 0,005, FC > 4) suite à la réalisation d'un t-test non pairé. FC: Fold Change.

Les listes de gènes (p-value < 0,005 ; FC > 4) ont été importées dans le logiciel IPA afin d'analyser les modifications des voies de signalisation.

6.3.3 La SAS pyrogénée NM-203 induit une modification de voies de signalisation liées au cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN (Analyse IPA)

L'analyse IPA sur la liste des 257 gènes obtenue suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm² ; p-value < 0,005 et FC > 4 révèle une modification de voies de signalisation liées à la régulation du cycle cellulaire, à la croissance, à la prolifération cellulaire, au cancer et à la réparation de l'ADN. Les plus significatives sont présentées dans le **Tableau 14**. Ces données sont cohérentes avec celles obtenues grâce à l'analyse GSEA.

Tableau 14 : Principales voies de signalisation modifiées et principaux réseaux de gènes impactés suite à une exposition des cellules Bhas 42 durant 48h à la SAS pyrogénée NM-203

La SAS pyrogénée NM-203		
Les principales voies de signalisation modulées	-Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	
	-Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	
	-Role of BRCA1 in DNA Damage Response	
	-dTMP De Novo Biosynthesis	
	-Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	
		Score
Les principaux réseaux de gènes modulés	-Cycle, morphologie, assemblage et organization cellulaire	46
	- Cycle cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation, désorganisation du tissu conjonctif	44
	- Cycle, assemblage et organisation cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation	37
	- Signalisation et interaction cellule-cellule, fonction et maintient cellulaires, développement et fonction du système hématologique	34
	- Sténose cardiaque, maladie cardiovasculaire, lésion organique et anomalies	34

Parmi les 15 premières voies de signalisation modifiées, une analyse bibliographique permet d'étudier comment ces voies de signalisation et les gènes dont l'expression est modifiée peuvent intervenir dans le cycle cellulaire (**Figure 25**).

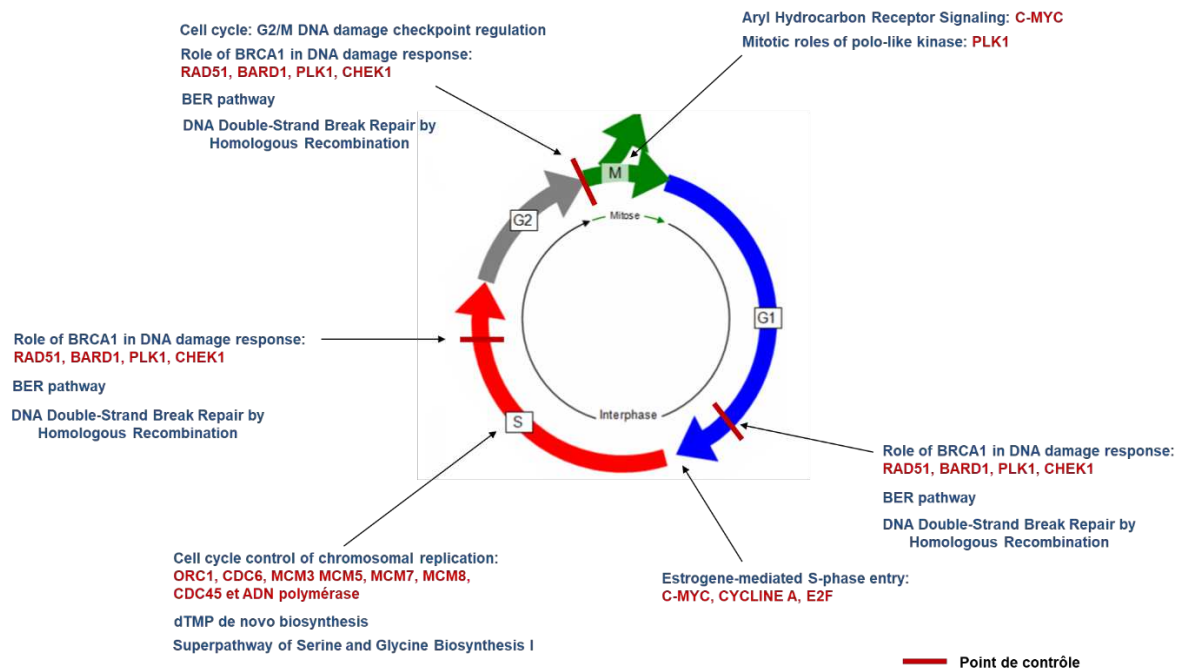


Figure 25 : Schématisation du cycle cellulaire et des différentes voies de signalisation activées suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203.

Seuls quelques exemples de gènes dont l'expression est modifiée dans chacune des voies de signalisation sont présentés en rouge.

De façon intéressante, la SAS pyrogénée NM-203 induit une modification de l'expression de gènes tout au long du cycle cellulaire (**Figure 25**). L'activité transformante de la SAS pyrogénée NM-203 peut s'expliquer par sa capacité à modifier, dans un premier temps, les voies de signalisation impliquées dans l'entrée des cellules en phase S telle que la voie « Estrogène-mediated S-phase entry » en modulant par exemple l'expression des gènes *c-MYC*, Cycline A (*CCNA*) et E2F Transcription Factor (*E2F*) (**Tableau 15**). Dans un second temps, la SAS pyrogénée NM-203 modifie des voies de signalisation impliquées dans la réplication de l'ADN telles que les voies « Cell cycle control of chromosomal replication », « dTMP de novo biosynthesis » et « Superpathway of serine and glycine biosynthesis » en modulant l'expression des gènes Origin recognition complex (*ORC1*), Cell division cycle 6 (*CDC6*), la famille des mini-chromosome maintenance family (*MCM*), Cell division cycle 45 (*CDC45*) et le gène *POLE ϵ* codant l'ADN polymérase ϵ par exemple (**Tableau 15**). En effet, la voie « dTMP de novo biosynthesis » joue un rôle essentiel dans la synthèse de l'ADN et la division cellulaire (Chon et al., 2017) et la voie « Superpathway of serine and glycine biosynthesis » est une voie impliquée dans la synthèse de la sérine et de la glycine, des précurseurs essentiels de la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des lipides essentiels à la croissance des cellules cancéreuses (Amelio et al., 2014). Enfin, la SAS pyrogénée NM-203 peut activer des voies impliquées dans la division cellulaire telles que les voies « Mitotic role of polo-like kinase » et « Aryl hydrocarbon receptor signaling » en modulant entre autre l'expression de la polo-like kinase 1 (*PLK1*) et *c-MYC* (**Tableau 15**). Elle active aussi des voies impliquées dans la réparation de l'ADN telles que les voies « Role of BRCA1 in DNA damage response » et « DNA double-strand break repair by homologous recombination », deux voies impliquées dans la réparation par recombinaison homologue et la voie « BER pathway » impliquée dans

la réparation par excision de bases. Les caractéristiques des gènes évoqués dans ce paragraphe sont présentées **Tableau 15**.

Enfin, bien que les effets cytotoxiques des SAS soient parfois associés au stress oxydant, l'analyse IPA ne montre pas de voie liée à l'inflammation ou au stress oxydant modulée par la SAS pyrogénée NM- 203.

Tableau 15 : Caractéristiques des gènes impliqués dans les différentes voies de signalisation

Symbole de gène	Nom complet	Fonction du gène	Localisation protéique	Niveau d'expression	Références
CCNA	Cycline A	Contrôle la transition entre les G1 / S et G2 / M	Noyau	Sur-expression	(Loukil et al., 2015)
E2F	E2F Transcription Factor	Joue un rôle dans la régulation de la progression du cycle cellulaire ou dans la réplication de l'ADN	Noyau	Sur-expression	(Liu et al., 2018b)
PLK1	Polo-like kinase 1	Régule l'entrée en mitose, l'assemblage du fuseau, l'entrée en anaphase et la cytokinèse en phase mitotique.	Centrosomes	Sur-expression	(Lee et al., 2014; Reagan-Shaw and Ahmad, 2005)
ORC1	Origin recognition complex	Initiation de la réplication de l'ADN, se lie spécifiquement aux origines de réplication	Noyau	Sur-expression	(DePamphilis, 2003)
CDC6	Cell division cycle 6	Initiation de la réplication, se lie à ORC	Noyau	Sur-expression	(DePamphilis, 2003)
Famille des MCM	Mini-chromosome Maintenance family	Initiation de la réplication, se lie à ORC	Noyau	Sur-expression	(DePamphilis, 2003)
CDC45	Cell division cycle 45	Initiation de la réplication, se lie à l'ADN polymérase et initie la synthèse du brin d'ADN	Noyau	Sur-expression	(DePamphilis, 2003)
c-MYC	Myelocytoma	Proto-oncogène impliqué dans la prolifération cellulaire	Noyau	Sur-expression	(Pelengaris et al., 2002)

6.3.4. Réseaux de gènes impactés par la SAS pyrogénée NM-203

L'analyse IPA identifie des réseaux significatifs de gènes différentiellement exprimés dans la lignée cellulaire Bhas 42 après traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm². Ces réseaux ont été notés en fonction du nombre de gènes participant à un réseau particulier (score). Les principaux réseaux de gènes sont présentés dans le **Tableau 14**. Parmi les cinq principaux réseaux de gènes impactés par la SAS pyrogénée NM-203, le premier réseau est présenté **Figure 26**. Ce réseau est particulièrement lié à la prolifération cellulaire. De façon intéressante, *AKT* est au cœur de ce réseau de gènes. La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR étant une voie impliquée dans la prolifération cellulaire (Brotelle and Bay, 2016) (**Tableau 16**), cela laisse supposer que cette voie intervient dans le processus de prolifération induit par la SAS pyrogénée NM-203. De plus, ce réseau de gènes permet de constater que le gène codant la protéine MEK, une des protéines de la voie des MAPK impliquée dans diverses fonctions biologiques telles que la prolifération cellulaire (Yao and Seger, 2009), interagit de façon indirecte avec *AKT*. Nous supposons que cette voie pourrait être impliquée dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203. Enfin, *AKT* interagit indirectement avec *RAD51*, un gène impliqué dans la réparation de l'ADN (Gachechiladze et al., 2017), qui lui est sur-exprimé suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, laissant supposer que cette dernière active des systèmes de réparation de l'ADN.

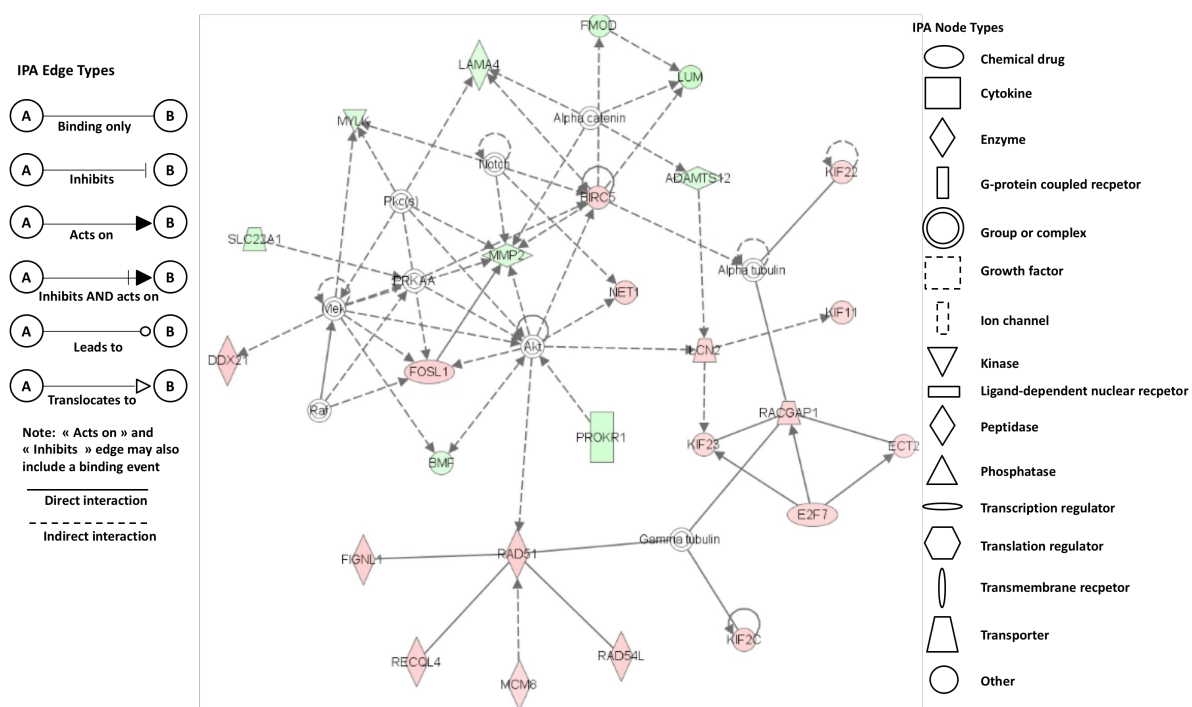


Figure 26 : Réseaux de gènes identifiés via l'analyse IPA suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203.
En vert sont représentés les gènes sous-exprimés et en rouge les gènes sur-exprimés.

Tableau 16 : Caractéristiques des gènes *AKT*, *MEK* et *RAD51* impliqués dans le réseau de gènes figure 26.

Symbole des gènes	Nom complet	Fonction du gène	Localisation protéique	Niveau d'expression	Références
<i>AKT</i>	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	Prolifération, survie cellulaire	Cytoplasme	Non modifié	(Brotelle and Bay, 2016)
<i>MEK</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase	Protéine kinase jouant un rôle dans la cascade de signalisation des MAPK impliquée dans divers processus cellulaires telle que la prolifération	Cytoplasme	Non modifié	(Yao and Seger, 2009)
<i>RAD51</i>	DNA repair protein RAD51	Réparation de l'ADN	Noyau	Sur-expression	(Gachechiladze et al., 2017)

6.3.5 La SAS pyrogénée NM-203 induit une modification de voies de signalisation liées à l'inflammation et à l'adhésion cellulaire (Analyse DAVID et Panther)

Afin de compléter l'analyse IPA, deux autres outils informatiques ont été utilisés pour le traitement de nos données de transcriptomique: les logiciels DAVID et Panther.

La liste des 257 gènes (p -value < 0,005 et FC > 4) a été entrée dans Panther puis analysée en retenant uniquement les voies de signalisation dont le nombre de gènes modulés est au moins égale ou supérieur à 3. On peut constater qu'un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) entraîne une modification de voies de signalisation impliquées dans le développement de cancers tels que les voies « CCKR signaling map » et « WNT signaling pathway » (Rozengurt and Walsh, 2001; Tripathi et al., 2015; Zhan et al., 2017), dans l'adhésion cellulaire telle que la voie « Integrine signaling pathway » (Giancotti and Ruoslahti, 1999) et dans l'inflammation telle que la voie « Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway » (**Figure 27**). De plus, en entrant uniquement la liste de gènes sur-exprimés dans Panther, les résultats montrent que la SAS pyrogénée NM-203 induit principalement une modification de la voie impliquée dans l'inflammation : « Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway » avec par exemple une sur-expression des gènes C-X-C motif chemokine 10 (*CXCL10*) et Prostaglandine G/H Synthase 2 (*PTGS2*). En entrant uniquement la liste des gènes sous-exprimés, on constate que la SAS pyrogénée NM-203 induit principalement une modification de la voie impliquée dans l'adhésion cellulaire : « Integrin signaling pathway » avec une sous-expression par exemple des gènes Collagène alpha-3(V) chain (*COL5A3*), Collagène alpha-3(XXVII) chain (*COL27A1*) et Intégrine beta-like protein 1 (*ITGBL1*) (**Tableau 17**).

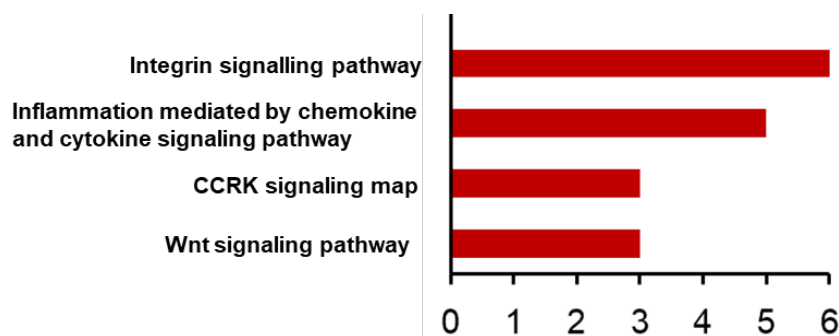


Figure 27 : Voies de signalisation modifiées suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²) (déterminées à l'aide de la base de données Panther version 14.1). Liste des 257 gènes sur et sous-exprimés.

Tableau 17 : Caractéristiques des gènes impliqués dans différentes voies de signalisation mises en évidence grâce au logiciel Panther.

Symbole des gènes	Nom complet	Fonction du gène	Localisation protéique	Niveau d'expression	Références
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10	Inflammation	Extracellulaire	Sur-expression	(Koper et al., 2018)
PTGS2	Prostaglandine G/H Synthase 2	Inflammation	Réticulum endoplasmique	Sur-expression	(Kunzmann et al., 2013)
COL5A3	Collagen alpha-3(V) chain	Adhésion cellulaire	Matrice extracellulaire	Sous-expression	(Theocharis et al., 2016)
COL27A1	Collagen alpha-3(XXVII) chain	Adhésion cellulaire	Matrice extracellulaire	Sous-expression	(Theocharis et al., 2016)
ITGBL1	Integrin beta-like protein 1	Adhésion cellulaire	Membranaire	Sous-expression	(Berg et al., 1999)
CCKR	Cholecystokinin receptor	Récepteur à la cholecystokinine, un neuropeptide et une hormone intestinale qui régule la sécrétion d'enzymes pancréatiques et la motilité gastro-intestinale	Membranaire	Non modifié	(Smith et al., 2018)
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site Family	Protéine impliquée dans la voie de signalisation WNT, une voie impliquée dans l'oncogenèse et dans plusieurs processus de développement	Extracellulaire	Sous-expression	Zhan et al., 2017

Ces listes de gènes ont également été entrées dans l'outil DAVID qui a permis de mettre en évidence une modification de voies de signalisation impliquées dans la prolifération ou l'adhésion cellulaire ce qui confirme les résultats obtenus avec IPA et Panther (résultats non présentés).

6.3.6 Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203

Par la suite, l'effet dose de la SAS pyrogénée NM-203 a été étudié. Bien que les doses 1 et 2 µg/cm² ne soient pas transformantes en un seul traitement, la dose à 2 µg/cm² est transformante en trois traitements (Fontana et al., 2017). Comme précisé précédemment, quels que soient la p-value et le FC, la SAS pyrogénée NM-203 à 1 µg/cm² n'induit aucune modification de l'expression de gènes, ce qui est cohérent avec les résultats des tests de transformation en 1 et 3 traitements. Par ailleurs, à p-value <

0,05 et FC >2, la SAS pyrogénée NM-203 à la dose 2 µg/cm² induit une modification de l'expression de 512 gènes et à p-value < 0,005 et FC > 4, une sous-expression de 2 gènes. Bien qu'elle ne soit pas transformante en un seul traitement, la SAS pyrogénée NM-203 à la dose à 2 µg/cm² induit des modifications de l'expression de gènes après 48h de traitement.

Afin d'étudier l'effet dose de la SAS pyrogénée NM-203, un test ANOVA a été réalisé en sélectionnant une p-value inférieure à 0,005. Les gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition avec un FC supérieur à 4 ont été sélectionnés. Dans ces conditions (p-value < 0,005 et FC > 4), une liste de 290 gènes a été obtenue, permettant de mettre en avant les effets de la SAS pyrogénée NM-203 les plus marqués (**Tableau annexe 2 et Tableau A.6 supplémentaire**). Un regroupement hiérarchique des 290 gènes a été réalisé grâce au logiciel Gene Cluster 3 (**Figure 28**). La visualisation de l'arbre grâce à Treeview met en évidence trois groupes de gènes régulés de façon dose dépendante. Chaque groupe de gènes a été importé dans l'outil informatique Funcassociate afin de définir la fonction de ces groupes de gènes. La partie supérieure du dendrogramme montre un groupe composé de 8 gènes régulés négativement uniquement par le traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 à 2 µg/cm². Ces gènes sont impliqués dans la régulation négative de la voie de signalisation du récepteur du facteur de croissance des fibroblastes. Cependant le nombre restreint de gènes appartenant à ce groupe interpelle quant à la pertinence de cette fonction. C'est pourquoi ils ont été mis de côté dans la suite de l'analyse. Par ailleurs, la deuxième partie du dendrogramme met en évidence un groupe de gènes (124 gènes) sous exprimés après le traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 aux doses 2 µg/cm² et 5 µg/cm², ces gènes sont impliqués dans le remodelage de la matrice et l'adhésion cellulaire. La partie inférieure montre une augmentation de l'expression d'un groupe de gènes (158 gènes) impliqués dans la prolifération cellulaire, correspondant au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 aux doses à 2 µg/cm² et à 5 µg/cm².

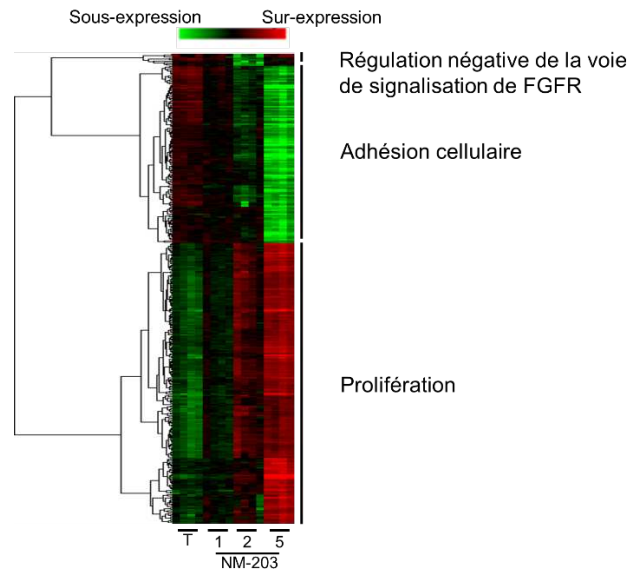


Figure 28 : Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203 (1-5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Le regroupement hiérarchique supervisé est réalisé avec le logiciel Gene Cluster 3.0 et visualisé grâce à Treeview sur les 290 gènes obtenus après filtration et test ANOVA (valeur $p < 0,005$ et $FC > 4$), par comparaison entre la SAS pyrogénée NM-203 (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), la SAS pyrogénée NM-203 (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), la SAS pyrogénée NM-203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et le témoin H_2O , suivi d'un test post-hoc de Tukey. Une corrélation non centrée est utilisée pour mesurer la similarité et un couplage complet pour la méthode de regroupement. Le vert indique une sous-expression, et le rouge une sur-expression des gènes. Les fonctions biologiques liées aux groupes de gènes principaux ont été évaluées à l'aide du programme FuncAssociate 2.0. T: Témoin H_2O .

En fixant une p-value inférieure 0,05 et un FC supérieur à 2 les listes de gènes sur-exprimés issues du traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 aux doses 2 et 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ont été constituées et importées dans Panther. On constate que la SAS pyrogénée NM-203 à 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ induit des modifications de quelques voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire mais avec un nombre moins important de gènes qu'à la dose 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Les listes de gènes sous-exprimés ont également été importées dans Panther pour constater que la SAS pyrogénée NM-203 à 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ induit une modification de voies de signalisation impliquées dans l'adhésion cellulaire.

Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle, à cette dose, la SAS pyrogénée NM-203 induit des modifications de l'expression de gènes après le premier traitement mais qui ne sont pas suffisantes pour induire la transformation des cellules Bhas 42.

6.4 Comparaison des signatures moléculaires induites par la SAS pyrogénée NM-203 avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA

Un second objectif de ma thèse était de comparer les signatures moléculaires induites par la SAS pyrogénée NM-203 avec celles induites par des agents chimiques de référence tels que la silice amorphe DE (« témoin particulaire négatif »), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (« témoin particulaire positif ») et le TPA (« témoin positif ») un agent promoteur de tumeur.

6.4.1 Comparaison des signatures moléculaires obtenues avec des données de la littérature (GSEA)

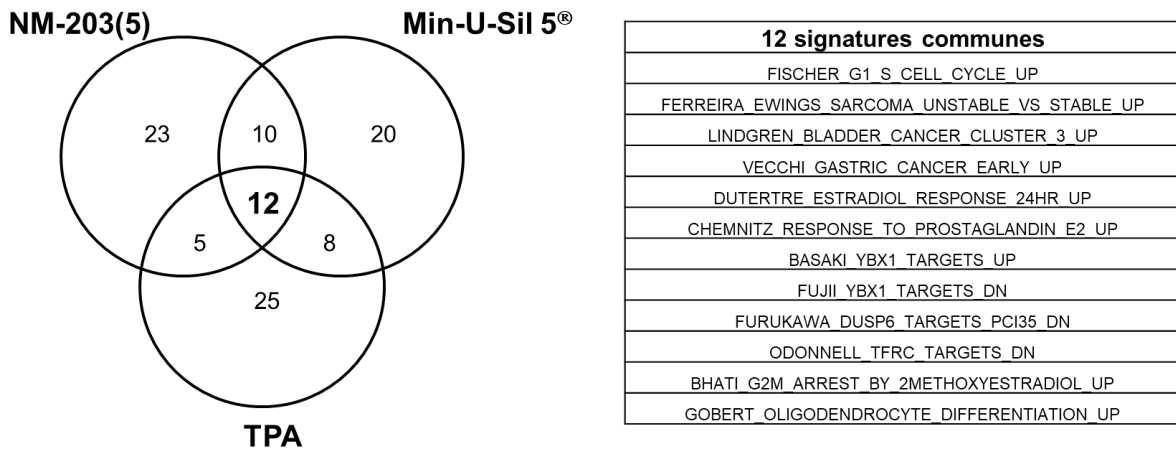
Une analyses GSEA a été réalisée, afin d'identifier les signatures communes aux trois conditions transformantes. Les listes non filtrées obtenues suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (13 982 sondes), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (15 292 sondes) et le TPA (14 019 sondes) ont été importées dans l'outil GSEA afin de les comparer avec les données de la littérature. Cette analyse a permis d'identifier les enrichissements de signatures significatifs ($p < 0,01$) liés à des processus de cancérogenèse. La liste des 50 premières signatures obtenues pour chaque condition est disponible en données supplémentaires (**Tableau annexe 1 et Tableau A.1 supplémentaire**).

Le diagramme de Venn portant sur les 50 premières signatures les plus significatives montre que 24%, soit 12 signatures sont communes entre les traitements SAS pyrogénée NM-203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et TPA (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figure 29A**). Parmi ces 12 signatures communes, un enrichissement des signatures liées au cycle cellulaire et à la progression tumorale telles que les signatures: "bladder cancer cluster 3 up" (Lindgren et al., 2006), "G1 S cell cycle" (Fisher et al., 1979) et "gastric cancer early up" (Vecchi et al., 2007) est observé pour les trois traitements (**Figure 29B**).

Dans la signature "bladder cancer cluster 3 up", la réalisation d'un regroupement hiérarchique a permis de regrouper 75 tumeurs de la vessie en trois groupes de gènes. Le groupe III représente les tumeurs aux stades les plus avancés et ayant montré un enrichissement significatif de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. L'analyse GSEA met en évidence des signatures similaires pour la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], le TPA et ce groupe III. Dans ce groupe, les auteurs ont mis en évidence une sur-expression des gènes *CDC6*, des gènes de la famille des *MCM* et des gènes codant des cyclines (Lindgren et al., 2006). Le groupe I montre également un enrichissement significatif de gènes du cycle cellulaire mais avec une modulation de l'expression des gènes moins importante que dans le groupe III. Cela peut être mis en relation avec le fait que le groupe I présente les tumeurs aux stades les plus précoces de la maladie. Il semble que nos signatures soient apparentées à une forme tardive de la maladie. Le groupe II quant à lui révèle plutôt un enrichissement significatif de gènes liés à l'adhésion cellulaire. Cette signature était commune aux signatures sous-exprimées obtenues suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (résultats non présentés) suggérant ainsi que la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203 et silice cristalline Min-U-Sil 5[®] aurait en partie pour origine une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire.

Dans le cas du cancer de l'estomac, (Vecchi et al., 2007) ont plutôt observé un enrichissement des signatures impliquées dans des stades précoces de la maladie. Ces résultats suggèrent que la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA induisent une transformation des cellules Bhas 42 par une modification du cycle cellulaire également retrouvée dans des cancers décrits dans la littérature.

A



B

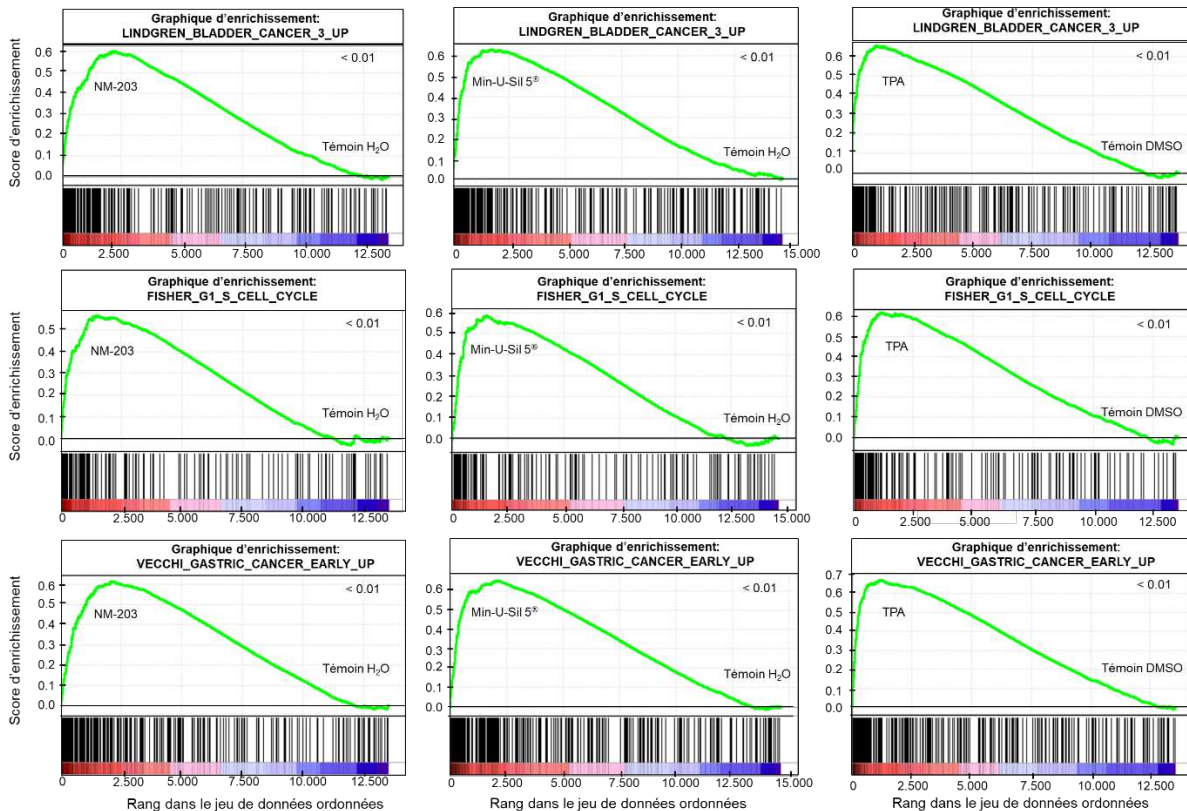


Figure 29 : Analyse d'enrichissement de gènes suite à un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg / cm²), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (20 µg / cm²) et le TPA (0,05 µg / mL).

(A) Comparaison des 50 premières signatures sur-exprimées significativement enrichies et identification des signatures communes à la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²), à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (20 µg/cm²) et au TPA (0,05 µg/mL). Le tableau représente la liste des douze signatures communes. (B) L'analyse GSEA révèle un enrichissement des signatures communes aux trois conditions, liées au cycle cellulaire et à la progression tumorale, telles que: la signature « Lindgren_bladder_cancer_cluster_3_up », la signature « Fisher_G1_S_cell_cycle » et la signature « Vecchi_gastric_cancer_early_up ».

TPA : 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate.

6.4.2 Gènes dérégulés par la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE et le TPA

Afin de déterminer les gènes significativement modulés par la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE et le TPA, des t-tests non pairés (correction de Benjamini) ont été réalisés. En comparaison avec leur témoin respectif, 1080 et 392 gènes sont modulés par le traitement avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (**Tableau A.7 supplémentaire**) et le TPA (**Tableau A.8 supplémentaire**) respectivement en fixant une p-value < 0,05 et un FC > 2 (**Tableau 18**). Avec une p-value < 0,005, FC > 4, 99 (**Tableau annexe 4 et Tableau A.9 supplémentaire**) et 89 gènes sont modulés (**Tableau annexe 5 et Tableau A.10 supplémentaire**). Quels que soient la p-value et le FC, la silice amorphe DE (5 µg/cm²) n'induit aucune modification de l'expression des gènes.

Tableau 18 : Nombre de gènes significativement dérégulés dans les cellules traitées par rapport aux cellules témoins.

	Nombre de gènes sur et sous-expimés					
	Nombre de gènes	p < 0,05 FC > 2		p < 0,005 FC > 4		
		Sur-expimés	Sous-expimés	Nombre de gènes	Sur-expimés	Sous-expimés
DE vs H ₂ O (5 µg/cm ²)	0	0	0	0		
Min-U-Sil 5 [®] vs H ₂ O (20 µg/cm ²)	1080	577	503	99	43	56
TPA vs DMSO (0,05 µg/mL)	392	302	90	89	76	13

Nombre de gènes significativement dérégulés entre deux conditions (p < 0,05, FC > 2 ou p < 0,005, FC > 4).
TPA: 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate; DE: Terre de Diatomée; DMSO : Diméthyle sulfoxyde; FC: Fold Change.

Les listes de gènes (p-value < 0,005 ; FC > 4) ont été importées dans le logiciel IPA afin d'analyser les modifications des voies de signalisation communes.

6.4.3 La SAS pyrogénée NM-203 induit une modification de voies de signalisation communes à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et au TPA

À l'aide d'IPA, nous avons déterminé les voies canoniques et les réseaux biologiques communs les plus significatifs impliqués dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA. Pour cela, nous avons entré les listes de gènes, obtenues avec une p-value < 0,005 et FC > 4, pour la SAS pyrogénée NM-203 (257 gènes), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (99 gènes) et le TPA (89 gènes) dans le logiciel IPA. Cette analyse révèle une modification de voies de signalisation liées à la régulation du cycle cellulaire, la croissance, la prolifération cellulaire,

au cancer et à la réparation de l'ADN. Les voies ayant présenté le plus grand nombre de gènes modulés sont présentées dans le **Tableau 19**.

Tableau 19 : Principales voies de signalisation modifiées et principaux réseaux de gènes impactés suite à une exposition des cellules Bhas 42 durant 48h à la SAS pyrogénée NM-203, à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et au TPA mis en évidence grâce à IPA.

En rouge sont représentées les voies de signalisation communes à la SAS pyrogénée NM-203 et à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®]. En orange sont représentées les voies de signalisation communes à la SAS pyrogénée NM-203 et au TPA. En bleu sont représentés les réseaux de gènes communs à la SAS pyrogénée NM-203 et à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et en violet sont représentés les réseaux de gènes communs à la SAS pyrogénée NM-203 et au TPA. Les nombres entre parenthèses représentent les scores de chaque réseau de gènes.

	la SAS pyrogénée NM-203	Silice cristalline Min-U-Sil 5[®]	TPA
Les principales voies de signalisation modulées	<ul style="list-style-type: none"> -Cell Cycle Control of Chromosomal Replication -Mitotic Roles of Polo-Like Kinase -Role of BRCA1 in DNA Damage Response -dTMP De Novo Biosynthesis -Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease 	<ul style="list-style-type: none"> -Inhibition of Matrix Metalloproteases -Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation -LXR/RXR Activation -Cell Cycle Control of Chromosomal Replication -Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling 	<ul style="list-style-type: none"> -Mitotic Roles of Polo-Like Kinase -Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation -Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway -DNA damage-induced 14-3-3 Signaling -Cyclins and Cell Cycle Regulation
Les principaux réseaux de gènes modulés	<ul style="list-style-type: none"> -Cycle, morphologie, assemblage et organisation cellulaire (46) -Cycle cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation, désorganisation du tissu conjonctif (44) -Cycle, assemblage et organisation cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation (37) -Signalisation et interaction cellule-cellule, fonction et maintenance cellulaires, développement et fonction du système hématologique (34) -Sténose cardiaque, maladie cardiovasculaire, lésion organique et anomalies (34) 	<ul style="list-style-type: none"> -Maladie cardio-vasculaire, maladie neurologique, cancer (45) -Cycle cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation, désorganisation du tissu conjonctif (43) -Production d'énergie, métabolisme lipidique, biochimie des petites molécules (23) -Morphologie cellulaire, métabolisme lipidique, biochimie des petites molécules (23) -Réplication, recombinaison et réparation d'ADN, morphologie cellulaire, hématopoïèse (11) 	<ul style="list-style-type: none"> -Cycle, assemblage et organisation cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation (67) -Croissance et prolifération cellulaire, cancer, lésions et anomalies organiques (26) -Cancer, lésions et anomalies organiques, maladie du système reproducteur (24) -Cancer, lésions et anomalies organiques, troubles du système endocrinien (21) -Développement cellulaire, croissance et prolifération cellulaire, développement et fonction du système hématologique (11)

Parmi les 15 premières voies de signalisation modifiées, celles liées à la prolifération cellulaire, ou à la réparation de l'ADN ont été mises en évidence : notamment les voies « Cell Cycle Control of Chromosomal Replication », « Cell Cycle : G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation », « Estrogen-mediated S-phase Entry » et « Role of BRCA1 in DNA Damage Response » communes aux trois conditions et les voies « Mitotic Role of Polo-Like Kinase » communes à la SAS pyrogénée NM-203 et à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et « DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination » commune à la SAS pyrogénée NM-203 et au TPA (**Figure 30**).

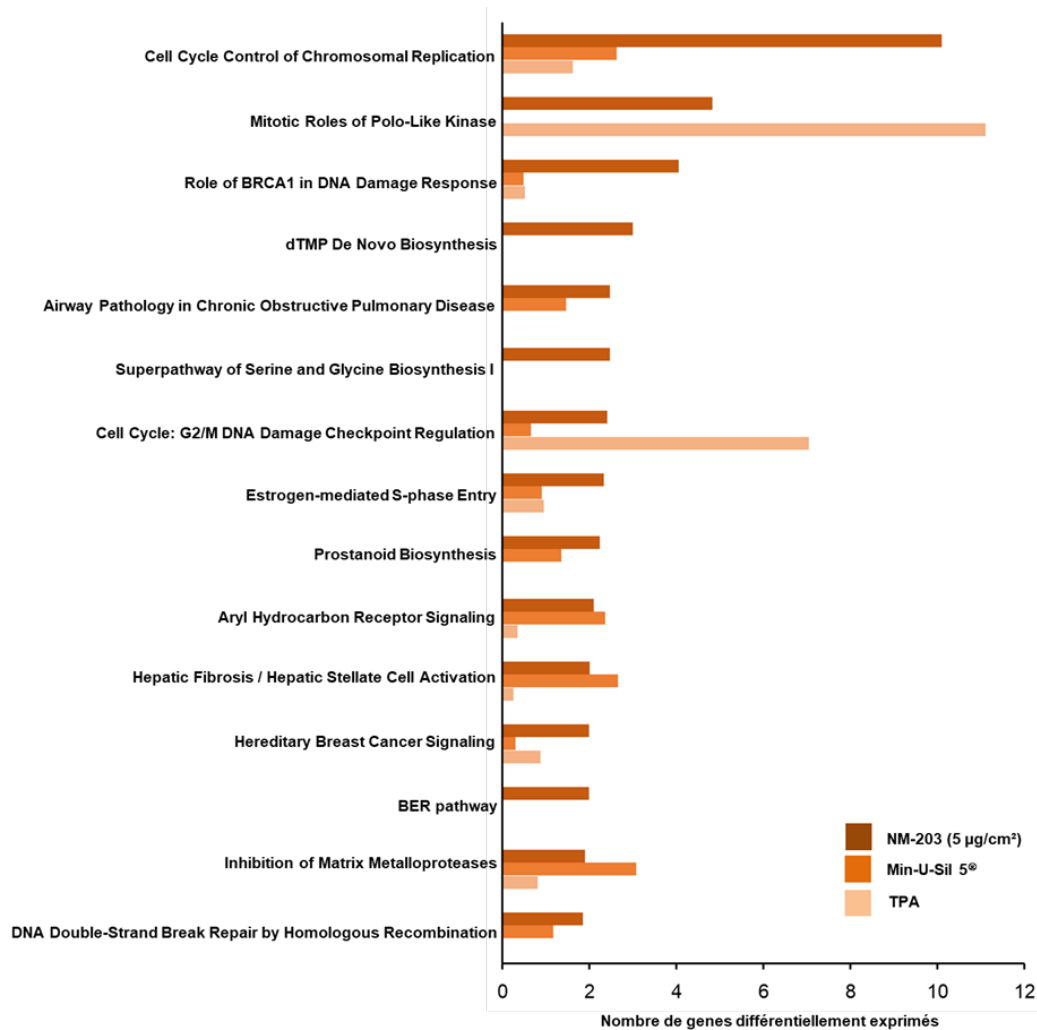


Figure 30 : Comparaison des voies de signalisation modifiées suite à un traitement de 48h des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA mises en évidence grâce au logiciel IPA.

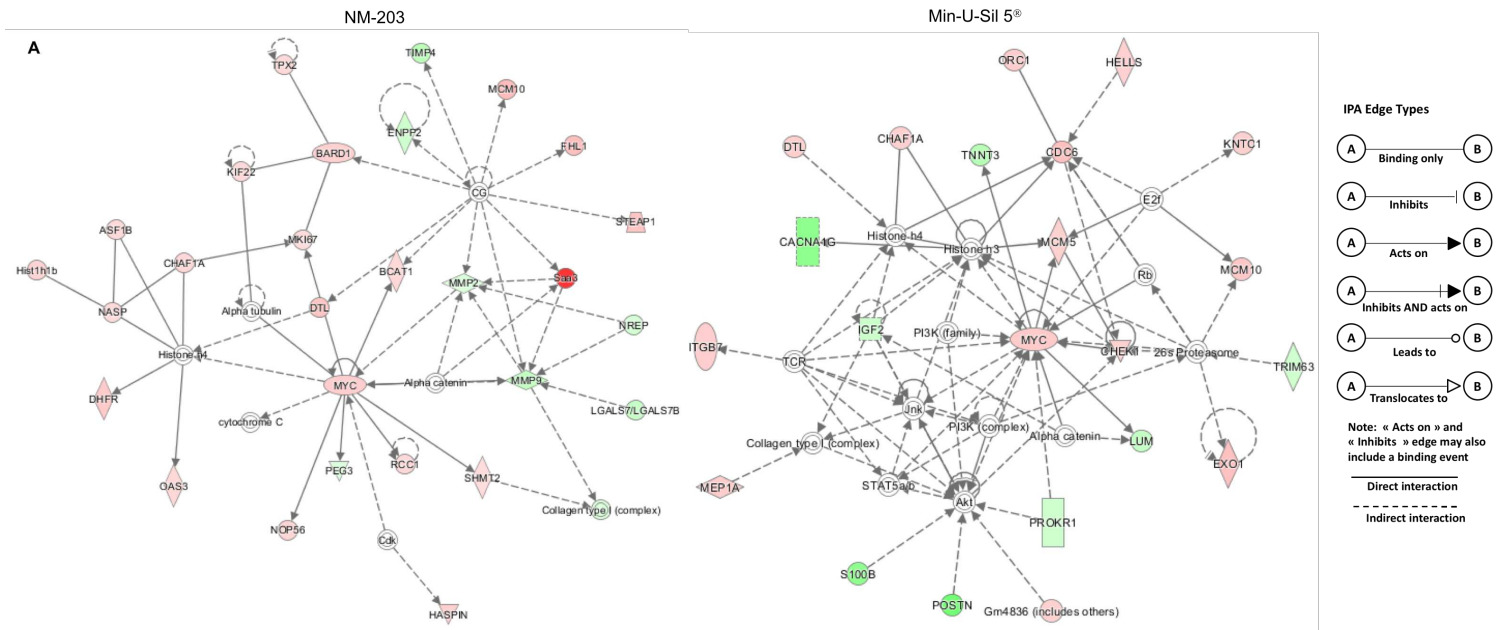
Cette analyse montre également que les voies « dTMP De novo Biosynthesis », « Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I » et « BER pathway » sont spécifiquement modulées par la SAS pyrogénée NM-203. Cependant, le nombre de gènes modulés par la SAS pyrogénée NM-203 est plus important que le nombre de gènes modulés par la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA, ce qui peut induire un biais dans l'analyse. En entrant une liste avec un nombre identique de gènes pour la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA, les résultats montrent que ces voies sont communes aux trois conditions. Il semblerait finalement que la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA induisent une transformation des cellules Bhas 42 par des mécanismes communs.

6.4.4 Réseaux de gènes impactés

Des réseaux de gènes communs à la SAS pyrogénée NM-203 et à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et des réseaux de gènes communs à la SAS pyrogénée NM-203 et au TPA pouvant être impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération, la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, la recombinaison, l'adhésion cellulaire et la progression tumorale ont été identifiés (**Tableau 19**). Dans le réseau de gènes communs à la SAS pyrogénée NM-203 et à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] : Cycle cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation, désorganisation du tissu conjonctif, *c-MYC* est au cœur de ce réseau de gènes (**Figure 31A**) (**Tableau 20**). Une augmentation de l'expression de *c-MYC* peut être l'un des mécanismes impliqués dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203 et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®]. En revanche, ce mécanisme ne semble pas être celui du TPA puisque, quelque soient le fold change ou la p-value, l'expression de *c-MYC* n'augmente pas après traitement avec le TPA.

Par ailleurs, ERK1/2 est au cœur des réseaux « Cycle cellulaire, assemblage et organisation cellulaires, réplication, recombinaison et réparation de l'ADN », commun à la SAS pyrogénée NM-203 et au TPA. ERK code une protéine jouant un rôle important dans la cascade MAPK / ERK intervenant dans diverses fonctions biologiques telle que la prolifération cellulaire. Bien que l'expression de ce gène ne soit pas modifiée suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 et le TPA, il interagit avec des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tel que le gène *CCNA* sur-exprimé dans nos conditions (**Figure 31B**) et (**Tableau 20**). ERK1/2 est également au cœur du réseau : maladie cardiovasculaire, maladie neurologique et cancer ; un des réseaux de gènes induit par la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (résultats non présentés). ERK1/2 peut alors avoir un rôle dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par des agents chimiques particuliers.

Cycle cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation, désorganisation du tissu conjonctif.



Cycle cellulaire, assemblage et organisation cellulaires, réplication, recombinaison et réparation de l'ADN

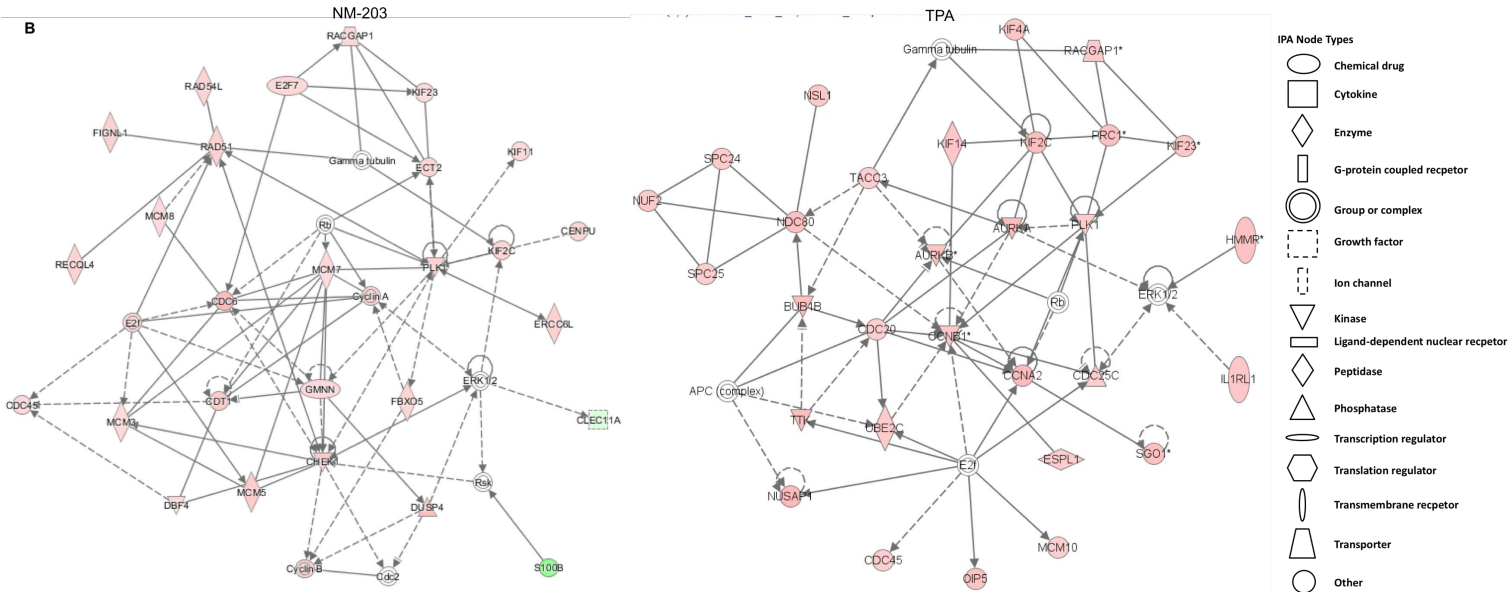


Figure 31 : Réseaux de gènes communs identifiés *via* l'analyse IPA suite aux traitements des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA.

(A) Réseau de gènes communs entre la SAS pyrogénée NM-203 et la silice cristalline Min-U-Sil 5® : Cycle cellulaire, réplication de l'ADN, recombinaison et réparation, désorganisation du tissu conjonctif commun. (B) Réseaux de gènes communs entre la SAS pyrogénée NM-203 et le TPA : Cycle cellulaire, assemblage et organisation cellulaires, réplication, recombinaison et réparation de l'ADN. En vert sont représentés les gènes sous-exprimés et en rouge les gènes sur-exprimés.

Tableau 20 : Caractéristiques des gènes identifiés comme étant au coeur des réseaux de gènes communs à la SAS pyrogénée NM-203 et à silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et à la SAS pyrogénée NM-203 et au TPA.

Symbole de gène	Nom complet	Fonction du gène	Localisation protéique	Niveau d'expression	Références
ERK	Extracellular signal-regulated kinases	Rôle important dans la cascade MAPK / ERK intervenant dans diverses fonctions biologiques telles que la croissance avec un rôle dans l'initiation et la régulation des fonctions de la mitose et de la post-mitose, mais également un rôle dans la survie et la différenciation cellulaires	Cytoplasme/Noyau	Pas de modification	(Yao and Seger, 2009)
CDC25C	Cell division cycle 25C	Rôle dans la régulation de la division cellulaire	Noyau	Sur-expression	(Perdiguero and Nebreda, 2004)
AURKA	Aurora kinase A	Impliqué dans l'entrée en phase M	Centrosomes	Sur-expression	(Asteriti et al., 2015)

6.5 Comparaison des signatures moléculaires et sélection des gènes communs

6.5.1 Signature commune de la transformation cellulaire

Dans le but de proposer un test de criblage rapide afin d'étudier le potentiel transformant des SAS ou d'autres agents chimiques, nous avons recherché une signature de gènes communs à la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et au TPA et étudié si cette signature peut être retrouvée avec d'autres SAS transformantes dans l'essai Bhas 42 (les SAS précipitées NM-200 et pyrogénées NM-202). Pour ce faire, la liste de gènes exprimés différemment avec une p-value < 0,005 et un FC > 4 a été utilisée afin de comparer les signatures moléculaires obtenues après un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²), la silice cristalline Min- U- Sil 5[®] (20 µg/cm²) et le TPA (0,05 µg/mL). Les résultats montrent que l'expression de 309 gènes est modifiée par les différents traitements (p < 0,005 et FC > 4). La grande majorité des gènes identifiés (83%) subissent un changement d'expression suite à un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203. Parmi eux, 142 gènes (46%) sont spécifiquement modulés par la SAS pyrogénée NM-203. De plus, 23 (8%) et 29 gènes (10%) sont modulés spécifiquement par la silice cristalline Min- U- Sil 5[®] et TPA, respectivement. Au total, 21 gènes communs modulés par la SAS pyrogénée NM- 203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA sont mis en évidence (p < 0,005, FC > 4) (**Figure 32A**). Les principales fonctions des gènes sont résumées dans les **Tableaux 21 et 22**.

Parmi eux, 12 gènes, *CACNA1G*, *CMBL*, *ENPP2*, *GDPD2*, *HMGCS2*, *LGALS7*, *LUM*, *POSTN*, *SEMA3G*, *SPARCL1*, *TIMP4*, et *A230065H16Rik* sont sous-exprimés, tandis que 9 gènes, *RAD51AP1*, *NLRP2*, *SGOL1*, *IL1RL1*, *PRL2C3*, *PRL2C5*, *PRL2C1*, *AUNIP* et *MCM10* sont sur-exprimés (**Figure 32B**). Les gènes sur-exprimés sont liés à la prolifération cellulaire et les gènes sous-exprimés sont liés à l'adhésion cellulaire. Ces résultats mettent en évidence un set de gènes communs facilement exploitables pouvant être utilisés dans un test de criblage.

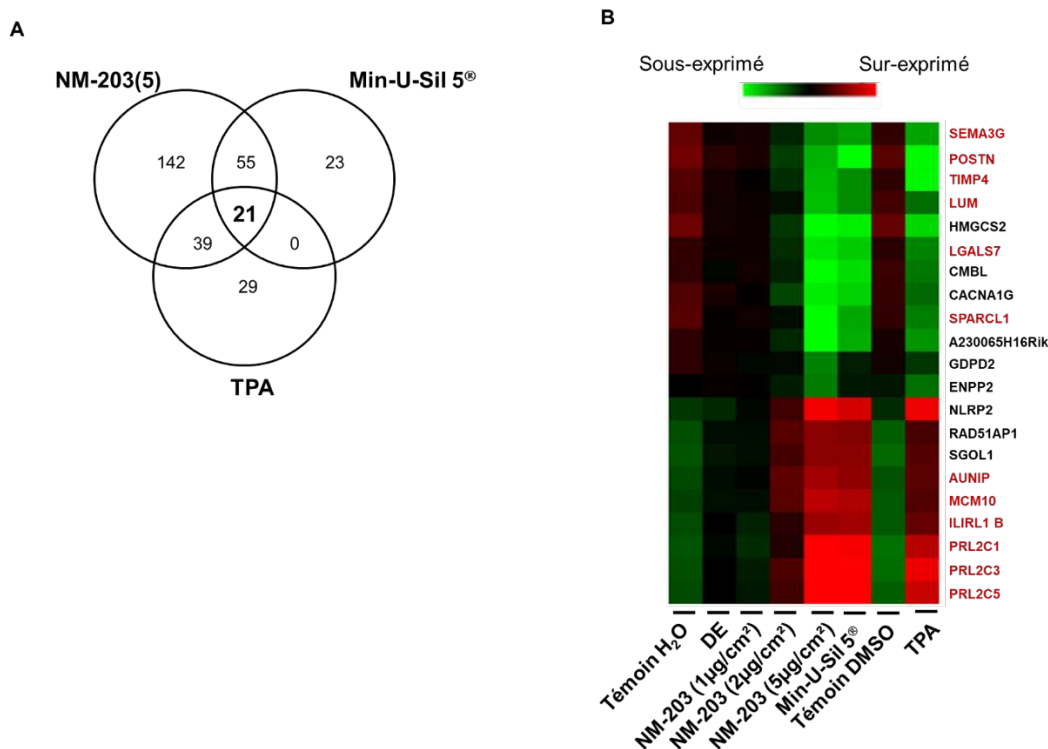


Figure 32 : Comparaison des signatures moléculaires et sélection de gènes communs.

(A) Diagramme de Venn afin de comparer les signatures moléculaires obtenues suite à un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg / cm²), la silice cristalline Min-U-Sil 5® (20 µg / cm²) et le TPA (0,05 µg / mL) (p <0,005 et FC > 4). (B) Heatmap (« carte thermique ») des 21 gènes communs régulés par les trois composés transformants obtenue avec le logiciel Gene Cluster 3.0 et visualisés avec Treeview (p <0,005; FC > 4). Une moyenne de l'expression de chaque gène a été réalisée pour chaque condition. Le vert indique une sous-expression des gènes ; et le rouge une sur-expression. Les gènes en rouge correspondent aux gènes d'intérêt sélectionnés. TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate; DMSO : diméthylsulfoxyde; DE : terre de diatomée.

Afin de restreindre cette liste de gènes, 12 gènes parmi les 21 gènes communs ont été sélectionnés en fonction de leurs taux d'expression (sur-exprimés : *IL1RL1*, *PRL2C1*, *PRL2C3*, *PRL2C5*, *AUNIP* et *MCM10* ; ou sous-exprimés : *SEMA3G*, *POSTN*, *SPARCL1*, *LUM*, *LGALS7* et *TIMP4*), leur fonction, leur niveau d'expression (**Tableaux 21 et 22**).

6.5.2 Fonction principale des 12 gènes communs sélectionnés

De par leur fonction liée à la prolifération et l'adhésion cellulaire, la modulation de l'expression des gènes sélectionnés peut être à l'origine de la transformation cellulaire. En effet, un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA entraîne une sur-expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tels que les gènes *AUNIP*, *MCM10*, *PRL2C1*, *PRL2C3*, *PRL2C5* et *IL1RL1* et une sous-expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire tels que *POSTN*, *LGALS7*, *LUM*, *SPARCL1*, *TIMP4* et *SEMA3G*. Les différentes fonctions liées à la prolifération et à l'adhésion cellulaire des gènes sélectionnés sont présentées dans le **Tableau 21**. *AUNIP* interagit avec AURKA (une protéine kinase) au niveau des centrosomes et du fuseau mitotique durant le cycle cellulaire. AURKA participe à l'alignement des chromosomes, à la maturation des centrosomes, à l'assemblage du fuseau mitotique (Lieu et al., 2010). *IL1RL1* est un

récepteur de l'interleukine-33 (Il-33), un membre de la famille des cytokines Il-1, qui a un rôle dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Il semblerait également que ce couple ligand/récepteur puisse être impliqué dans la prolifération cellulaire (Maywald et al., 2015).

La protéine codée par le gène **MCM10** est une protéine essentielle impliquée dans les phases d'initiation et d'élongation de la réplication chromosomique. Le complexe protéique formé par les protéines MCM est un composant clé du complexe de pré-réplication et peut être impliqué dans la formation de fourches de réplication et dans le recrutement d'autres protéines liées à la réplication de l'ADN (Chattopadhyay and Bielinsky, 2007). Par exemple, il a été montré que MCM10 était nécessaire à l'association de l'ADN polymérase avec la chromatine (Warren et al., 2009).

Les gènes de la famille des **PRL2C** sont un groupe de gènes hautement homologues ayant été identifiés à l'origine comme gènes inductibles par un facteur de croissance dans les fibroblastes de souris immortalisés (Linzer et al., 1985; Nilsen-Hamilton et al., 1980), mais *in vivo* ces gènes ont été principalement détectés dans les cellules de trophoblastes géants du placenta de souris suggérant un rôle de ces gènes dans le développement embryonnaire (Lee et al., 1988). En effet, il semblerait que ces gènes stimulent l'angiogenèse dans le placenta de souris en développement en jouant un rôle important dans la migration des cellules endothéliales vasculaires utérines vers les cellules géantes (Jackson et al., 1994; Ma et al., 1997). Fait intéressant, la famille des PRL2C participe à une boucle de rétroaction positive favorisant l'angiogenèse (Yang et al., 2013). Il a également été mis en évidence que ces gènes étaient capables de stimuler la croissance des cellules dans les tissus maternels et fœtaux pendant le développement de l'embryon. De plus, l'expression de ces gènes a été fortement induite dans les kératinocytes situés proches des plaies lors de la cicatrisation cutanée et dans les follicules pileux suggérant un rôle de ces gènes pendant la cicatrisation et durant le cycle du follicule pileux en tant que facteur de croissance et / ou facteur d'angiogenèse. Enfin, un rôle leur a été attribué dans la formation de microvillosités et la prolifération cellulaire des cellules de neuroblastome (Fassett et al., 2000; Wang et al., 2006).

En ce qui concerne les gènes sous-exprimés dans cette étude, les galectines forment une famille de lectines animales caractérisées par leur domaine de liaison aux sucres et leur affinité pour des glycoconjugués contenant des β -galactosides (Advedissian et al., 2015). **LGALS7** code une protéine extracellulaire exprimée dans tous les types de cellules épithéliales stratifiées présentes dans la peau, la langue, l'œsophage et les corpuscules de Hassal dans le thymus. Cette protéine est impliquée dans des interactions cellules-cellules et/ou cellules-matrice extracellulaire (Kuwabara et al., 2002). **LUM** est un gène codant un protéoglycane matriciel extracellulaire appelé lumican. Lumican est impliqué dans l'assemblage, l'organisation et le renforcement des fibrilles de collagène (Jepsen et al., 2002; Neame et al., 2000). La périostine a été identifiée comme une protéine de 811 acides aminés sécrétée par les ostéoblastes et favorisant l'adhésion des ostéoblastes, ce qui a conduit à l'hypothèse selon laquelle la périostine servirait à recruter et attacher les ostéoblastes au périoste (Horiuchi et al., 1999; Takeshita et al., 1993). **POSTN** codant pour une protéine de la matrice extracellulaire sécrétée peut interagir directement avec des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), telles que la fibronectine et la ténascine-C, et servir de ligand pour certaines intégrines afin de favoriser l'adhésion cellulaire et le remodelage de la matrice (Gillan et al., 2002; Snider et al., 2009). **SEMA3G** est un gène codant pour

une protéine de la famille des sémaphorines. Les sémaphorines interviennent dans le guidage axonal, la migration cellulaire, le développement, et l'immunité (Karayan-Tapon et al., 2008). En effet, il a été démontré que SEMA3G était capable d'induire la migration des cellules endothéliales normales (Liu et al., 2015). **SPARCL1** code pour une glycoprotéine extracellulaire capable d'interagir avec la matrice extracellulaire et notamment avec le collagène de type I afin d'assurer l'adhésion cellulaire (Cao et al., 2013; Hambrock et al., 2003). Enfin, le gène **TIMP4** appartient à la famille des gènes **TIMP**. Les protéines codées par cette famille de gènes sont des inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles, un groupe de peptidases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Brew et al., 2000).

Tableau 21 : Caractéristiques des 12 gènes communs sélectionnés

Symbole de gène	Nom complet	Fonction du gène	Localisation protéique	Niveau d'expression	Références
AUNIP	Aurora Kinase A And Ninein Interacting Protein	Interaction avec AURKA durant le cycle cellulaire: une sérine / thréonine kinase mitotique qui contribue à la régulation de la progression du cycle cellulaire.	Noyau	Sur-expression	(Lieu et al., 2010)
IL1RL1	Interleukin-1 receptor-like 1	Récepteur membranaire de IL-33 impliqué dans la réponse immunitaire, capable d'activer les voies des MAPK et NF-KB.	Membrane plasmique	Sur-expression	(Lingel et al., 2009)
MCM10	Mini-chromosome Maintenance 10	Réplication de l'ADN	Noyau	Sur-expression	(Chattopadhyay and Bielinsky, 2007)
PRL2C1	Prolactin family 2, subfamily c, member 1	Hormone impliquée dans la régulation positive de la prolifération cellulaire, angiogenèse, migration cellulaire	Espace extracellulaire	Sur-expression	(Fassett et al., 2000; Wang et al., 2006)
PRL2C3	Prolactin family 2, subfamily c, member 3	Hormone impliquée dans la régulation positive de la prolifération cellulaire, angiogenèse, migration cellulaire	Espace extracellulaire	Sur-expression	(Fassett et al., 2000; Wang et al., 2006)
PRL2C5	Prolactin family 2, subfamily c, member 5	Hormone impliquée dans la régulation positive de la prolifération cellulaire, angiogenèse, migration cellulaire	Espace extracellulaire	Sur-expression	(Fassett et al., 2000; Wang et al., 2006)
POSTN	Periostin	Adhésion cellulaire/Remodelage de la matrice	Espace extracellulaire	Sous-expression	(Gillan et al., 2002)
LUM	Lumican	Protéoglycane matricielle impliqué ans l'organisation de la matrice extracellulaire	Espace extracellulaire	Sous-expression	(Neame et al., 2000)
LGALS7	Galectin-7	Interaction cellules-cellules et/ou cellules-matrice	Espace extracellulaire	Sous-expression	(Kuwabara et al., 2002)
SEMA3G	Semaphorin-3G	Migration cellulaire	Cytoplasme	Sous-expression	(Liu et al., 2015)
SPARCL1	Secreted protein acidic and rich in cysteine like protein 1	Adhésion cellulaire	Espace extracellulaire	Sous-expression	(Sullivan et al., 2006)
TIMP4	Metalloproteinase inhibitor 4	Inibiteur des métalloprotéinases, migration cellulaire, remodelage de la matrice	Espace extracellulaire	Sous-expression	(Huang et al., 2002)

Les 9 autres gènes *CACNA1G*, *CMBL*, *ENPP2*, *GDPD2*, *HMGCS2*, *RAD51AP1*, *NLRP2*, *SGOL1* *A230065H16Rik* n'ont pas été sélectionnés car leur fonction principale n'est pas liée à la prolifération ou à l'adhésion cellulaire (**Tableaux 22**). Les *RIKEN* sont des gènes dont la fonction est inconnue, ou ne codant pas pour une protéine. C'est pourquoi *A230065H16Rik* a été mis de côté. Pourtant, de façon intéressante, ce gène était sous-exprimé dans une analyse transcriptomique (Liu et al., 2018a).

Tableau 22 : caractéristiques des gènes communs non sélectionnés

Symbole de gène	Nom complet	Fonction du gène	Localisation protéique	Niveau d'expression	Références
<i>CACNA1G</i>	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1	Canal calcique voltage-dépendant : facilite l'entrée du calcium et régule différents processus intra-cellulaires (contraction, sécrétion, neurotransmission et l'expression génique)	Membrane plasmique	Sous-expression	(Morino et al., 2015)
<i>CMBL</i>	Carboxymethylenebutenolidase Homolog	Cysteine hydrolase capable d'hydrolyser préférentiellement les esters cycliques et d'induire la bioactivation de promédicaments.	Cytoplasme	Sous-expression	(Ishizuka et al., 2010)
<i>ENPP2</i>	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	Enzyme à la fois phosphodiesterase capable de cliver les liaisons phosphodiester aux extrémités 5' des oligonucléotides, phospholipase, qui catalyse la production d'acide lysophosphatidique	Membrane plasmique	Sous-expression	(Nam et al., 2001)
<i>GDPD2</i>	Glycerophosphoinositol inositolphosphodiesterase 2	Hydrolyse le glycérophosphoinositol pour produire de l'inositol 1-phosphate et du glycérol. Peut avoir un rôle dans la différenciation et la croissance des ostéoblastes	Membrane plasmique	Sous-expression	(Corda et al., 2009; Yanaka et al., 2003)
<i>HMGCS2</i>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2	Catalyse la première réaction de la cétogenèse, voie métabolique conduisant à la formation de corps cétonique constituant une source d'énergie pour divers organes pendant les périodes de carence en glucides	Cytoplasme	Sous-expression	(Shafqat et al., 2010)
<i>NLRP2</i>	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And Pyrin Domain Containing 2	Interagit avec les composants du complexe IKK (complexe inhibiteur des facteurs de transcription de la famille NF- κ B) afin d'empêcher la dégradation du complexe et donc de supprimer l'activité de NF- κ B	Noyau	Sur-expression	(Tilburgs et al., 2017)
<i>RAD51AP1</i>	DNA repair protein Rad51 Associated Protein 1	Réparation de l'ADN	Noyau	Sur-expression	(Dray et al., 2010; Kovalenko et al., 1997)
<i>SGOL1</i>	Shugoshin-like 1	Protection de la cohésine centromérique contre le clivage pendant la prophase mitotique	Noyau	Sur-expression	(Kitajima et al., 2006; Riedel et al., 2006)

6.6 Validation des résultats de transcriptomique par RT-qPCR

Suite à la sélection des 12 gènes communs, des analyses par RT-qPCR ont été réalisées afin de valider les résultats de transcriptomique. Pour l'ensemble des 12 gènes communs sélectionnés, les résultats de RT-qPCR sont conformes aux résultats transcriptomiques avec un coefficient de corrélation proche de 1 pour l'ensemble des gènes et confirment l'effet dose induit par la SAS pyrogénée NM-203 (Tableau 23).

Tableau 23 : Corrélation entre les données de micropuces et les résultats de RT-qPCR

Nom du gène		NM-203 (1 µg/cm ²)	NM-203 (2 µg/cm ²)	NM-203 (5 µg/cm ²)	Min-U-Sil 5® (20 µg/cm ²)	DE (5 µg/cm ²)	TPA (0.05 µg/mL)	Coefficient de corrélation
AUNIP	<i>Micropuces</i>	1,87	5,90	6,22	5,02	1,37	4,74	0,742
	<i>RT-qPCR</i>	1,10	1,70	7,06	2,94	1,38	4,23	
IL1RL1B	<i>Micropuces</i>	1,64	3,74	4,60	5,06	1,66	4,39	0,844
	<i>RT-qPCR</i>	1,30	1,69	5,88	3,78	1,83	4,76	
LGALS7	<i>Micropuces</i>	0,81	0,68	0,10	0,16	0,63	0,29	0,961
	<i>RT-qPCR</i>	0,69	0,42	0,02	0,06	0,75	0,09	
LUM	<i>Micropuces</i>	0,64	0,70	0,11	0,23	0,55	0,28	0,928
	<i>RT-qPCR</i>	0,49	0,33	0,05	0,06	0,67	0,16	
MCM10	<i>Micropuces</i>	1,64	5,26	7,29	6,27	1,25	4,74	0,846
	<i>RT-qPCR</i>	1,27	2,08	8,50	3,94	1,48	3,82	
PRL2C1	<i>Micropuces</i>	1,49	3,94	18,95	17,46	1,60	13,12	0,962
	<i>RT-qPCR</i>	2,10	4,17	54,40	53,26	3,44	20,00	
PRL2C3	<i>Micropuces</i>	1,63	5,42	22,82	22,73	1,61	20,26	0,954
	<i>RT-qPCR</i>	1,45	3,10	29,11	29,64	2,30	14,75	
PRL2C5	<i>Micropuces</i>	1,64	4,81	17,51	17,35	1,61	13,22	0,880
	<i>RT-qPCR</i>	1,97	4,25	18,55	8,44	4,10	15,00	
POSTN	<i>Micropuces</i>	0,53	0,35	0,09	0,10	0,47	0,08	0,969
	<i>RT-qPCR</i>	0,66	0,31	0,04	0,04	0,71	0,03	
SEMA3G	<i>Micropuces</i>	0,60	0,50	0,14	0,27	0,46	0,21	0,889
	<i>RT-qPCR</i>	0,73	0,38	0,13	0,05	0,87	0,09	
SPARCL1	<i>Micropuces</i>	0,61	0,65	0,04	0,10	0,44	0,27	0,929
	<i>RT-qPCR</i>	0,59	0,32	0,02	0,03	0,64	0,12	
TIMP4	<i>Micropuces</i>	0,57	0,52	0,11	0,22	0,54	0,12	0,960
	<i>RT-qPCR</i>	0,67	0,45	0,02	0,06	0,79	0,03	

Les niveaux d'ARNm de quatre expériences indépendantes ont été normalisés par rapport aux gènes de ménage puis rapportés au témoin : TPA vs DMSO, la SAS pyrogénée NM-203 aux doses 1, 2, et 5 µg / cm², la silice cristalline Min-U-Sil 5®, la silice amorphe DE vs H₂O. Le coefficient de corrélation est calculé sur toutes les valeurs.

6.7 Validité de la signature commune pour d'autres SAS

Nous avons par la suite évalué si l'exposition des cellules Bhas 42 à d'autres SAS précipitées NM-200, NM-201 et pyrogénée NM-202 implique des modifications de l'expression des 12 gènes communs sélectionnés. L'exposition des cellules Bhas 42 à la SAS précipitée NM-200 (20 µg / cm²) ou à la SAS pyrogénée NM-202 (20 µg/cm²) conduit à un profil d'expression similaire à celui obtenu lorsque les cellules sont traitées avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²), c'est-à-dire une augmentation de l'expression de *AUNIP*, *IL1RL1*, *MCM10*, *PRL2C1*, *PRL2C3* et *PRL2C5* et une diminution de *LGALS7*, *LUM*, *POSTN*, *SEMA3G*, *SPARCL1* et *TIMP4* (Figure 33). En revanche, les cellules exposées à la SAS précipitée NM-201 (non transformant en un traitement) ne montrent aucun changement significatif dans l'expression de chaque gène. Les résultats obtenus mettent en évidence une signature de 12 gènes pouvant être considérés comme potentiel "bio-marqueurs" précoce de la transformation cellulaire induite par les SAS.

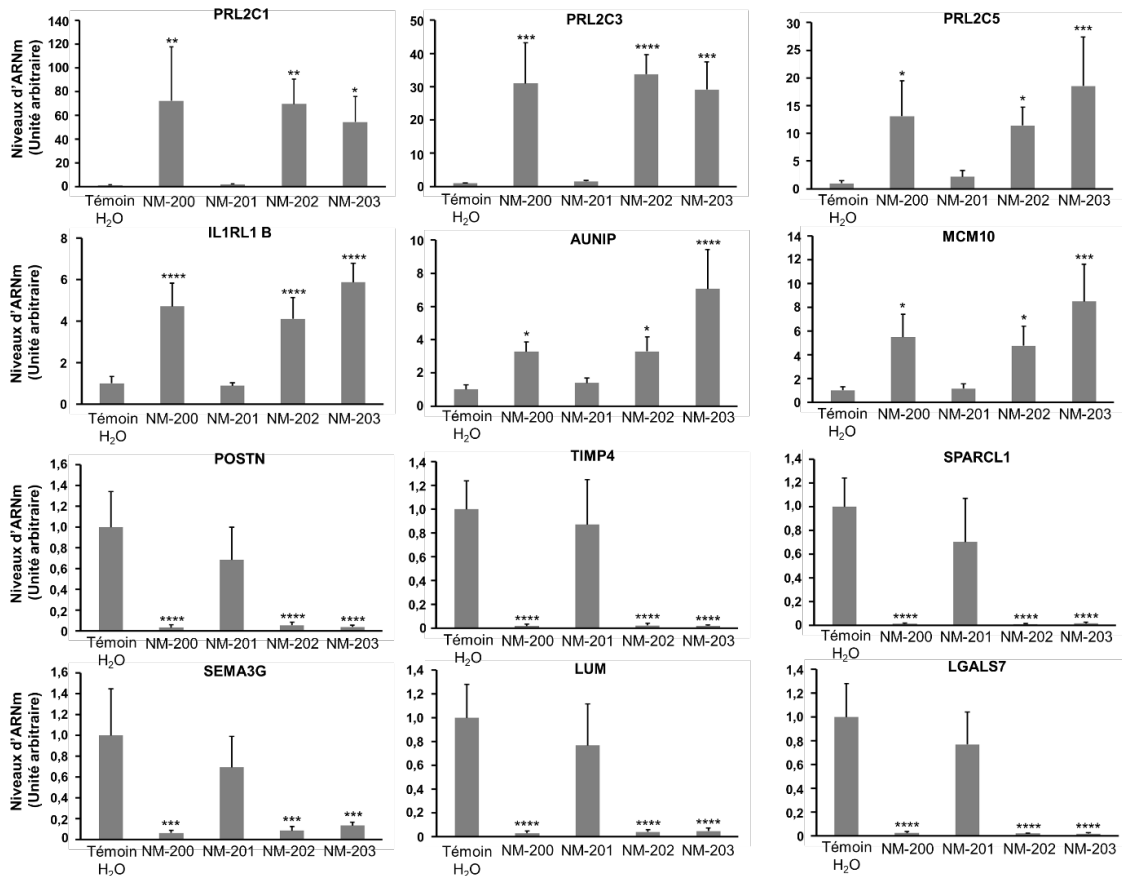


Figure 33 : Changements d'expression induits par les SAS précipitées NM-200, NM-201 et les SAS pyrogénées NM-202, NM-203.

Expression relative des 12 gènes sélectionnés (*AUNIP*, *IL1RL1* (isoforme B), *MCM10*, *PRL2C1*, *PRL2C3*, *PRL2C5*, *LGLAS7*, *LUM*, *POSTN*, *SEMA3G*, *SPARCL1* et *TIMP4*) après 48h de traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS précipitée NM-200 (20 µg / cm²), la SAS précipitée NM-201 (20 µg / cm²), la SAS pyrogénée NM-202 (20 µg / cm²) et la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg / cm²). La quantité d'ARNm a été normalisée par rapport aux gènes de ménage puis rapportée au témoin H₂O. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'écart type de quatre expériences indépendantes. * indique une p-value <0,05, ** indique une p-value <0,01, *** indique une p-value <0,005, **** indique une p-value < 0,001 par rapport aux cellules témoins suite à une ANOVA à un facteur suivie d'un test de comparaisons multiples de Dunnett.

6.8 Cinétique d'expression des 12 gènes communs

Afin d'étudier l'évolution de l'expression des gènes à des temps de traitement plus courts que 48h, une cinétique d'expression a été réalisée aux temps 3h, 6h, 12h, 24h et 48h. Les résultats montrent que l'effet de la SAS pyrogénée NM-203, de la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et du TPA est relativement précoce et peut être observé pour la quasi-totalité des gènes (sauf *SPARCL1*, *AUNIP* et *MCM10*) avant 48h-post exposition (**Figure 34**). En particulier, pour la quasi-totalité des gènes, une modulation de l'expression est observée dès 24h post-exposition avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA. En écartant *SPARCL1*, *AUNIP* et *MCM10* de la liste des gènes constituant une signature commune de l'effet transformant des agents chimiques, celle-ci peut être étudiée dès le temps d'exposition de 24h et nous permet de rendre le test de criblage plus efficace et rapide.

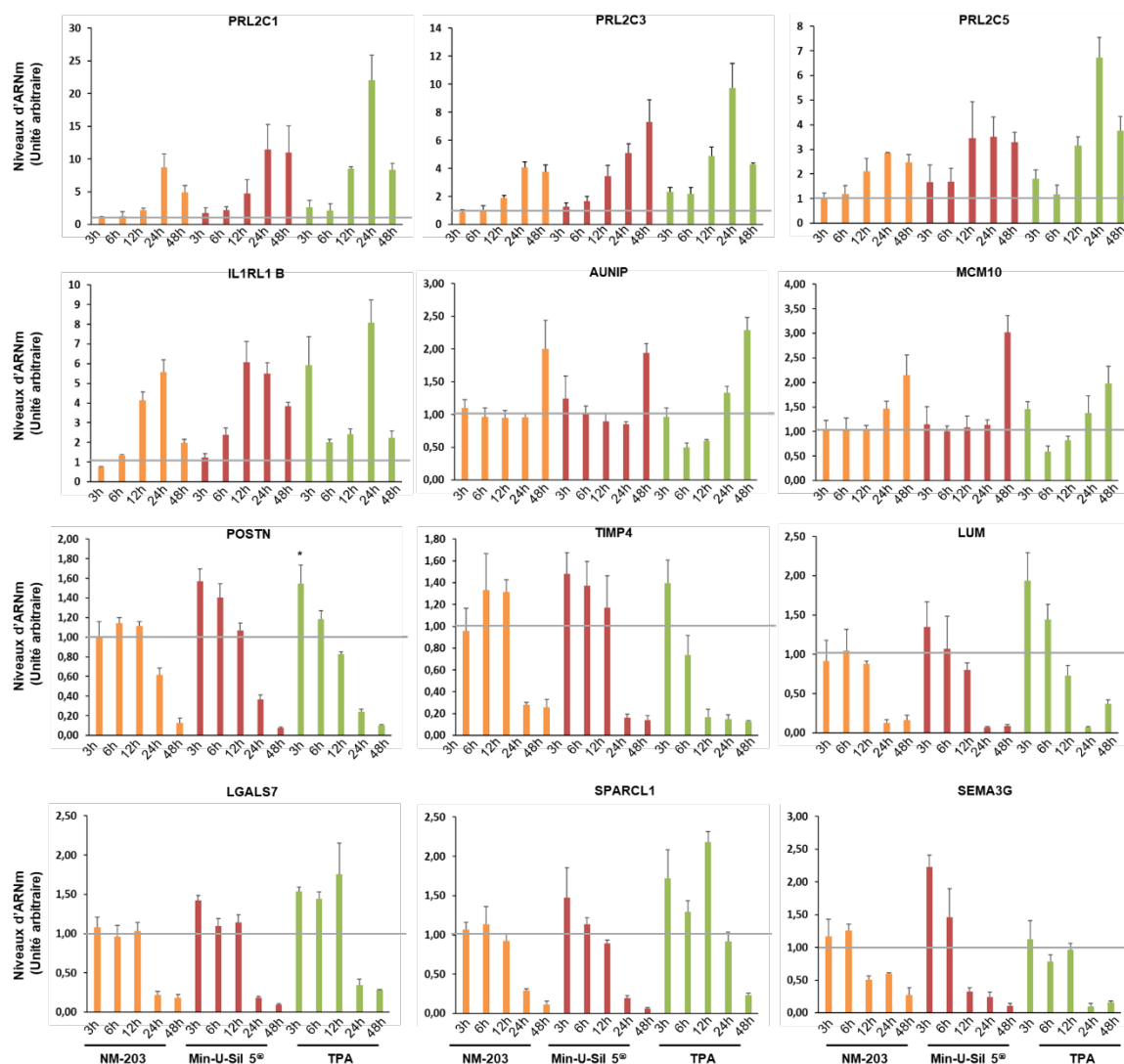


Figure 34 : Cinétique d'expression des 12 gènes communs sélectionnés.

Expression relative des 12 gènes (*PRL2C1*, *PRL2C3*, *PRL2C5*, *IL1RL1* (Isoforme B), *AUNIP*, *MCM10*, *RAD51AP1*, *POSTN*, *TIMP4*, *LGALS7*, *LUM*, *SPARCL1*, *SEMA3G*) après 3h, 6h, 12h, 24h et 48h de traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²), la silice cristalline Min-U-Sil 5° (20 µg/cm²) et TPA (0,05 µg/mL). La quantité d'ARNm a été normalisée par rapport aux gènes de ménage puis rapportée au témoin H₂O. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'écart type de trois réplicats techniques.

6.9 Étude de la corrélation entre ARNm et protéines

L'ensemble des protéines extracellulaires (*POSTN*, *LUM*, *TIMP4*, *LGALS7*, *SPARCL1*, et la famille des *PRL2C*) ont été sélectionnées dans cette étude pour proposer un dosage des protéines rapide tel qu'un test ELISA. Cependant, l'analyse de la protéine *SPARCL1* et des protéines de la famille des *PRL2C* n'a pas pu être réalisée par ELISA, car les kits ELISA correspondant n'étaient pas disponibles dans le commerce. D'autre part les protéines *LUM*, *TIMP4* (intra et extracellulaire), *LGALS7* (extracellulaire) n'ont pas été détectées. Seul le taux de *POSTN* a pu être étudié par ELISA.

Dans le même but, les niveaux de ces protéines extracellulaires et des protéines intracellulaires ont été étudiés par Western Blot. L'analyse des protéines *SPARCL1*, *SEMA3G* n'a pas pu être réalisée car les anticorps correspondants ne sont pas disponibles dans le commerce. De plus, sûrement à cause d'un manque de spécificité des anticorps disponibles dans le commerce, les protéines *LUM*, *TIMP4* (intra et

extracellulaire), LGALS7 (extracellulaire) et AUNIP n'ont pas pu être détectées. Les taux de protéines ont alors été déterminés par Western Blot pour MCM10, IL1RL1 B, POSTN, LGALS7 et la famille des PRL2C. Pour POSTN, LGALS7 et la famille des PRL2C, une concordance entre les niveaux d'expression en ARNm et les quantités de protéines correspondantes est observée sauf pour certaines conditions de traitement (SAS précipitée NM-201, SAS pyrogénée NM-203 à 1 et 2 µg/cm², TPA et DE) (**Figure 35A et B**).

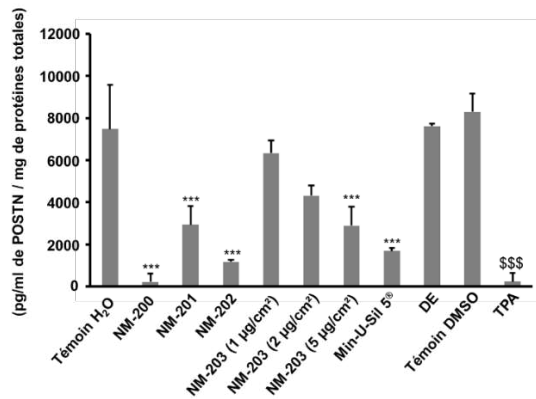
En accord avec les résultats obtenus pour les ARNm, une diminution significative du niveau de périostine (protéines extracellulaires codées par le gène POSTN) est observée lorsque les cellules Bhas 42 sont traitées avec la SAS précipitée NM-200 à 20 µg/cm², la SAS pyrogénée NM-202 à 20 µg/cm², la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] à 20 µg/cm², la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm² et le TPA à 0,05 µg/mL. Par ailleurs, le traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 à 1 µg/cm², 2 µg/cm² et la silice amorphe DE (5 µg/cm²) n'a pas d'effet sur le taux de périostine. En revanche, une diminution plus faible mais significative du taux de périostine est observée lorsque les cellules sont traitées avec le SAS précipitée NM-201 (20 µg/cm²) (**Figure 35A**).

Les résultats de Western Blot sur les extraits cellulaires ainsi que sur le surnageant de culture de deux protéines extracellulaire, la proliférine (protéines codées par les gènes de la famille PRL2C) et la galectine-7 (protéines codées par le gène LGALS7) montrent une augmentation de la proliférine intra et extracellulaire lorsque les cellules étaient traitées avec les SAS précipitées NM-200, NM-202, la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA, confirmant ainsi les résultats de RT-qPCR. En ce qui concerne la proliférine intracellulaire, la SAS pyrogénée NM-203 induit une augmentation du taux de proliférine seulement à 5 µg/cm². Aucun effet du niveau de protéines intracellulaires n'est observé après traitement avec la SAS précipitée NM-201, la SAS pyrogénée NM-203 à 1 µg/cm² et 2 µg/cm² et la silice amorphe DE (**Figure 35B**). En revanche, la silice amorphe DE et la SAS pyrogénée NM-203 induisent une augmentation du taux de proliférine extracellulaire, et ce, dès la dose à 1 µg/cm² pour la SAS pyrogénée NM-203.

Le niveau de protéines galectine-7 intracellulaire diminue lorsque les cellules sont traitées avec les SAS précipitées NM-200, NM-202, la SAS pyrogénée NM-203 (2 et 5 µg/cm²) et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®]. De plus, aucune modulation du niveau de protéines n'est observée après traitement avec la SAS précipitée NM-201, la SAS pyrogénée NM-203 à 1 µg/cm² et la silice amorphe DE. Cependant, le traitement avec le TPA ne diminue pas les taux de protéines, ce qui est en contradiction avec les résultats issus des RT-qPCR pour lesquels le traitement des cellules Bhas 42 avec le TPA induit une diminution significative de l'expression du gène (**Figure 35B**). La galectine-7 extracellulaire n'a pas été mise en évidence dans nos conditions expérimentales. De plus, quel que soit le traitement, aucune variation du niveau de IL1RL1 intracellulaire ou extracellulaire et de MCM10 n'a été observée (**Figure 35B**).

Au vu des résultats obtenus par l'analyse protéique, la mise en place d'un test de criblage pour l'évaluation des stades précoces de la transformation cellulaire induite par des agents chimiques basée sur la méthode de RT-qPCR semble pour l'instant plus pertinente. Un résumé de ces résultats est présenté **Tableau 24**.

A



B

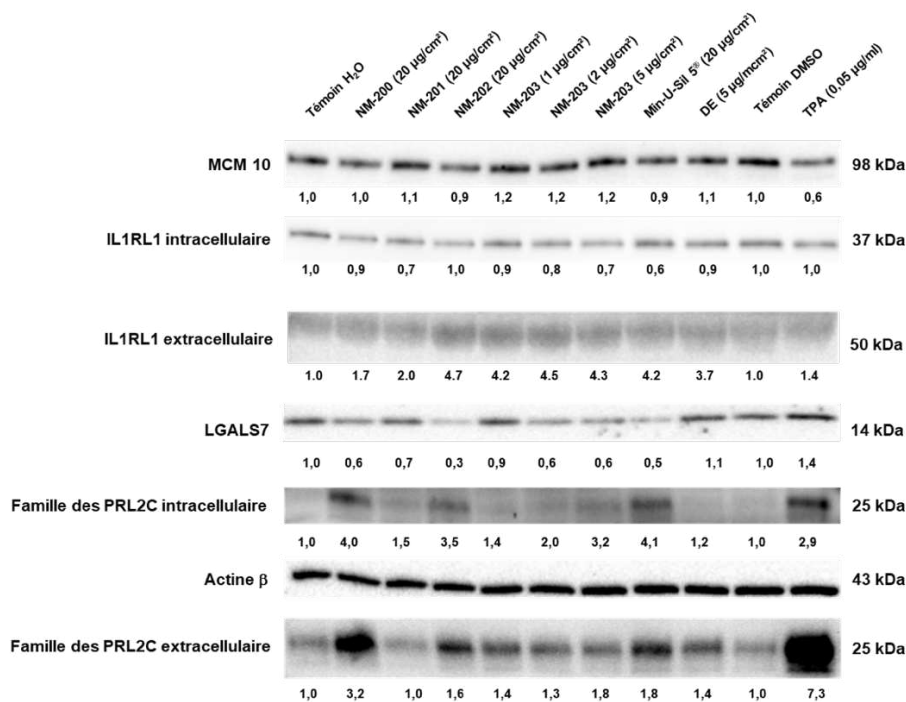


Figure 35 : Analyse des protéines.

(A) La sécrétion de périostine (POSTN) (n = 3) a été déterminée par ELISA 48h après traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS précipitée NM-200 (20 µg/cm²), la SAS précipitée NM-201 (20 µg/cm²), la SAS pyrogénée NM-202 (20 µg/cm²), la SAS pyrogénée NM-203 à des concentrations croissantes, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] (20 µg/cm²), la silice amorphe DE (5 µg/cm²) et le TPA (0,05 µg/mL). *** indique une p-value < 0,005 par rapport aux conditions témoins (H₂O) suite à une transformation logarithmique des données et à un test ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett réalisé grâce au logiciel GraphPad. \$\$\$ indique une p-value < 0,005 (comparaison des résultats obtenus à partir de cellules exposées au TPA avec ceux obtenus à partir de cellules traitées au DMSO) suite à un t-test non païré appliqué pour la comparaison deux à deux. (B) Les niveaux de protéines intra-cellulaires ont été analysés par Western blot. La proliférine et IL1RL1 ont également été détectées dans le surnageant de culture cellulaire. Les résultats sont représentatifs de l'une des trois expériences indépendantes. Le β-Actine a été utilisée comme témoin de charge dans chaque transfert (résultat représentatif de toutes les expériences), à l'exception de la détection de la proliférine et de IL1RL1 dans le surnageant cellulaire. L'intensité de luminescence a été normalisée par rapport à la β-Actine puis rapportée au témoin: TPA vs DMSO, les SAS précipitées NM-200, NM-201, les SAS pyrogénée NM-202, NM-203 aux doses 1, 2, et 5 µg / cm², la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE vs H₂O.

Tableau 24 : Récapitulatif de la corrélation entre protéines et ARNm.

	Protéines vs ARNm
POSTN extracellulaire	Corrélation sauf pour NM-201
Famille des PRL2C intracellulaire	Corrélation
Famille des PRL2C extracellulaire	Corrélation sauf pour la SAS pyrogénée NM-203 (dose 1 et 2 µg/cm²) et la silice amorphe DE
LGALS7 intracellulaire	Corrélation sauf pour TPA
LGALS7 extracellulaire	Aucune détection de la protéine
IL1RL1B	Pas de corrélation, pas de variation du taux de protéines
MCM10	Pas de corrélation, pas de variation du taux de protéines
LUM	Aucune détection de la protéine
TIMP4	Aucune détection de la protéine
AUNIP	Aucune détection de la protéine
SPARCL1	Pas d'anticorps
SEMA3G	Pas d'anticorps

Chapitre V : DISCUSSION

Bien que les SAS soient largement produites et utilisées, peu d'études se sont focalisées sur leur potentiel transformant ou cancérigène (Murugadoss et al., 2017; Napierska et al., 2010). Dans une étude précédente menée à l'INRS, les propriétés transformantes des SAS précipitées NM-200 et NM-201 et des SAS pyrogénées NM-202 et NM-203 ont été révélées à travers le test de transformation des cellules Bhas 42 dans les conditions de promotion (Fontana et al., 2017). Afin d'étudier les signatures moléculaires induites par les SAS en comparaison avec d'autres agents transformants, une analyse transcriptomique non supervisée a été effectuée, après une exposition de 48h des cellules Bhas 42 à la SAS pyrogénée NM-203 (la plus transformante), la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], la silice amorphe DE et au TPA. À cette durée de traitement, la SAS pyrogénée NM-203 et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] induisent des changements d'expression de gènes associés à des mécanismes épigénétiques (Seidel et al., 2017). Nous avons donc émis l'hypothèse que ce traitement induit d'autres modifications d'expression de gènes. L'étude transcriptomique a permis de mettre en évidence 21 gènes dont l'expression est modifiée communément par la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA. Parmi eux, 12 gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'adhésion ont été sélectionnés comme marqueurs des propriétés transformantes de la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et du TPA. Afin de vérifier si cette signature de gènes pouvait être généralisée à d'autres types de SAS, l'expression de ces 12 gènes a été étudiée avec les SAS précipitées NM-200 et NM-201 et la SAS pyrogénée NM-202. Bien que la SAS précipitée NM-201 n'induisse aucune modification de l'expression de ces gènes, des changements similaires des niveaux d'ARN de chaque gène sélectionné ont été obtenus avec la SAS précipitée NM-200 et pyrogénée NM-202, transformantes en un seul traitement, suggérant que cette signature peut être utilisée comme marqueur potentiel de l'effet transformant des SAS.

1. Tests de transformation et approche transcriptomique.

Les tests de transformation cellulaire permettent de mettre en évidence le potentiel transformant d'une substance chimique en un temps relativement court (20 à 30 jours). Ils peuvent être donc utilisés comme outil de criblage afin de repérer les substances candidates aux essais de cancérogénèse *in vivo*. D'autre part, les tests de transformation sont capables de détecter les agents cancérogènes dits « non génotoxiques » qui échappent aux tests de génotoxicité généralement appliqués pour détecter les substances à potentiel cancérogène (Creton et al., 2012). Les tests de transformation cellulaire *in vitro* permettent ainsi d'identifier des agents cancérogènes quel que soit leur mode d'action initial, génotoxique ou non. Les SAS utilisées n'ont pas induit de génotoxicité dans divers lignées cellulaires (Tavares et al., 2014; Uboldi et al., 2012). Parmi les tests de transformation, le modèle Bhas 42 possède l'avantage de pouvoir discriminer de manière simple les effets initiateurs et promoteurs des agents chimiques (Asada et al., 2005; OECD, 2016; Ohmori et al., 2004). Cependant, les tests de transformation cellulaire reposent sur l'observation du phénotype transformant, c'est-à-dire sur la morphologie et le comptage des foyers transformés. Ils ne permettent pas d'identifier les signatures moléculaires sous-jacentes. L'apparition de la technologie des puces à ADN (ou transcriptomique) a

révolutionné les études toxicologiques. En effet, cette technologie de criblage permet d'analyser simultanément les modifications directes ou indirectes de l'expression de gènes suite à l'exposition à un toxique. La transcriptomique est une approche pertinente pour identifier les voies biologiques modifiées par un agent toxique (Halappanavar et al., 2011, 2015; Poulsen et al., 2015). Elle a d'ailleurs été utilisée par d'autres auteurs sur la lignée cellulaire BALB/c 3T3 afin d'identifier des gènes dont la modulation de l'expression serait prédictive des effets cancérigènes des agents chimiques (Ao et al., 2010; Maeshima et al., 2009, 2010; Rohrbeck et al., 2010). À notre connaissance, aucune étude transcriptomique réalisée avec des cellules Bhas 42 n'a été publiée à ce jour. En revanche des études transcriptomiques se sont intéressées à la toxicité des SAS et des microparticules de silice (Decan et al., 2016; Guo et al., 2017; McDermott et al., 2011; Perkins et al., 2015; Vuong et al., 2017), dont une étude réalisée sur les cellules A549 traitées avec la SAS pyrogénée NM-203 (Pisani et al., 2015). L'approche transcriptomique appliquée au modèle de transformation Bhas 42 que nous avons choisie est dans la continuité de ces études.

2. Les SAS induisent la transformation cellulaire *in vitro*

Les SAS induisent la transformation des cellules Bhas 42 dans le test réalisé à la fois dans les conditions standard avec trois traitements consécutifs et avec un traitement unique (excepté NM-201). Le faible pouvoir transformant de la SAS précipitée NM-201 peut s'expliquer par sa surface spécifique moins importante comparée à celles des autres SAS (140 vs ≈ 200 g / cm²) (**Tableau 1**). En effet, la toxicité des nanomatériaux est souvent attribuée à leur grande surface spécifique qui multiplie les échanges réactionnels potentiels avec leur environnement biologique (Krug and Wick, 2011). D'autre part, les résultats de transformation suggèrent que les SAS peuvent agir *in vitro* comme des agents promoteurs de tumeurs car elles entraînent une transformation des cellules en foyers uniquement dans les conditions de promotion (Fontana et al., 2017). Notons qu'une étude sur les cellules BALB/c 3T3 a montré qu'un traitement unique pendant 72h avec les SAS précipitées NM-200 et pyrogénée NM-203, n'induit pas de transformation (Uboldi et al., 2012). Les cellules BALB/c 3T3 n'étant pas dans une configuration de cellules « initiées » comme le sont les cellules Bhas 42, ces résultats sont plutôt en accord avec l'étude de (Fontana et al., 2017).

Enfin, en considérant l'intensité de la réponse, c'est-à-dire le nombre de foyers de transformation, et la première dose transformante significative, la SAS pyrogénée NM-203 s'est révélée la plus active des quatre nano-silice testées à la fois dans le test de transformation à un seul et à trois traitements. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Di Cristo et al, 2015 qui ont mis en évidence que les effets biologiques observés (stress oxydant, réponse inflammatoire) suite à un traitement des cellules MH-S et RAW264.7 sont systématiquement plus importants lorsque les cellules sont traitées avec la SAS pyrogénée NM-203 qu'avec la SAS précipitée NM-200, à dosimétrie comparable (Di Cristo et al., 2016). Reuzel *et al.* a également mis en évidence que la SAS pyrogénée NM-203 induit les réponses les plus prononcées telles qu'une accumulation de neutrophiles et de macrophages alvéolaires plus importante après exposition *in vivo* de rats par inhalation à 30 mg de la SAS pyrogénée NM-203 et pendant la période post-exposition en comparaison avec la SAS précipitée Sipernat 22S (Reuzel et al., 1991).

C'est donc la SAS pyrogénée NM-203 qui a été retenue comme modèle de SAS dans notre étude transcriptomique, afin d'approfondir les effets conduisant à la transformation cellulaire induite par les SAS.

3. Pénétration cellulaire de la SAS pyrogénée NM-203

Puisque la capacité des SAS à pénétrer dans les cellules pourrait jouer un rôle important dans leur propriété transformante, nous avons étudié ce paramètre en utilisant la SAS pyrogénée NM-203. Nous avons observé des agrégats de la SAS pyrogénée NM-203 dans le cytoplasme des cellules Bhas 42. En revanche, aucune pénétration à l'intérieur du noyau ou d'autres organites n'a été observée. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Gazzano et al., 2012) qui ont mis en évidence la capacité de nanoparticules pyrogénées (A-50 et A300) et précipitées (FK320) à pénétrer dans les cellules MH-S ou ceux de (Gehrke et al., 2013) dans des cellules HT29 après exposition des cellules avec la SAS pyrogénée NM-203. La pénétration des particules dans le cytoplasme a également été observée avec des cellules souches mésenchymateuses humaines traitées avec une SAS colloïdale (Yang et al., 2017). Enfin, des SAS colloïdales sont capables de pénétrer des cellules Caco-2 (Tarantini et al., 2015b), A549 (Mu et al., 2012) et des cellules de la lignée immortelle dérivée du cancer du col utérin (cellules HeLa) (Messerschmidt et al., 2016). D'après les résultats issus de la littérature et en accord avec les résultats obtenus dans notre étude, il semble que les nanoparticules de silice amorphes ne pénètrent pas à l'intérieur du noyau. En conséquence, il n'existe pas aujourd'hui de preuves montrant des SAS interagissant directement avec l'ADN. Ainsi nous ne sommes pas en mesure de proposer un lien entre la localisation des SAS dans les cellules Bhas 42 et leur pouvoir transformant.

Il serait alors intéressant d'étudier la capacité des deux particules non transformantes, la DE et de la SAS précipitée NM-201, à pénétrer à l'intérieur des cellules Bhas 42.

4. Signatures moléculaires induites et voies de signalisation modifiées par la SAS pyrogénée NM-203

Parmi les signatures identifiées à l'aide de GSEA, l'exposition des cellules Bhas 42 à la SAS pyrogénée NM-203 est liée au cycle cellulaire. Elle induit un enrichissement significatif des signatures impliquées dans la phase S et dans la phase M du cycle cellulaire (**Tableau 12, Tableau annexe 1 et Tableau A.1 supplémentaire**). Concernant la signature « FURUKAWA_DUSP6_TARGETS_PCI35_DN », (Furukawa et al., 2006) ont mis en évidence une sous-expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire suite à une sur-expression de dual specificity phosphatase 6 (*DUSP6*), un inhibiteur spécifique de *MAPK1 / ERK2*, dans des cellules pancréatiques cancéreuses. De plus, la sur-expression de *DUSP6* induit une sous-expression du gène *AURKA*, gène codant pour la kinase Aurora-A, jouant un rôle clé dans la division cellulaire, et de ses gènes apparentés aurora kinase B (*AURKB*), TPX2 Microtubule Nucleation Factor (*TPX2*) et centromere protein A (*CENPA*). De plus, il est connu que AUNIP, protéine codée par un des 21 gènes communs mis en évidence dans cette étude, interagit avec *AURKA* au niveau des centrosomes et du fuseau mitotique durant le cycle cellulaire (Lieu et al., 2010).

Par ailleurs, l'enrichissement des signatures, « MARKEY_RB1_ACUTE_LOF_UP », « ZHANG_TLX_TARGETS_36HR_DN », « HORIUCHI_WTAP_TARGETS_DN » est lié avec le cycle cellulaire puisque la sous-expression des gènes *RB1*, un régulateur clé de l'entrée en division cellulaire agissant comme un suppresseur de tumeur (Dyson, 2016), Nuclear Receptor Subfamily 2 Group E Member 1 (*TLX*), un récepteur nucléaire agissant comme un facteur de transcription essentiel pour le développement neuronal et la neurogenèse adulte par ses actions dans la régulation de la prolifération (Sun et al., 2017) et Wilms Tumor 1-Associating Protein (*WTAP*), impliqué dans la régulation de la transition du cycle cellulaire G2 / M en se liant à la CYCLINE A (Horiuchi et al., 2006), conduit à une modulation de l'expression de gènes impliqués dans ce processus.

Concernant la signature « FUJII_YBX1_TARGETS_DN », les auteurs ont mis en évidence une sous-expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire *via* une sous-expression de Y-box binding protein 1 (*YBX1*) dans des cellules du cancer du sein (Fujii et al., 2008). De façon contradictoire, dans la signature « BASAKI_YBX1_TARGETS_UP », la sous-expression de *YBX1* conduit à une sur-expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, dans la croissance cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette dans des cellules du cancer de l'ovaire (Basaki et al., 2007). *YBX1* semble avoir un rôle différent selon le type cellulaire. Cependant en entrant la liste des gènes communs à la signature « BASAKI_YBX1_TARGETS_UP » dans l'outil funcassociate, nous avons constaté que ces gènes étaient également impliqués dans la prolifération cellulaire.

Par ailleurs, l'exposition à la SAS pyrogénée NM-203 est liée à la signature « BHATI_G2M_ARREST_BY_2METHOXYESTRADIOL_UP », une signature liée à l'arrêt G2 / M par le méthoxyestradiol, un médicament anti-cancéreux. Les auteurs ont mis en évidence un arrêt du cycle cellulaire par la régulation des gènes impliqués dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (Bhati et al., 2007). Cette observation paraît être en contradiction avec la prolifération anarchique des cellules Bhas 42 lorsqu'elles sont exposées à la SAS pyrogénée NM-203. De plus, concernant la signature « GOBERT_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION_UP », les auteurs ont mis en évidence une induction de la différenciation des oligodendrocytes. Pourtant en réalisant une analyse fonctionnelle sur la liste des gènes communs à ces signatures, nous constatons que ces gènes sont impliqués dans la prolifération cellulaire.

Par ailleurs, l'analyse GSEA a révélé un enrichissement de 12 signatures communes à la SAS pyrogénée NM-203, à la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et au TPA, liées au cycle cellulaire et à la progression tumorale (**Figure 29B et Tableau A.1 supplémentaire**). Parmi ces signatures communes, nous pouvions retrouver les signatures « DUTERTRE ESTRADIOL_RESPONSE_6HR_UP », « FISCHER_G1_S_CELL_CYCLE », « CHEMNITZ_RESPONSE_TO_PROSTAGLANDIN_E2_UP », « BHATI_G2M_ARREST_BY_2METHOXYESTRADIOL_UP », « GOBERT_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION_UP », « FUJII_YBX1_TARGETS_DN », « BASAKI_YBX1_TARGETS_UP », « FURUKAWA_DUSP6_TARGETS_PCI35_DN ». En plus de ces 8 signatures communes, nous avons mis l'accent sur la présence de signatures impliquées dans des stades précoces d'un cancer de l'estomac (Vecchi_Gastric_Cancer_Early_Up) (Vecchi et al., 2007) ou dans des stades tardifs d'un cancer de la vessie (Lindgren_Bladder_Cancer_Cluster_3_Up) (Lindgren et al., 2006). Quel que soit le

stade de développement du cancer, les signatures sont impliquées dans la prolifération cellulaire. De plus, ces signatures ont également été liées à une signature de sarcomes présentant une instabilité génomique (Ferreira_Ewings_Sarcoma_Unstable_Vs_Stable_Up). Dans cette signature, les gènes sur-exprimés sont impliqués dans la séparation des chromosomes au cours de la division cellulaire, dans la réparation de l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire (Ferreira et al., 2008).

Enfin, concernant la signature « O'DONNELL_TFRC_TARGETS_DN », les auteurs ont mis en évidence une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et un arrêt des cellules en G1 suite à l'inhibition de l'expression du gène *TFRC1* (O'Donnell et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que l'expression de *TFRC1* est activée par *c-MYC*.

Par ailleurs, nous avons montré que la SAS pyrogénée NM-203 entraîne une modification de la voie de signalisation « Estrogen-mediated S-phase Entry » impliquée dans l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire en induisant, entre autres, une sur-expression du gène *c-MYC*. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui montrent que les œstrogènes régulent l'expression de *c-MYC* et peuvent de ce fait avoir un rôle dans la modulation de voies de signalisation impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Doisneau-Sixou et al., 2003). Parmi les oncogènes responsables de la transformation cellulaire, la sur-expression du gène *c-MYC* a été largement observée dans différents types de cancer (20% des cancers humains) et a été associée à une agressivité et à un mauvais pronostic (Pelengaris et al., 2002). Par ailleurs, il est reconnu que l'oncogène *c-MYC* est impliqué dans la transformation cellulaire (Flores et al., 2004; Parfett et al., 2000). Dans notre étude, l'expression de la *CCNA* a également été augmentée en présence de la SAS pyrogénée NM-203. La protéine codée par ce gène appartient à la famille des cyclines hautement conservées, dont les membres jouent le rôle de régulateurs du cycle cellulaire. Il est connu que cette protéine favorise la transition entre G1/S et G2/M (Loukil et al., 2015). Enfin, la SAS pyrogénée NM-203 a également induit une sur-expression de *E2F*. Les facteurs de transcription E2F jouent un rôle essentiel dans la régulation de la progression du cycle cellulaire (Liu et al., 2018b). De plus, E2F est un composant essentiel à l'activation de la transcription du gène codant la CYCLINE A (Sylvester et al., 1998). *E2F* figure d'ailleurs parmi les tops up-stream regulator de la SAS pyrogénée NM-203. Il pourrait être envisagé d'inhiber l'expression de ce gène via la méthode CRISPR/Cas9, afin de vérifier si une telle opération peut empêcher la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203.

La SAS pyrogénée NM-203 entraîne la modification de voies de signalisation impliquées dans la réplication de l'ADN telle que la voie « Cell cycle control of chromosomal DNA replication ». En s'intéressant aux gènes impliqués dans cette voie, nous constatons que la SAS pyrogénée NM-203 entraîne une sur-expression des gènes *ORC1*, *CDC6*, *MCM3*, *MCM5*, *MCM7*, *MCM8*, *CDC45* et du gène codant l'ADN polymérase impliqués dans l'initiation de la réplication de l'ADN. En effet, le complexe de reconnaissance d'origine (ORC) est un complexe protéique essentiel à l'initiation de la réplication de l'ADN dans des cellules eucaryotes. ORC se lie spécifiquement aux origines de réplication et sert de support à l'assemblage des facteurs d'initiation supplémentaires tels que les protéines *CDC6* et *MCM*. *CDC6* est ensuite libéré et remplacé par *CDC45* qui va se lier à l'ADN polymérase afin d'initier la synthèse du brin d'ADN (DePamphilis, 2003).

De plus, la SAS pyrogénée NM-203 entraîne une modification des voies « dTMP de novo biosynthesis » et « Superpathway of serine and glycine biosynthesis » deux voies ayant un rôle dans la réplication de l'ADN. La voie « dTMP de novo biosynthesis » joue un rôle essentiel dans la synthèse de l'ADN et la division cellulaire (Chon et al., 2017) et la voie « Superpathway of serine and glycine biosynthesis » est une voie impliquée dans la synthèse de la sérine et de la glycine, des précurseurs essentiels de la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des lipides essentiels à la croissance des cellules cancéreuses (Amelio et al., 2014). De plus, il a été mis en évidence que cette voie métabolique joue un rôle dans la prolifération cellulaire et que l'hyper activation de cette voie est à l'origine de la tumorigenèse (Antonov et al., 2014). La SAS pyrogénée NM-203 induit ainsi une modification de voies de signalisation impliquées dans la réplication de l'ADN. De plus, elle entraîne une modification de voies de signalisation impliquées dans la division cellulaire telles que les voies « Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling » et « Mitotic role of polo like kinase ». Le rôle du récepteur hydrocarbure d'aryle en tant que promoteur du cancer a été démontré dans des modèles murins sur-exprimant une forme constitutivement active du récepteur (Larigot et al., 2018). (Larigot et al., 2018) ont suggéré que ce récepteur favorise la prolifération cellulaire et ont montré que l'activation du récepteur peut entraîner l'activation du proto-oncogène *c-MYC*. Par ailleurs, le processus du cycle cellulaire est régulé par un certain nombre de protéines kinases dont les PLK (Lee et al., 2014). Dans notre cas, plusieurs gènes sont sur-exprimés dont *PLK1*. La famille des kinases de type polo comprend 5 membres (PLK1-PLK5) et est impliquée dans de multiples fonctions de la division cellulaire. Ils régulent divers aspects tels que l'entrée en mitose, l'assemblage du fuseau, l'entrée en anaphase et la cytokinèse en phase mitotique. Il a été rapporté que les PLK sont liés au développement de tumeurs et sur-exprimés dans de nombreux types de cellules tumorales (Lee et al., 2014; Reagan-Shaw and Ahmad, 2005). Ce gène semble être un gène clé de la transformation induite par la SAS pyrogénée NM-203. Cet effet moléculaire est également retrouvé avec la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA.

L'analyse IPA a permis d'identifier des réseaux de gènes différentiellement exprimés, impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération, la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, la recombinaison, l'adhésion cellulaire et la progression tumorale. De façon intéressante, le gène *ERK1/2* est un élément important des réseaux de gènes. La protéine *ERK1/2* est une protéine impliquée dans la voie des MAPK, impliquées dans une grande variété de processus cellulaires tels que la prolifération. L'activation de cette kinase nécessite sa phosphorylation par des kinases en amont (Yao and Seger, 2009). De plus, des études ont déjà mis en évidence la capacité du TPA à induire une phosphorylation de *ERK1/2* dans différentes lignées cellulaires (Refsnes et al., 2014; Wen-Sheng and Jun-Ming, 2005). Il nous paraît intéressant pour la suite des travaux d'étudier plus précisément l'effet de la SAS pyrogénée NM-203, de la silice cristalline Min-U-Sil 5® et du TPA sur le taux de phosphorylation de la protéine ERK via l'utilisation d'un anticorps spécifiquement dirigé contre sa forme phosphorylée. De plus, il a été montré que les membres de la famille des PRL2C, gènes communément sur-exprimés dans notre étude, induit une phosphorylation de ERK dans une lignée cellulaire cancéreuse de l'ovaire (Karthikeyan et al., 2018). Nous pourrions vérifier si l'inactivation de cette voie conduit à une diminution du nombre de foyers transformés.

Par ailleurs, la distribution des cellules Bhas 42 dans les différentes phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux a été étudiée (Seidel et al., 2017). Il avait été mis évidence qu'un traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 entraîne une augmentation de la population cellulaire en phases S et G2/M et une diminution en phase G0/G1 (Seidel et al., 2017). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Guo et al, en 2017 qui montrent une modification de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et le cycle cellulaire après traitement des cellules BEAS-2B avec des SAS colloïdales dans un essai de transformation cellulaire (Guo et al., 2017). De plus, l'analyse des voies de signalisation montre qu'un traitement des cellules A549 avec la silice cristalline Min- U- Sil 5® durant 24h entraîne la modification de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire (Vuong et al., 2017). Enfin, d'autres études transcriptomiques montrent que des agents promoteurs, dont le TPA, induisent la modulation de groupes de gènes impliqués dans le cycle cellulaire dans la lignée BALB/c 3T3 exposée pendant 48h (Maeshima et al., 2009, 2010).

L'analyse IPA a également révélé une modulation des voies de signalisation liées à la réparation de l'ADN telles que les voies « Role of BRCA1 in DNA Damage Response », « DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination » et « BER pathway ». Parmi ces voies de signalisation activées, les gènes *RAD51AP1* et *BARD1* sont sur-exprimés (p -value < 0,005 et FC < 4). *RAD51AP1* (un des 21 gènes communs) joue un rôle essentiel dans la recombinaison homologue lors de la réparation des lésions doubles brins de l'ADN (Gachechiladze et al., 2017) et *BARD1* (BRCA1 Associated RING Domain 1) code pour une protéine capable d'interagir avec la région N-terminale de BRCA1 (Breast cancer 1) afin de former un hétérodimère BRCA1-BARD1 impliqué dans la réparation de l'ADN (Wu-Baer et al., 2003). D'après la littérature, ces gènes ne sont pas les seuls impliqués dans la réparation de l'ADN. En effet, en plus du rôle connu de *RAD51AP1*, parmi les 21 gènes communs : *AUNIP*, *LUM*, *MCM10*, *POSTN*, *CACNA1G*, *CMBL* et *ENPP2* sont également associés à ce mécanisme (Dziegielewska et al., 2014; Khurana et al., 2016; Li and Xu, 2019; Li et al., 2016b; Lou et al., 2017; Yang et al., 2010; Zheng et al., 2017).

Puisqu'il existe une modification de voies de signalisation liées à la réparation de l'ADN après traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, nous nous sommes intéressés à la modification de l'expression du gène *RAD51AP1*. Une augmentation de l'expression de *RAD51AP1* a été observée dans les cellules RAW 264, 7 traitées avec des SAS (10 ou 300 nm) (McDermott et al., 2011). Nous avons alors supposé que ce gène pourrait également être considéré comme un biomarqueur du potentiel transformant des SAS de notre modèle. Un traitement des cellules Bhas 42 avec NM-200, et NM-202 et NM-203 a augmenté l'expression de *RAD51AP1* (**Figure 36**). En revanche, NM-201 n'a eu aucun effet sur le niveau d'expression de ce gène. Ces résultats confirment l'implication du gène *RAD51AP1* dans l'effet transformant des SAS.

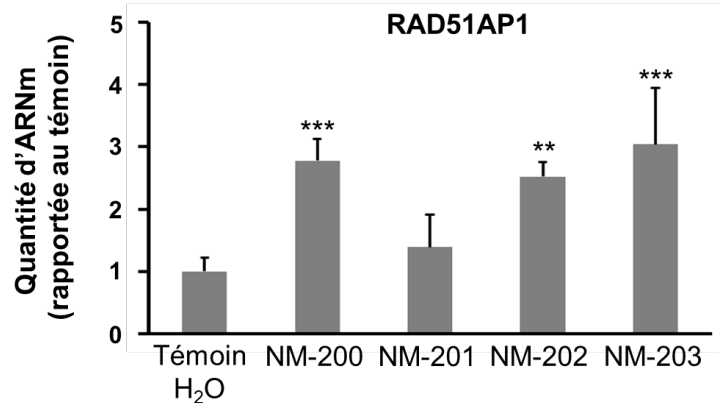


Figure 36 : Expression du gène *RAD51AP1* des Bhas 42 après traitement par NM-200, NM-201 et NM-202. Expression relative de *RAD51AP1* après 48h de traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS précipitée NM-200 (20 µg/cm²), la SAS précipitée NM-201 (20 µg/cm²), la SAS pyrogénée NM-202 (20 µg/cm²) et la SAS pyrogénée NM-203 (5 µg/cm²). La quantité d'ARNm a été normalisée par rapport aux gènes de ménage puis rapportée au témoin H₂O. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'écart type de quatre expériences indépendantes. ** indique p-value <0,01, *** p-value <0,005 par rapport aux cellules témoins suite une ANOVA à un facteur suivie d'un test de comparaisons multiples de Dunnett.

Ce constat suggère des propriétés génotoxiques de la SAS pyrogénée NM-203, qui pourraient induire des dommages à l'ADN et par là-même activer des systèmes de réparation. Or, en l'absence de système efficace de réparation, les altérations de l'ADN peuvent conduire à des mutations de l'ADN qui elles-mêmes induisent l'activation de proto-oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Pelengaris et al., 2002) ; ces derniers éléments pourraient expliquer, en partie tout au moins, la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Guo et al, qui ont mis en évidence qu'un traitement des cellules BEAS-2B avec des SAS peut entraîner une modification des voies de signalisation impliquées dans la réparation de l'ADN telles que la voie BER (Guo et al., 2017).

Dans le cas des cellules Bhas 42, aucune donnée n'a été publiée concernant les effets génotoxiques induits par les SAS. Il serait alors intéressant de poursuivre les travaux sur la compréhension du modèle Bhas 42 et sa réponse aux traitements par les SAS. Nous pourrions alors envisager de réaliser des tests de génotoxicité tels que le test des micronoyaux, le test des comètes ou encore le test γH2AX à différents temps de traitement et avec différentes doses de nanoparticules.

D'autre part, les résultats de cette étude mettent en évidence une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire lors de la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203, et également la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA. Parmi eux, les gènes *POSTN*, *LUM*, *LGLAS7*, *TIMP4*, *SEMA3G* et *SPARCL1* ont été retenus dans la liste des 12 gènes constituant la signature des effets transformants des SAS. Ils codent des protéoglycanes, des glycoprotéines, des protéines impliquées dans les interactions entre cellules et/ou cellules-matrice extracellulaire, dans l'assemblage, l'organisation et le renforcement des fibrilles de collagène et dans le remodelage de la matrice extracellulaire. De plus, l'analyse IPA met en évidence une modification de la voie « Inhibition of matrix metalloprotease », une voie de signalisation liée à la migration cellulaire après traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203. La migration est accompagnée par une sous-expression du gène *TIMP4*. *TIMP4* qui est un inhibiteur des métalloprotéinases matricielles

(MMP), un groupe de peptidases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Brew et al., 2000). La sous-expression de *TIMP4* aurait pu conduire à une augmentation de l'activité des MMP au niveau protéique. Or, dans notre cas, c'est une sous-expression des *MMP2* et *MMP9* qui a été constatée. Nous pourrions étudier l'activité de ces protéines MMP par zimographie, une méthode utilisant leur propriété enzymatique.

De plus, l'analyse IPA a mis en évidence une modification de la voie « Hepatic fibrosis/ hepatic stellate cell activation », une voie également impliquée dans la migration cellulaire (Hou and Syn, 2018; Marcher et al., 2019). Afin d'étudier la capacité des cellules Bhas 42 à migrer, nous pourrions réaliser un test de blessure ou un test de boyden. Par ailleurs, l'analyse Panther a révélé une modification de la voie « Integrin signaling pathway » avec une sous expression des gènes *COL5A3*, *COL27A1* et *ITGBL1*, des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire (Berg et al., 1999; Theocharis et al., 2016). Dans un autre modèle cellulaire, (Pisani et al., 2015) n'ont pas mis en évidence de modification des voies de signalisation impliquées dans l'adhésion ou la migration cellulaire après traitement de cellules A549 avec la SAS pyrogénée NM-203. En revanche, (Guo et al., 2017) ont rapporté une modification des voies de signalisation impliquées dans l'adhésion cellulaire des BEAS-2B traitées avec des SAS colloïdales. L'activation des voies de signalisation impliquées dans l'adhésion cellulaire induite par les SAS pourrait dépendre du type cellulaire étudié.

L'utilisation de l'instrument xCELLigence RTCA DP pourrait être pertinente pour une analyse en temps réel de l'adhésion des cellules Bhas 42 à leur support.

L'analyse GSEA montre également avec la SAS pyrogénée NM-203 un enrichissement de la signature « CHEMNITZ_RESPONSE_TO_PROSTAGLANDIN_E2_UP » liée à l'inflammation. La prostaglandine E₂ est un inhibiteur connu de l'activation des lymphocytes T CD4⁺. (Chemnitz et al., 2006), ont montré qu'un traitement de lymphocytes T CD4⁺ avec de la prostaglandine conduit à une sur-expression de gènes impliqués dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et à une inactivation des cellules T CD4⁺. Cependant, cette signature montre également une sur-expression du gène *AURKA* et des gènes codant des CYCLINES telles que la CYCLINE B. Or, dans le cas des lymphocytes T CD4⁺, cette sur-expression n'induit pas de prolifération cellulaire. En ce qui concerne les cellules Bhas 42 traitées avec la SAS pyrogénée NM-203, cette signature est plutôt en faveur d'une augmentation de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, l'analyse IPA montre que la SAS pyrogénée NM-203 module la biosynthèse des prostanoides dont les prostaglandines font partie. Les prostaglandines possèdent des effets modulateurs sur différentes cellules du système immunitaire engendrant ainsi une inflammation (Akaogi et al., 2006; Park et al., 2006). Dans notre étude, seule l'expression des enzymes de synthèse des prostaglandines est augmentée. En revanche, celle des gènes codant les prostaglandines, à proprement dit, n'est pas modifiée. L'analyse des modifications d'expression au niveau protéique pourrait être envisagée.

L'analyse Panther met en évidence l'activation de la voie « Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway » avec une sur-expression des gènes *CXCL10* et *PTGS2*. Enfin, le gène *IL1RL1*, l'un des 21 gènes communs, est sur-exprimé dans les cellules Bhas 42. La protéine codée par ce gène est un membre de la famille des récepteurs de l'interleukine 1 et son seul ligand connu est IL-33. La signalisation IL-33/IL1RL1 participe à la réaction inflammatoire. Suite à la liaison à son

récepteur, IL-33 active les voies de signalisation MAPK et NF κ B et induit ainsi la prolifération et l'activation des cellules immunitaires (Griesenauer and Paczesny, 2017; Meisel et al., 2001; Queiroz et al., 2017). Ainsi, la sur-expression de *IL1RL1* pourrait conduire à une réponse inflammatoire dans les cellules Bhas 42. Pisani *et al.*, ont mis en évidence la modulation de l'expression des médiateurs inflammatoires (*IL-6*, *IL-8* et *TNF- α*) et des chimiokines (*CCL5* et *CCL20*) ainsi qu'une modification des voies de signalisation liées à des processus inflammatoires après traitement des cellules A549 avec la SAS pyrogénée NM-203 durant 24h (Pisani et al., 2015). De même, une exposition des cellules A549 à une silice pyrogénée induit une réponse pro-inflammatoire *via* l'augmentation du taux de l'interleukine 8 (IL-8) (Panas et al., 2014). Di Cristo et al ont également mis en évidence une augmentation du taux d'IL-6, d'IL-1 β et du TNF- α suite à une exposition des cellules MH-S et Raw 264.7 à la SAS précipitée NM-200 et à la SAS pyrogénée NM-203 (Di Cristo et al., 2016). Dans les conditions d'analyse choisies dans cette étude, p-value < 0,05 et FC > 2, l'expression des gènes codant ces protéines n'a pas été modifiée par la SAS pyrogénée NM-203. La recherche d'effet inflammatoire dans les cellules Bhas 42 méritent d'être approfondie, en particulier une mesure des taux de protéines *IL-6*, *IL-8* et *TNF- α* , *CCL5* et *CCL20*. L'étude du taux de phosphorylation de NF κ B par western blot *via* l'utilisation d'un anticorps spécifique des groupements phosphorylés de NF κ B pourrait également être envisagée.

Pour finir, ce mécanisme d'action n'est pas spécifique à la SAS pyrogénée NM-203. En effet, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA entraînent également une modification de ces voies de signalisation.

5. c-MYC et mécanismes épigénétiques

Dans une précédente étude menée à l'INRS, nous avons montré que la SAS pyrogénée NM-203 induit des modifications épigénétiques sur le promoteur du gène *c-MYC*. Il est maintenant bien établi que des modifications épigénétiques peuvent survenir au cours de la cancérogenèse (Deltour et al., 2005). Ces modifications épigénétiques induites par la SAS pyrogénées NM-203 pourraient expliquer en partie la transformation des cellules Bhas 42 observée. En effet, il a été montré qu'au cours des étapes d'initiation et de progression du cancer une hypométhylation globale de l'ADN peut entraîner une instabilité chromosomique due à la réactivation d'éléments mobiles et la perte d'inhibition de la transcription des séquences répétées. Dans notre modèle cellulaire, les traitements avec la SAS pyrogénée NM-203 à la concentration testée (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ne modifient pas le taux de méthylation globale de l'ADN contrairement à ce qui a été montré avec une nanoparticule de silice (15 nm) qui induit une hypométhylation globale de l'ADN avec une diminution de l'expression de DNMT1 et DNMT3a des cellules de la lignée cellulaire de kératinocytes humains (cellules HaCaT) (Gong et al., 2010). Or, l'augmentation de l'expression des DNMT est associée à une hyperméthylation de séquences spécifiques, notamment au niveau des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs, comme il a été montré précédemment par différentes équipes (Deltour et al., 2005; Romani et al., 2015). Par exemple, l'augmentation de l'expression de DNMT1 est associée à une hyperméthylation du promoteur du gène codant pour p16, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, et par conséquent sa répression transcriptionnelle (Soberanes et al., 2012). Dans cette étude, avec une p-value < 0,05 et FC > 2, la SAS pyrogénée NM-203 augmente l'expression de *DNMT1* et la sous expression de *DNMT3a*. Cependant,

après 48h de traitement des cellules Bhas 42, la SAS pyrogénée NM-203 n'induit pas de modification du taux protéique de DNMT1, 3a et 3b, ce qui est également en accord avec l'absence d'hypométhylation globale que nous avons observée (Seidel et al., 2017). Par ailleurs, l'acétylation des histones, impliquée dans la régulation de l'expression génique, est altérée dans différents types de cancers et est la conséquence de la modulation de l'expression des HDAC (Halkidou et al., 2004; Sharma et al., 2010; Song et al., 2005). Notre étude montre que le traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 augmente l'expression du gène *HAT1* mais n'induit pas de modifications de l'expression des *HDAC* par rapport au témoin quels que soient la p-value ou le FC. En accord avec ces résultats, la SAS pyrogénée NM-203 n'a également pas induit de modifications du taux protéique des HDAC ni de modification de l'acétylation des histones H3 et H4 (Seidel et al., 2017). Globalement, la modification des mécanismes épigénétiques ne semble pas mise en jeu dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203. Cependant, Seidel et al, ont mis en évidence qu'un traitement à court terme des cellules Bhas 42 avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] diminue la méthylation globale de l'ADN et augmente l'expression des deux DNMT *de novo*, DNMT3a et DNMT3b. De plus, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] modifie le statut d'acétylation global de l'histone H4 et du taux de protéines HDAC. Enfin, l'oncogène *c-MYC* est impliqué dans la transformation cellulaire (Flores et al., 2004; Parfett et al., 2000). Il pourrait donc avoir un rôle important dans la transformation cellulaire induite par la SAS pyrogénée NM-203. (Seidel et al., 2017) ont mis en évidence une surexpression du gène *c-MYC* après traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203 et la silice cristalline Min-U-Sil 5[®], ce qui était en corrélation avec des modifications épigénétiques observées sur son promoteur (augmentation de l'acétylation et de la méthylation des histones). *c-MYC* est au cœur du réseau de gènes « Cycle, morphologie, assemblage et organisation cellulaire » surexprimés lors du traitement avec la SAS pyrogénée NM-203 (**Figure 31**). Expérimentalement, il a été montré que *c-MYC* peut induire, de façon indirecte, l'acétylation des histones H3 et H4 (Neri et al., 2012). Pourtant, (Seidel et al., 2017) n'ont pas observé d'augmentation significative de l'acétylation globale de ces histones dans les cellules Bhas 42 après traitement des cellules avec la SAS pyrogénée NM-203. Une surexpression de *c-MYC* a également été observée suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la silice cristalline Min-U-Sil 5[®]. L'induction de la surexpression de *c-MYC* pourrait être un des mécanismes communs de la transformation cellulaire induite par les SAS et les silices cristallines. Le TPA, quant à lui, n'entraîne pas une surexpression de *c-MYC*. Ceci est en accord avec le fait qu'un traitement de la lignée cellulaire épithéliale de la vessie humaine ou des cellules BALB/c 3T3 avec le TPA, n'induit pas une surexpression du gène *c-MYC* (Ao et al., 2010; Skouv et al., 1986). Ces résultats suggèrent que la transformation des cellules Bhas 42 induite par le TPA ne passe pas par la modification de l'expression du proto-oncogène *c-MYC*.

6. Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203

La SAS pyrogénée NM-203 à la dose de 2 µg/cm² module l'expression de gènes après 48h de traitement alors que cette dose n'est pas transformante en un seul traitement. Il est possible que cette variation de l'expression des gènes induite à 2 µg/cm² observée à 48h ne soit pas suffisante pour induire la transformation des cellules Bhas 42. L'effet dose observé est en accord avec les résultats de Pisani et

al., qui ont étudié l'effet dose de la SAS pyrogénée NM-203 avec les cellules A549. Ils ont réalisé une analyse transcriptomique dans des cellules exposées à différentes doses (0,1, 1,0, 1,5, 3,0 et 6,0 µg / cm²) pendant 24h et 72h. L'exposition a provoqué des modifications cellulaires et moléculaires importantes et ce, en fonction de la dose du traitement. A l'instar de nos résultats, la dose sans effet toxique observable (NOTEL) a été définie à 1,0 µg/cm² et la première dose entraînant les effets toxiques observables les plus faibles (LOTEL) a été déterminée à 1,5 µg/cm². De plus *via* une analyse IPA, Pisani et al., ont identifié les voies canoniques les plus pertinentes perturbées après une exposition de 24h et 72h à toutes les doses de nanoparticules. La LOTEL a entraîné l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'internalisation et l'externalisation de molécules. A 3,0 µg/cm², des voies impliquées dans l'inflammation ont été modifiées. Enfin, un stress oxydant a été observé à la dose la plus élevée (6,0 µg/cm²) (Pisani et al., 2015).

7. Signature des 12 gènes communs

En plus de leur rôle dans la prolifération (gènes sur-exprimés) ou l'adhésion cellulaire (gènes sous-exprimés) décrits dans le **Tableau 20**, le choix des 12 gènes s'est également justifié par leur implication dans la progression tumorale : la sur-expression de ***IL1RL1*** est effective dans des adénomes et des cellules tumorales d'un cancer du côlon humain (Cui et al., 2015; Fang et al., 2017; Liu et al., 2014). Cette augmentation de l'expression de ***IL1RL1*** est également observée dans nos conditions de traitement. L'expression de la famille de gènes ***PRL2C*** est augmentée dans les cellules de cancer de l'ovaire dérivées de l'épithélium de la trompe de Fallope (Karthikeyan et al., 2018). Dans la présente étude, ***PRL2C1***, ***PRL2C3*** et ***PRL2C5*** sont sur-exprimés après traitements des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA. Par ailleurs, les analyses transcriptomiques montrent une sur-expression de ***MCM10*** suite aux différents traitements transformants. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant que ***MCM10*** est sur-exprimé dans les médulloblastomes, les carcinomes urothéliaux, le cancer de la prostate et le cancer du sein (Cui et al., 2018; Li et al., 2016a; Mahadevappa et al., 2018; Senfter et al., 2017). ***AUNIP*** qui est également sur-exprimé et commun à nos trois conditions transformantes est sur-exprimé dans diverses tumeurs cérébrales (Lieu et al., 2010). Il a été identifié récemment en tant que biomarqueur de tests de pronostic et diagnostique pour le carcinome épidermoïde oral (Yang et al., 2019).

À l'inverse, les expressions de ***LUM***, ***POSTN***, ***SPARCL1***, ***LGALS7*** et ***TIMP4***, impliqués dans l'adhésion cellulaire, sont faibles dans divers cancers. En effet, la sous-expression de ***LGALS7*** observée suite au traitement des cellules Bhas 42 avec la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA a été également observée dans les cancers du col de l'utérus, des cervicales et de l'estomac (Higareda-Almaraz et al., 2016; Kim et al., 2013; Ueda et al., 2004). Le niveau d'expression de ***LUM*** est diminué dans diverses lignées de cellules cancéreuses humaines (Brézillon et al., 2013; Hagedorn et al., 2005; Yoshioka et al., 2000), ce qui est en accord avec la sous-expression de ***LUM*** observée dans nos conditions; ***POSTN***, sous-exprimé dans nos conditions, est sous-exprimé dans le cancer de la vessie et du poumon (Kim et al., 2005). Une faible expression de ***SPARCL1*** est associée à la progression tumorale dans les cancers de l'estomac, du sein et de la prostate chez l'homme (Cao et al.,

2013; Hurley et al., 2012; Li et al., 2012). De la même manière, la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et TPA induisent tous une sous-expression de *SPARCL1* dans les cellules Bhas 42. Il en est de même pour *TIMP4* dont l'expression diminue après traitement des cellules Bhas 42 avec différents agents transformants. Ce qui est en accord avec la faible expression de *TIMP4* observée dans les tumeurs malignes de la gaine nerveuse périphérique associées à une neurofibromatose de type 1 (Lévy et al., 2004). Enfin, la sur-expression de **SEMA3G** limite la progression des cellules de cancer du sein ou de mélanome, ou la migration et l'invasion de cellules de gliome (Kigel et al., 2008; Zhou et al., 2012). Fait intéressant, l'expression de **SEMA3G** a été diminuée dans nos conditions expérimentales et pourrait alors à l'inverse induire la progression, la migration et l'invasion des cellules.

Des modifications concomitantes des taux d'ARNm et de protéines de plusieurs gènes, tels que la galectine 7, la périostine ou la proliférine ont été observées. Cependant, la concordance entre les niveaux d'ARNm et de protéines n'a pas été systématiquement trouvée. Il est possible que les protéines aient subi des modifications post-traductionnelles conduisant à une instabilité ou à une dégradation de la protéine. Par exemple, une modification traductionnelle par ajout de séquences peptidiques ou protéiques telles que des protéines ubiquitines sur une ou plusieurs lysines peut conduire à la dégradation de la protéine (Ikeda and Dikic, 2008). A l'aide d'un anticorps dirigé contre les ubiquitines, nous pourrions alors détecter le taux d'ubiquitination des protéines par Western blot ou nous pourrions également étudier l'activité du protéasome par dosage de l'aminocoumaride par exemple, un substrat capable d'émettre une fluorescence lorsqu'il est clivé par le protéasome. Dans le cas de IL1RL1, le récepteur de l'IL-33, a été détecté dans toutes les conditions testées, avec de légères modifications du taux de protéines intracellulaires suite au traitement des cellules avec les différentes SAS, ce qui est en désaccord avec les modulations de l'expression des ARNm mesurées. Par ailleurs, un peptide d'IL1RL1, appelé récepteur leurre, peut être sécrété dans le but de séquestrer IL-33 et d'empêcher sa fixation sur son récepteur et donc entraîner une inactivation de la voie de signalisation (Hardman and Ogg, 2016; Lingel et al., 2009). La protéine intracellulaire MCM10, essentielle durant les phases d'initiation et d'élongation de la réplication chromosomique (Warren et al., 2009) a également été détectée, mais nous n'avons pas observé de changement significatif au niveau du taux protéique, quel que soit le traitement testé, comme le laissait prévoir l'augmentation de l'ARNm *MCM10*. Cette absence de changement au niveau du taux protéique de MCM10 pourrait être lié au choix du plan expérimental du test de transformation, car au début du traitement, les cellules Bhas 42 sont dans une phase de division jusqu'à l'analyse, maintenant un taux élevé de protéines MCM10 nécessaire à la synthèse de l'ADN (Warren et al., 2009). Au vu des résultats obtenus par l'analyse protéique, la mise en place d'un test de criblage pour l'évaluation des stades précoces de la transformation cellulaire induite par des agents chimiques basée sur la méthode de RT-qPCR semble être plus pertinente.

La cinétique d'expression des 12 gènes montre une induction précoce des gènes *IL1RL1B* (3h), *IL1RL1B* (6h) et *PRL2C1*, *PRL2C3*, *PRL2C5*, *IL1RL1B* (12h). La quasi-totalité des gènes sont modulés après 24h de traitement, à l'exception de *AUNIP* et *MCM10*, pour lesquels l'augmentation de l'expression n'est observée qu'à partir de 48h d'exposition. *AUNIP* et *MCM10* étant impliqués dans la réplication de l'ADN (Chattopadhyay and Bielskiy, 2007; Lieu et al., 2010), il était légitime de penser que la modulation de l'expression de ces gènes soit observée à des temps plus courts. En ce qui

concerne les gènes *POSTN*, *TIMP4*, *LUM*, *LGALS7*, *SPARCL1* et *SEMA3G*, une diminution significative de l'expression de ces gènes est observable uniquement à partir de 24h d'exposition. Des résultats similaires ont été publiés par Parfett et al, qui ont montré une induction dès 16h après traitement avec le TPA des gènes de la famille des *PRL2C* dans la peau de souris. De même, Gerecke et al ont mis en évidence une sur-expression du gène *IL1RL1* chez des souris dès 24h post-exposition au sulfure d'éthyle dichloré (gaz moutarde) (Gerecke et al., 2009; Parfett, 2005). Dans l'étude de (Parfett, 2005), le niveau d'expression des gènes *PRL2C1*, *PRL2C3*, *PRL2C5* et *IL1RL1B* atteignait un pic à 24h d'exposition pour ensuite diminuer après 48h d'exposition. D'un point de vue pratique, un test de criblage sur 10 gènes (en retirant *AUNIP* et *MCM10*) pourrait être utilisé dès 24h post-traitement au lieu de 48h.

Les résultats que nous avons obtenus avec ces 12 gènes ne correspondent pas toujours avec ceux de la littérature. En effet, une sur-expression de *LGALS7* augmente la prolifération et la migration cellulaire dans le cancer du sein, des ovaires et des mélanomes malins (Biron-Pain et al., 2013; Demers et al., 2010; Kim et al., 2013; Labrie et al., 2014). De même, une sur-expression du gène *POSTN* a été associée au cancer du poumon et à la formation de neuroblastomes (Sasaki et al., 2001, 2002). Ce qui signifie que selon le type de cancer, une sous-expression ou une sur-expression des gènes *LGALS7* ou de *POSTN* conduit aux mêmes effets cellulaires, à savoir une prolifération et migration cellulaires. Dans le cas des cellules Bhas 42, nous émettons l'hypothèse selon laquelle la sous-expression des gènes *LGALS7* et *POSTN* conduit à une perte d'adhésion cellulaire. De plus, la modification de l'expression des 12 gènes communs peut être également associée à d'autres pathologies que le cancer. En effet, une sur-expression de *IL1RL1* peut être observée dans différentes maladies telles que l'asthme, la dyspnée, la septicémie, l'infarctus du myocarde et le psoriasis (Ali et al., 2009; Benoit et al., 2013; Brunner et al., 2004; Gudbjartsson et al., 2009; Inoue et al., 2017; Meehansan et al., 2013; Shimpo et al., 2004). Une sous-expression de *LUM* induit une fragilité de la peau ainsi qu'une opacité de la cornée (Chakravarti et al., 1998). Une sur-expression de *POSTN* est observée dans diverses maladies telles que l'asthme, l'arthrose, l'hypertrophie ventriculaire, la fibrose cardiaque et le disfonctionnement cardiaque (Chijimatsu et al., 2015; Katsuragi et al., 2004; Pohjolainen et al., 2012; Woodruff et al., 2007). Une sous-expression de *SEMA3G* est observée dans des tissus synoviaux de patients arthritiques (Tang et al., 2018). Une sous-expression de *SPARCL1* semble être impliquée dans l'accélération de l'apparition des symptômes de la maladie d'Alzheimer et une sous expression de ce gène a été observée chez des patients atteints de schizophrénie (Kähler et al., 2008; Seddighi et al., 2018). Enfin, une sous-expression de *TIMP4* serait impliquée dans la diminution de l'obésité sûrement provoquée par une mauvaise absorption des lipides tandis qu'une sur-expression de ce gène aurait un rôle dans les processus inflammatoires de pathologies cardiovasculaires humaines telle que l'athérosclérose (Koskivirta et al., 2006; Sakamuri et al., 2017).

En revanche, les résultats rapportés dans cette thèse sont en accord avec différentes études transcriptomiques qui ont utilisé la lignée cellulaire BALB/c 3T3 dans le contexte du test de transformation (Maeshima et al., 2009; Rohrbeck et al., 2010). De plus, *LUM*, *MCM10*, *LGALS7* et *IL1RL1* sont associés à la toxicité des SAS. Par exemple, *IL1RL1* s'est révélé être impliqué dans l'activation de l'inflammasome induite par une silice cristalline dans les cellules BEAS-2B et dans les

cellules épithéliales bronchiques humaines primaires (Perkins et al., 2015). Une augmentation de l'expression de *IL1RL1* a été observée dans les cellules RAW 264, 7 traitées avec des SAS (10 ou 300 nm) (McDermott et al., 2011). Une sur-expression de *LUM*, *LGALS7* et *MCM10* a été montrée dans la lignée de cellules épithéliales basales alvéolaires humaines adénocarcinomiques (cellules A549) traitées avec la SAS pyrogénée NM-203 (Pisani et al., 2015). De plus, des variations de l'expression des gènes liés au cycle cellulaire ou à l'adhésion cellulaire ont été découvertes suite au traitement de la lignée cellulaire épithéliale du poumon FE1 exposée à des SAS de 12, 15 et 20 nm (Decan et al., 2016). En utilisant le modèle de transformation cellulaire BALB/c 3T3, (Rohrbeck et al., 2010) ont observé une augmentation de l'expression de *IL1RL1* suite au traitement des cellules avec 4 agents chimiques dont le MCA, parmi les 41 gènes communs aux 4 agents testés. Par ailleurs, le traitement des cellules avec le MCA était associé à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion à la matrice cellulaire, tels que *POSTN* et *SPARCL1*, associée à la croissance tumorale et aux métastases. Fait intéressant, l'augmentation des taux d'ARNm de *PRL2C3*, codant pour la proliférine, a été observée suite à un test de transformation réalisé avec des cellules BALB/c 3T3 (Maeshima et al., 2009, 2010) et avec des cellules C3H/10T1/2 (Parfett et al., 1996, 2000) traités avec divers produits chimiques, y compris des particules de silice amorphes (gel de silice de 5 µm) et le TPA. L'expression de la proliférine est considérée comme un biomarqueur prédictif de la transformation cellulaire (Maeshima et al., 2009, 2010). De façon intéressante, l'expression de ces gènes varie suite à un traitement avec différents produits chimiques.

Dans notre étude, la signature des 12 gènes a été recherchée pour trois autres SAS précipitées NM-200, NM-201 et pyrogénée NM-202 (Figure 33). Des modifications d'expression de chaque gène ont été retrouvées à l'exception de la SAS pyrogénée NM-201, comme le laissait présager l'absence d'effets transformants dans les conditions à un traitement.

Au vu de ces résultats, nous pourrions tester la validité de notre test sur les cellules Bhas 42 avec d'autres SAS, mais également avec différents agents chimiques transformants.

8. Avantages et limites de l'utilisation du test de transformation et du modèle Bhas 42

L'étude transcriptomique a permis d'obtenir les premières informations concernant les signatures moléculaires induites par la SAS pyrogénée NM-203. Une signature de 12 gènes communs peut être considérée comme des biomarqueurs potentiels de la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS précipitée NM-200, les SAS pyrogénées NM-202 et NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5® et le TPA. Le modèle Bhas 42 est un modèle pertinent pour étudier le potentiel transformant de divers agents chimiques. Mais comme tout modèle *in vitro*, il a ses limites. En effet, les tests *in vitro* permettent d'évaluer le danger des agents chimiques dans un contexte biologique qui ne prend pas en compte la complexité du fonctionnement de l'organisme, des diverses interactions entre les cellules et les organes. Il est donc difficile d'extrapoler les résultats de ces tests à l'Homme et de simuler entièrement les expositions *in vivo*. La crédibilité d'une étude *in vitro* est améliorée lorsque les mêmes effets sont aussi démontrés *in vivo*. Ainsi, il peut être intéressant de valider le modèle Bhas 42 en inoculant des foyers

transformés à des souris afin de vérifier la formation de tumeurs. (Sasaki et al., 2015) ont rapporté dans un article de revue que l'inoculation de foyers transformés induit par le TPA à des souris entraîne la formation de tumeurs, mais ces résultats n'ont pas été montrés. Par ailleurs, bien que les tests de transformation présentent une bonne corrélation avec les données des essais biologiques sur les rongeurs, les préoccupations concernant la nature subjective de l'utilisation de critères morphologiques pour identifier les cellules transformées et le manque de compréhension des bases mécanistiques des essais de transformation ont limité leur utilisation à des fins réglementaires (Creton et al., 2012). Si l'on veut parvenir à une adoption par les systèmes internationaux d'essais de sécurité réglementaires, il est nécessaire de poursuivre les recherches pour accroître l'objectivité de la notation et de la compréhension mécanistique. Notre étude permet en partie d'apporter les premières réponses à ces attentes. D'autre part, l'essai de transformation transférable à l'Homme serait celui qui utilise des cellules humaines. Cependant, des études montrent des différences de sensibilité des cellules humaines et des cellules de rongeurs à la transformation cellulaire induite par un oncogène ou un cancérigène (Rangarajan et al., 2004; Zhao et al., 2004). Par exemple, les cellules de rongeurs s'immortalisent plus facilement en raison de mutations spontanées dans des conditions de culture prolongées (De Silva and Reddel, 1993; Pang et al., 2008; Rangarajan and Weinberg, 2003). En effet, une culture prolongée de fibroblastes embryonnaires de souris aboutit à leur immortalisation spontanée alors qu'une culture prolongée des fibroblastes humains conduit plutôt à une quiescence cellulaire (Rangarajan and Weinberg, 2003). De plus, les cellules humaines diploïdes primaires acquièrent rarement une durée de vie infinie en culture. En outre, l'introduction d'une combinaison d'oncogènes tels que *MYC* + *RAS* induit facilement la transformation de cellules de rongeurs primaires, tandis que l'introduction de la même combinaison d'oncogènes ne parvient pas à transformer les cellules humaines primaires (Rangarajan and Weinberg, 2003). Cela sous-entend que les cellules animales sont plus sensibles que les cellules humaines à la transformation. Tout comme les tests de transformation sur les cellules animales, les tests de transformation sur les cellules humaines n'ont à ce jour pas été acceptés dans un cadre réglementaire.

Enfin, le modèle Bhas 42 permet de discriminer les effets initiateurs et promoteurs des agents testés, se positionnant ainsi comme un modèle intéressant pour approcher les effets moléculaires de la transformation cellulaire. Au regard des résultats obtenus de l'étude transcriptomique, l'essai de transformation sur les cellules Bhas 42 apparaît être un bon modèle permettant à la fois d'évaluer le potentiel transformant des agents chimiques et particuliers. Cependant, la poursuite des recherches est nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la transformation des cellules Bhas 42.

Chapitre VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Bien que plusieurs études *in vivo* et *in vitro* aient mis en évidence la toxicité des SAS, il existe peu de preuve de leur effet cancérigène possible. Les essais conventionnels de cancérogénèse *in vivo* sont longs et coûteux pour évaluer la très grande variété des SAS, c'est pourquoi le test de transformation sur les cellules Bhas 42 représente un outil de criblage *in vitro* utile pour évaluer en première intention le potentiel cancérigène des SAS. Le modèle Bhas 42 permet de discriminer les effets initiateurs et promoteurs des agents testés, il permet ainsi d'aiguiller les recherches sur les mécanismes initiaux impliqués dans la cancérogénèse. Le test de transformation permet à la fois d'étudier les phénotypes transformés et les premières modifications moléculaires subies par les cellules Bhas 42 traitées avec l'agent transformant.

Notre étude montre que la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203 (la SAS la plus transformante) est principalement liée à une augmentation de la prolifération cellulaire *via* la modification des voies de signalisation impliquées dans l'entrée des cellules en phase S, dans la réplication de l'ADN et dans la phase M du cycle cellulaire et à une perte d'adhésion cellulaire due à une diminution de l'expression de groupe de gènes impliqués dans ce mécanisme. D'autre part, nos analyses ont également révélé une possible réponse inflammatoire et des propriétés génotoxiques de la SAS pyrogénée NM-203 qui pourrait induire des dommages à l'ADN conduisant à l'activation des systèmes de réparation. En conséquence, il sera intéressant d'étudier les effets génotoxiques des différentes SAS sur les cellules Bhas 42 en réalisant notamment différents tests de génotoxicité tels que le test des comètes, le test des micronoyaux ou le test γ H2AX.

Les effets moléculaires induits par la SAS pyrogénée NM-203 sont communs à la silice cristalline Min- U-Sil 5[®] et au TPA. Cette convergence a permis d'identifier des biomarqueurs moléculaires de la transformation cellulaire, des biomarqueurs communs aux différents agents chimiques et qui permettent d'évaluer rapidement un potentiel transformant.

A ce stade, le test de criblage basé sur la méthode de RT-qPCR est plus accessible que l'analyse protéique. De plus, l'étude de la cinétique d'expression des 12 gènes a permis de constater que le test de criblage pourrait être raccourci à condition d'écarter les gènes AUNIP et MCM10 de la liste retenue. Ce test reposant sur cette nouvelle signature de 10 gènes développé au cours de cette thèse pourrait être encore plus rapide et devenir un outil précieux de détection d'agents chimiques transformants. Cette étude mérite d'être poursuivie mais d'ores et déjà, elle nous permet d'élaborer des hypothèses quant aux mécanismes d'action des SAS dans la transformation des cellules Bhas 42. Bien que tous les acteurs moléculaires n'aient pas encore été identifiés, nous proposons que les premières étapes de la transformation des cellules Bhas 42 nécessitent une augmentation de la prolifération cellulaire, *via* l'augmentation de l'expression des gènes *PRL2C* et de *IL1RL1* (**Figure 37**). Par ailleurs, la transformation des cellules Bhas 42 est également liée à une diminution de l'adhésion cellulaire *via* la diminution de l'expression des gènes *SPARCL1* et *POSTN*, à une désorganisation de la MEC, des interactions cellules-cellules et cellules-MEC due à une diminution de l'expression des gènes *LUM*, *LGALS7* et *TIMP4* et une augmentation de la migration cellulaire *via* la sous-expression du gène *SEMA3G*.

L'implication de ces gènes dans le pouvoir transformant des SAS pourrait être confirmée par inhibition de l'expression de gènes clés tels que les gènes *PRL2C1*, *PRL2C3* et *PRL2C5* (gènes dont l'expression est la plus modulée) par exemple grâce à un siRNA ou *via* la méthode CRISPR/Cas9 afin de vérifier si l'inhibition de l'expression de ces gènes empêche la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203. Enfin, il serait intéressant d'étudier la modulation de l'expression des gènes *CACNA1G*, *CMBL*, *ENPP2*, *GDPD2*, *HMGCS2*, *NLRP2*, *SGOL1*, *A230065H16Rik* pouvant également avoir un rôle clé dans la transformation cellulaire et approfondir les résultats obtenus pour *RAD51AP1*, un marqueur de la réparation de l'ADN souvent associé à des processus cancéreux.

Pour compléter l'ensemble de ces travaux, il sera nécessaire de confronter le test à une liste d'agents chimiques classés cancérigènes et non cancérigènes, par exemple ceux utilisés par (Sakai et al., 2010) pour la validation du test de transformation Bhas 42. Cette étude permettrait de vérifier la pertinence de la signature des 12 gènes quel que soit l'agent chimique évalué, et la pertinence du schéma mécanistique que nous proposons.

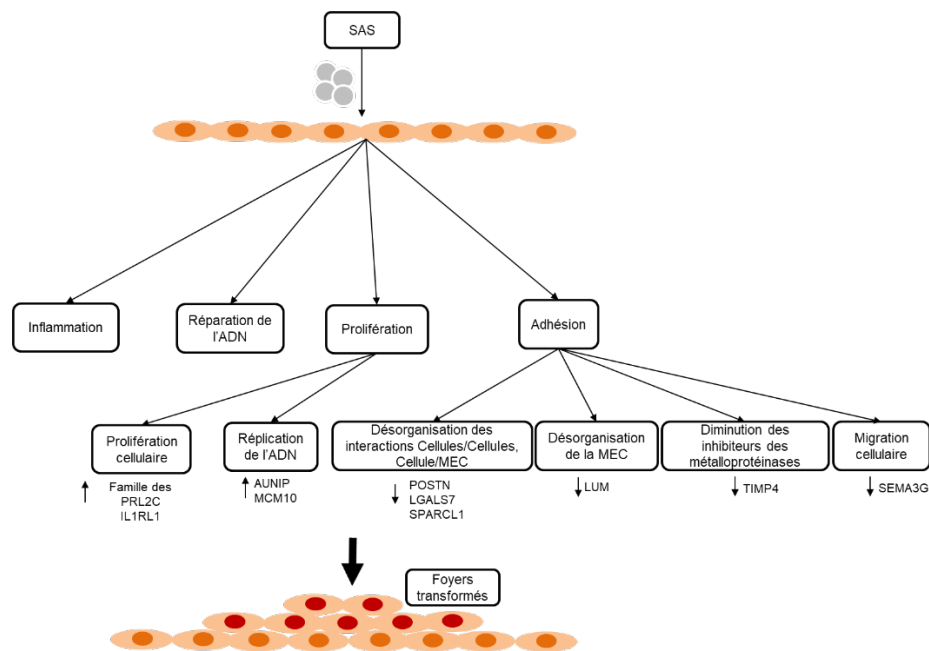


Figure 37 : Hypothèse des mécanismes impliqués dans la transformation des cellules Bhas 42 induite par les SAS.

Les premières étapes de la transformation cellulaire induite par les SAS ne sont pas dues à l'implication des mécanismes d'inflammation ou de stress oxydant mais nécessitent une modification des voies de signalisation impliquées dans la réparation de l'ADN et la prolifération cellulaire. Elles impliquent également une augmentation de la prolifération *via* la sur-expression des gènes de la famille des PRL2C et de IL1RL1, une désorganisation des interactions cellulaires et de la MEC *via* une sous-expression des gènes LGALS7, LUM, POSTN, SPARCL1, une diminution des inhibiteurs des métalloprotéinases tels que TIMP4 et une augmentation de la migration cellulaire *via* la sous-expression de SEMA3G.

Chapitre VII: REFERENCES

- Aaronson, S.A., and Todaro, G.J. (1968). Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J. Cell. Physiol.* 72, 141–148.
- Advedissian, T., Deshayes, F., Poirier, F., Grandjean, C., and Viguier, M. (2015). [Galectins, a class of unconventional lectins]. *Med. Sci. MS* 31, 499–505.
- Ahamed, M. (2013). Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 186–195.
- Ahmad, J., Ahamed, M., Akhtar, M.J., Alrokayan, S.A., Siddiqui, M.A., Musarrat, J., and Al-Khedhairy, A.A. (2012). Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 160–168.
- Akaogi, J., Nozaki, T., Satoh, M., and Yamada, H. (2006). Role of PGE2 and EP receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and as a novel therapeutic strategy. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 6, 383–394.
- Ali, M., Zhang, G., Thomas, W.R., McLean, C.J., Bizzantino, J.A., Laing, I.A., Martin, A.C., Goldblatt, J., Le Souëf, P.N., and Hayden, C.M. (2009). Investigations into the role of ST2 in acute asthma in children. *Tissue Antigens* 73, 206–212.
- Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M., and Melino, G. (2014). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 39, 191–198.
- Anses (2014). Evaluation des risques liés aux nanoparticules, Enjeux et mise à jour des connaissances. Anses Éditions 1–19.
- Antonov, A., Agostini, M., Morello, M., Minieri, M., Melino, G., and Amelio, I. (2014). Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. *Oncotarget* 5, 11004–11013.
- Ao, L., Liu, J.-Y., Liu, W.-B., Gao, L.-H., Hu, R., Fang, Z.-J., Zhen, Z.-X., Huang, M.-H., Yang, M.-S., and Cao, J. (2010). Comparison of gene expression profiles in BALB/c 3T3 transformed foci exposed to tumor promoting agents. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 24, 430–438.
- Arts, J.H.E., Muijser, H., Duistermaat, E., Junker, K., and Kuper, C.F. (2007). Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 45, 1856–1867.
- Asada, S., Sasaki, K., Tanaka, N., Takeda, K., Hayashi, M., and Umeda, M. (2005). Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutat. Res.* 588, 7–21.
- Asteriti, I.A., De Mattia, F., and Guarguaglini, G. (2015). Cross-Talk between AURKA and Plk1 in Mitotic Entry and Spindle Assembly. *Front. Oncol.* 5, 283.
- Athinarayanan, J., Periasamy, V.S., Alsaif, M.A., Al-Warthan, A.A., and Alshatwi, A.A. (2014). Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell Biol. Toxicol.* 30, 89–100.
- Barrett, J.C., and Ts'o, P.O. (1978). Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3761–3765.
- Barrett, J.C., Hesterberg, T.W., and Thomassen, D.G. (1984). Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 36, 53S-70S.

- Basaki, Y., Hosoi, F., Oda, Y., Fotovati, A., Maruyama, Y., Oie, S., Ono, M., Izumi, H., Kohno, K., Sakai, K., et al. (2007). Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. *Oncogene* 26, 2736–2746.
- Benigni, R., and Bossa, C. (2011). Alternative strategies for carcinogenicity assessment: an efficient and simplified approach based on in vitro mutagenicity and cell transformation assays. *Mutagenesis* 26, 455–460.
- Benigni, R., Bossa, C., and Tcheremenskaia, O. (2013). In vitro cell transformation assays for an integrated, alternative assessment of carcinogenicity: a data-based analysis. *Mutagenesis* 28, 107–116.
- Benoit, J.L., Hicks, C.W., Engineer, R.S., Hart, K.W., Lindsell, C.J., and Peacock, W.F. (2013). ST2 in emergency department patients with noncardiac dyspnea. *Acad. Emerg. Med. Off. J. Soc. Acad. Emerg. Med.* 20, 1207–1210.
- Berg, R.W., Leung, E., Gough, S., Morris, C., Yao, W.P., Wang, S.X., Ni, J., and Krissansen, G.W. (1999). Cloning and characterization of a novel beta integrin-related cDNA coding for the protein TIED (“ten beta integrin EGF-like repeat domains”) that maps to chromosome band 13q33: A divergent stand-alone integrin stalk structure. *Genomics* 56, 169–178.
- Bertram, J.S. (2000). The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.* 21, 167–223.
- Berwald, Y., and Sachs, L. (1963). IN VITRO CELL TRANSFORMATION WITH CHEMICAL CARCINOGENS. *Nature* 200, 1182–1184.
- Berwald, Y., and Sachs, L. (1965). In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 35, 641–661.
- Bharali, D.J., Klejbor, I., Stachowiak, E.K., Dutta, P., Roy, I., Kaur, N., Bergey, E.J., Prasad, P.N., and Stachowiak, M.K. (2005). Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11539–11544.
- Bhati, R., Gökmen-Polar, Y., Sledge, G.W., Fan, C., Nakshatri, H., Ketelsen, D., Borchers, C.H., Dial, M.J., Patterson, C., and Klauber-DeMore, N. (2007). 2-methoxyestradiol inhibits the anaphase-promoting complex and protein translation in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 67, 702–708.
- Bhattacharjee, S., de Haan, L.H.J., Evers, N.M., Jiang, X., Marcelis, A.T.M., Zuilhof, H., Rietjens, I.M.C.M., and Alink, G.M. (2010). Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 25.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Biron-Pain, K., Grosset, A.-A., Poirier, F., Gaboury, L., and St-Pierre, Y. (2013). Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas. *PloS One* 8, e63307.
- Blumberg, P.M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 48, 1–8.
- Brambilla, C., Brambilla, E., Rigaud, D., Perdrix, A., Paramelle, B., and Fourcy, A. (1980). [Pneumoconiosis due to amorphous silica smoke. Mineralogical and ultrastructural study of 6 cases (author’s transl)]. *Rev. Fr. Mal. Respir.* 8, 383–391.
- Brew, K., Dinakarandian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 267–283.
- Brézillon, S., Pietraszek, K., Maquart, F.-X., and Wegrowski, Y. (2013). Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins. *FEBS J.* 280, 2369–2381.

- Brotelle, T., and Bay, J.-O. (2016). La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. *Bull. Cancer (Paris)* 103, 18–29.
- Brunner, M., Krenn, C., Roth, G., Moser, B., Dworschak, M., Jensen-Jarolim, E., Spittler, A., Sautner, T., Bonaros, N., Wolner, E., et al. (2004). Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med.* 30, 1468–1473.
- Buzea, C., Pacheco, I.I., and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2, MR17-71.
- Cao, F., Wang, K., Zhu, R., Hu, Y.-W., Fang, W.-Z., and Ding, H.-Z. (2013). Clinicopathological significance of reduced SPARCL1 expression in human breast cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 14, 195–200.
- Casciello, F., Windloch, K., Gannon, F., and Lee, J.S. (2015). Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. *Front. Immunol.* 6, 487.
- Chakravarti, S., Magnuson, T., Lass, J.H., Jepsen, K.J., LaMantia, C., and Carroll, H. (1998). Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell Biol.* 141, 1277–1286.
- Chang, J.-S., Chang, K.L.B., Hwang, D.-F., and Kong, Z.-L. (2007). In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2064–2068.
- Chattopadhyay, S., and Bielinsky, A.-K. (2007). Human Mcm10 regulates the catalytic subunit of DNA polymerase- α and prevents DNA damage during replication. *Mol. Biol. Cell* 18, 4085–4095.
- Chemnitz, J.M., Driesen, J., Classen, S., Riley, J.L., Debey, S., Beyer, M., Popov, A., Zander, T., and Schultze, J.L. (2006). Prostaglandin E2 impairs CD4⁺ T cell activation by inhibition of I κ B: implications in Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 66, 1114–1122.
- Cheng, X. (2014). Structural and functional coordination of DNA and histone methylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Chijimatsu, R., Kunugiza, Y., Taniyama, Y., Nakamura, N., Tomita, T., and Yoshikawa, H. (2015). Expression and pathological effects of periostin in human osteoarthritis cartilage. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16, 215.
- Choi, A.O., Brown, S.E., Szyf, M., and Maysinger, D. (2008). Quantum dot-induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 86, 291–302.
- Chon, J., Stover, P.J., and Field, M.S. (2017). Targeting Nuclear Thymidylate Biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 53, 48–56.
- Chu, E.H., and Malling, H.V. (1968). Mammalian cell genetics. II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61, 1306–1312.
- Clemens, M.J., Trayner, I., and Menaya, J. (1992). The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 4), 881–887.
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2004, RE13.
- Combes, R., Balls, M., Curren, R., Fischbach, M., Fusenig, N., Kirkland, D., Lasne, C., Landolph, J., LeBoeuf, R., Marquardt, H., et al. (1999). Cell transformation assays as predictors of human carcinogenicity. *Altern. Lab. Anim. ATLA* 27, 745–767.

- Corda, D., Kudo, T., Zizza, P., Iurisci, C., Kawai, E., Kato, N., Yanaka, N., and Marigliò, S. (2009). The developmentally regulated osteoblast phosphodiesterase GDE3 is glycerophosphoinositol-specific and modulates cell growth. *J. Biol. Chem.* *284*, 24848–24856.
- Corvi, R., Aardema, M.J., Gribaldo, L., Hayashi, M., Hoffmann, S., Schechtman, L., and Vanparys, P. (2012). ECVAM prevalidation study on in vitro cell transformation assays: general outline and conclusions of the study. *Mutat. Res.* *744*, 12–19.
- Cox, A.D., and Der, C.J. (2010). Ras history. *Small GTPases* *1*, 2–27.
- Creton, S., Aardema, M.J., Carmichael, P.L., Harvey, J.S., Martin, F.L., Newbold, R.F., O'Donovan, M.R., Pant, K., Poth, A., Sakai, A., et al. (2012). Cell transformation assays for prediction of carcinogenic potential: state of the science and future research needs. *Mutagenesis* *27*, 93–101.
- Cui, F., Hu, J., Ning, S., Tan, J., and Tang, H. (2018). Overexpression of MCM10 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in prostate cancer. *The Prostate* *78*, 1299–1310.
- Cui, G., Qi, H., Gundersen, M.D., Yang, H., Christiansen, I., Sørbye, S.W., Goll, R., and Florholmen, J. (2015). Dynamics of the IL-33/ST2 network in the progression of human colorectal adenoma to sporadic colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *64*, 181–190.
- Darne, C., Coulais, C., Terzetti, F., Fontana, C., Binet, S., Gaté, L., and Guichard, Y. (2016). In vitro comet and micronucleus assays do not predict morphological transforming effects of silica particles in Syrian Hamster Embryo cells. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* *796*, 23–33.
- De Jong, W.H., Hagens, W.I., Krystek, P., Burger, M.C., Sips, A.J.A.M., and Geertsma, R.E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* *29*, 1912–1919.
- De Silva, R., and Reddel, R.R. (1993). Similar simian virus 40-induced immortalization frequency of fibroblasts and epithelial cells from human large airways. *Cell. Mol. Biol. Res.* *39*, 101–110.
- Decan, N., Wu, D., Williams, A., Bernatchez, S., Johnston, M., Hill, M., and Halappanavar, S. (2016). Characterization of in vitro genotoxic, cytotoxic and transcriptomic responses following exposures to amorphous silica of different sizes. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* *796*, 8–22.
- Dekkers, S., Krystek, P., Peters, R.J.B., Lankveld, D.P.K., Bokkers, B.G.H., van Hoeven-Arentzen, P.H., Bouwmeester, H., and Oomen, A.G. (2011). Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* *5*, 393–405.
- Deltour, S., Chopin, V., and Leprince, D. (2005). [Epigenetics and cancer]. *Médecine Sci. MS* *21*, 405–411.
- Demers, M., Rose, A.A.N., Grosset, A.-A., Biron-Pain, K., Gaboury, L., Siegel, P.M., and St-Pierre, Y. (2010). Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *Am. J. Pathol.* *176*, 3023–3031.
- Demir, E., and Castranova, V. (2016). Genotoxic effects of synthetic amorphous silica nanoparticles in the mouse lymphoma assay. *Toxicol. Rep.* *3*, 807–815.
- Denayer, E., de Ravel, T., and Legius, E. (2008). Clinical and molecular aspects of RAS related disorders. *J. Med. Genet.* *45*, 695–703.
- Denis, H., Ndlovu, M.N., and Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.* *12*, 647–656.
- DePamphilis, M.L. (2003). The “ORC cycle”: a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene* *310*, 1–15.

- Dhalluin, S., Gate, L., Vasseur, P., Tapiero, H., and Nguyen-Ba, G. (1997). Dysregulation of ornithine decarboxylase activity, apoptosis and Bcl-2 oncoprotein in Syrian hamster embryo cells stage-exposed to di(2-ethylhexyl)phthalate and tetradecanoylphorbol acetate. *Carcinogenesis* 18, 2217–2223.
- Di Cristo, L., Movia, D., Bianchi, M.G., Allegri, M., Mohamed, B.M., Bell, A.P., Moore, C., Pinelli, S., Rasmussen, K., Riego-Sintes, J., et al. (2016). Proinflammatory Effects of Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica Nanoparticles in Innate Immunity Cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 150, 40–53.
- DiGiovanni, J. (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol. Ther.* 54, 63–128.
- Doisneau-Sixou, S.F., Sergio, C.M., Carroll, J.S., Hui, R., Musgrove, E.A., and Sutherland, R.L. (2003). Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 179–186.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11–22.
- Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G.J., Hammel, M., Yu, X., Galkin, V.E., Liu, D., Tsai, M.-S., et al. (2010). Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1255–1259.
- Duncan, M.E., and Brookes, P. (1973). The induction of azaguanine-resistant mutants in cultured Chinese hamster cells by reactive derivatives of carcinogenic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 21, 107–118.
- Dyson, N.J. (2016). RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev.* 30, 1492–1502.
- Dziegielewska, B., Brautigan, D.L., Larner, J.M., and Dziegielewski, J. (2014). T-Type Ca²⁺ Channel Inhibition Induces p53-Dependent Cell Growth Arrest and Apoptosis through Activation of p38-MAPK in Colon Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* 12, 348–358.
- Elder, A., Gelein, R., Silva, V., Feikert, T., Opanashuk, L., Carter, J., Potter, R., Maynard, A., Ito, Y., Finkelstein, J., et al. (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ. Health Perspect.* 114, 1172–1178.
- Elias, Z., Poirot, O., Pezerat, H., Suquet, H., Schneider, O., Danière, M.C., Terzetti, F., Baruthio, F., Fournier, M., and Cavelier, C. (1989). Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 10, 2043–2052.
- Elias, Z., Poirot, O., Fenoglio, I., Ghiazza, M., Danière, M.-C., Terzetti, F., Darne, C., Coulais, C., Matekovits, I., and Fubini, B. (2006). Surface reactivity, cytotoxic, and morphological transforming effects of diatomaceous Earth products in Syrian hamster embryo cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 91, 510–520.
- Eom, H.-J., and Choi, J. (2009). Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 23, 1326–1332.
- EU (2003). Directive 2003/15/EC of the European Parliament and the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Off. J. Eur. Union* L66 26–35.
- Fang, M., Li, Y., Huang, K., Qi, S., Zhang, J., Zgodzinski, W., Majewski, M., Wallner, G., Gozdz, S., Macek, P., et al. (2017). IL33 Promotes Colon Cancer Cell Stemness via JNK Activation and Macrophage Recruitment. *Cancer Res.* 77, 2735–2745.
- Fassett, J.T., Hamilton, R.T., and Nilsen-Hamilton, M. (2000). Mrp4, a new mitogen-regulated protein/proliferin gene; unique in this gene family for its expression in the adult mouse tail and ear. *Endocrinology* 141, 1863–1871.
- Ferreira, B.I., Alonso, J., Carrillo, J., Acquadro, F., Largo, C., Suela, J., Teixeira, M.R., Cerveira, N., Molares, A., Gómez-López, G., et al. (2008). Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct

- genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 27, 2084–2090.
- Fisher, P.B., Flamm, M., Schachter, D., and Weinstein, I.B. (1979). Tumor promoters induce membrane changes detected by fluorescence polarization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 1063–1068.
- Flores, I., Murphy, D.J., Swigart, L.B., Knies, U., and Evan, G.I. (2004). Defining the temporal requirements for Myc in the progression and maintenance of skin neoplasia. *Oncogene* 23, 5923–5930.
- Fontana, C., Kirsch, A., Seidel, C., Marpeaux, L., Darne, C., Gaté, L., Remy, A., and Guichard, Y. (2017). In vitro cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles. *Mutat. Res.* 823, 22–27.
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 7, 5577–5591.
- Fubini, B., and Hubbard, A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1507–1516.
- Fujii, T., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Nakashima, K., Nakano, K., Shirouzu, K., Kohno, K., Yanagawa, T., Yamana, H., et al. (2008). Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers. *Cancer Res.* 68, 1504–1512.
- Furukawa, T., Kanai, N., Shiwaku, H.O., Soga, N., Uehara, A., and Horii, A. (2006). AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic cancer. *Oncogene* 25, 4831–4839.
- Gachechiladze, M., Škarda, J., Soltermann, A., and Joerger, M. (2017). RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies. *Int. J. Cancer* 141, 1286–1294.
- Gaudin, D., Gregg, R.S., and Yielding, K.L. (1971). DNA repair inhibition: a possible mechanism of action of co-carcinogens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 630–636.
- Gazzano, E., Ghiazza, M., Polimeni, M., Bolis, V., Fenoglio, I., Attanasio, A., Mazzucco, G., Fubini, B., and Ghigo, D. (2012). Physicochemical determinants in the cellular responses to nanostructured amorphous silicas. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 128, 158–170.
- Gehrke, H., Frühmesser, A., Pelka, J., Esselen, M., Hecht, L.L., Blank, H., Schuchmann, H.P., Gerthsen, D., Marquardt, C., Diabaté, S., et al. (2013). In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology* 7, 274–293.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Hof, V.I., Heyder, J., and Gehr, P. (2005). Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 1555–1560.
- Gerecke, D.R., Chen, M., Isukapalli, S.S., Gordon, M.K., Chang, Y.-C., Tong, W., Androulakis, I.P., and Georgopoulos, P.G. (2009). Differential gene expression profiling of mouse skin after sulfur mustard exposure: Extended time response and inhibitor effect. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 156–165.
- Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., and Schins, R.P.F. (2009). Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology* 3, 355–364.
- Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028–1032.
- Gillan, L., Matei, D., Fishman, D.A., Gerbin, C.S., Karlan, B.Y., and Chang, D.D. (2002). Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res.* 62, 5358–5364.
- Gong, C., Tao, G., Yang, L., Liu, J., Liu, Q., and Zhuang, Z. (2010). SiO₂ nanoparticles induce global genomic hypomethylation in HaCaT cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 397–400.

Gong, C., Tao, G., Yang, L., Liu, J., He, H., and Zhuang, Z. (2012). The role of reactive oxygen species in silicon dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells. *Mol. Biol. Rep.* 39, 4915–4925.

Griesenauer, B., and Paczesny, S. (2017). The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 8.

Gudbjartsson, D.F., Bjornsdottir, U.S., Halapi, E., Helgadottir, A., Sulem, P., Jonsdottir, G.M., Thorleifsson, G., Helgadottir, H., Steinthorsdottir, V., Stefansson, H., et al. (2009). Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat. Genet.* 41, 342–347.

Guichard, Y., Maire, M.-A., Sébillaud, S., Fontana, C., Langlais, C., Micillino, J.-C., Darne, C., Roszak, J., Stępnik, M., Fessard, V., et al. (2015). Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 2: intratracheal instillation and intravenous injection. *Environ. Mol. Mutagen.* 56, 228–244.

Guichard, Y., Fontana, C., Chavinier, E., Terzetti, F., Gaté, L., Binet, S., and Darne, C. (2016a). Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line. *Toxicol. Ind. Health* 32, 1639–1650.

Guichard, Y., Fontana, C., Chavinier, E., Terzetti, F., Gaté, L., Binet, S., and Darne, C. (2016b). Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line. *Toxicol. Ind. Health* 32, 1639–1650.

Guo, C., Wang, J., Yang, M., Li, Y., Cui, S., Zhou, X., Li, Y., and Sun, Z. (2017). Amorphous silica nanoparticles induce malignant transformation and tumorigenesis of human lung epithelial cells via P53 signaling. *Nanotoxicology* 11, 1176–1194.

Hagedorn, M., Javerzat, S., Gilges, D., Meyre, A., de Lafarge, B., Eichmann, A., and Bikfalvi, A. (2005). Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1643–1648.

Hakuno, D., Kimura, N., Yoshioka, M., Mukai, M., Kimura, T., Okada, Y., Yozu, R., Shukunami, C., Hiraki, Y., Kudo, A., et al. (2010). Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *J. Clin. Invest.* 120, 2292–2306.

Halappanavar, S., Jackson, P., Williams, A., Jensen, K.A., Hougaard, K.S., Vogel, U., Yauk, C.L., 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. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 425–439.

Halappanavar, S., Saber, A.T., Decan, N., Jensen, K.A., Wu, D., Jacobsen, N.R., Guo, C., Rogowski, J., Koponen, I.K., Levin, M., et al. (2015). Transcriptional profiling identifies physicochemical properties of nanomaterials that are determinants of the in vivo pulmonary response. *Environ. Mol. Mutagen.* 56, 245–264.

Halevy, O., Rodel, J., Peled, A., and Oren, M. (1991). Frequent p53 mutations in chemically induced murine fibrosarcoma. *Oncogene* 6, 1593–1600.

Hambrock, H.O., Nitsche, D.P., Hansen, U., Bruckner, P., Paulsson, M., Maurer, P., and Hartmann, U. (2003). SC1/hevin. An extracellular calcium-modulated protein that binds collagen I. *J. Biol. Chem.* 278, 11351–11358.

Hardman, C., and Ogg, G. (2016). Interleukin-33, friend and foe in type-2 immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 42, 16–24.

Harris, C.C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 51, 5023s–5044s.

- Hashimoto, M., and Imazato, S. (2015). Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* *31*, 556–564.
- Higareda-Almaraz, J.C., Ruiz-Moreno, J.S., Klimentova, J., Barbieri, D., Salvador-Gallego, R., Ly, R., Valtierra-Gutierrez, I.A., Dinsart, C., Rabinovich, G.A., Stulik, J., et al. (2016). Systems-level effects of ectopic galectin-7 reconstitution in cervical cancer and its microenvironment. *BMC Cancer* *16*, 680.
- Hillyer, J.F., and Albrecht, R.M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* *90*, 1927–1936.
- Hirsch, L.R., Stafford, R.J., Bankson, J.A., Sershen, S.R., Rivera, B., Price, R.E., Hazle, J.D., Halas, N.J., and West, J.L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13549–13554.
- Hobbs, G.A., Der, C.J., and Rossman, K.L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J. Cell Sci.* *129*, 1287–1292.
- Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L.F., and Kudo, A. (1999). Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *14*, 1239–1249.
- Horiuchi, K., Umetani, M., Minami, T., Okayama, H., Takada, S., Yamamoto, M., Aburatani, H., Reid, P.C., Housman, D.E., Hamakubo, T., et al. (2006). Wilms' tumor 1-associating protein regulates G2/M transition through stabilization of cyclin A2 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 17278–17283.
- Hou, W., and Syn, W.-K. (2018). Role of Metabolism in Hepatic Stellate Cell Activation and Fibrogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* *6*.
- Hsiao, I.-L., and Huang, Y.-J. (2011). Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci. Total Environ.* *409*, 1219–1228.
- Hsiao, W.L., Wu, T., and Weinstein, I.B. (1986). Oncogene-induced transformation of a rat embryo fibroblast cell line is enhanced by tumor promoters. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 1943–1950.
- Huang, W., Li, W.Q., Dehnade, F., and Zafarullah, M. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *J. Cell. Biochem.* *85*, 295–303.
- Hurley, P.J., Marchionni, L., Simons, B.W., Ross, A.E., Peskoe, S.B., Miller, R.M., Erho, N., Vergara, I.A., Ghadessi, M., Huang, Z., et al. (2012). Secreted protein, acidic and rich in cysteine-like 1 (SPARCL1) is down regulated in aggressive prostate cancers and is prognostic for poor clinical outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 14977–14982.
- IARC (1997). Silica, some silicates, coal dust and para-Aramid fibrils (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 68).
- ICRP (1994). Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. *Ann. ICRP* *24*, 1–482.
- Ikeda, F., and Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. "Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects" review series. *EMBO Rep.* *9*, 536–542.
- Inoue, H., Ito, I., Niimi, A., Matsumoto, H., Oguma, T., Tajiri, T., Iwata, T., Nagasaki, T., Kanemitsu, Y., Morishima, T., et al. (2017). Association of interleukin 1 receptor-like 1 gene polymorphisms with eosinophilic phenotype in Japanese adults with asthma. *Respir. Investig.* *55*, 338–347.
- INRS (2013). Dioxyde de titane. Fiche Toxicol. N°291 1–14.

- Institut de veille sanitaire (2010). Éléments techniques sur l'exposition professionnelle aux poussières alvéolaires de silice cristalline libre. *Santé Trav.* 1–18.
- Ishizuka, T., Fujimori, I., Kato, M., Noji-Sakikawa, C., Saito, M., Yoshigae, Y., Kubota, K., Kurihara, A., Izumi, T., Ikeda, T., et al. (2010). Human carboxymethylenebutenolidase as a bioactivating hydrolase of olmesartan medoxomil in liver and intestine. *J. Biol. Chem.* 285, 11892–11902.
- Jackson, D., Volpert, O.V., Bouck, N., and Linzer, D.I. (1994). Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science* 266, 1581–1584.
- Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J., and Florence, A.T. (1989). The uptake and translocation of latex nanospheres and microspheres after oral administration to rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 41, 809–812.
- Jepsen, K.J., Wu, F., Peragallo, J.H., Paul, J., Roberts, L., Ezura, Y., Oldberg, A., Birk, D.E., and Chakravarti, S. (2002). A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 277, 35532–35540.
- Johnston, C.J., Driscoll, K.E., Finkelstein, J.N., Baggs, R., O'Reilly, M.A., Carter, J., Gelein, R., and Oberdörster, G. (2000). Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 56, 405–413.
- Kähler, A.K., Djurovic, S., Kulle, B., Jönsson, E.G., Agartz, I., Hall, H., Opjordsmoen, S., Jakobsen, K.D., Hansen, T., Melle, I., et al. (2008). Association analysis of schizophrenia on 18 genes involved in neuronal migration: MDGA1 as a new susceptibility gene. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* 147B, 1089–1100.
- Kakunaga, T., and Crow, J.D. (1980). Cell variants showing differential susceptibility to ultraviolet light-induced transformation. *Science* 209, 505–507.
- Karayan-Tapon, L., Wager, M., Guilhot, J., Levillain, P., Marquant, C., Clarhaut, J., Potiron, V., and Roche, J. (2008). Semaphorin, neuropilin and VEGF expression in glial tumours: SEMA3G, a prognostic marker? *Br. J. Cancer* 99, 1153–1160.
- Karthikeyan, S., Russo, A., Dean, M., Lantvit, D.D., Endsley, M., and Burdette, J.E. (2018). Prolactin signaling drives tumorigenesis in human high grade serous ovarian cancer cells and in a spontaneous fallopian tube derived model. *Cancer Lett.* 433, 221–231.
- Katsuragi, N., Morishita, R., Nakamura, N., Ochiai, T., Taniyama, Y., Hasegawa, Y., Kawashima, K., Kaneda, Y., Ogihara, T., and Sugimura, K. (2004). Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation. *Circulation* 110, 1806–1813.
- Khan, A.Q., Khan, R., Qamar, W., Lateef, A., Rehman, M.U., Tahir, M., Ali, F., Hamiza, O.O., Hasan, S.K., and Sultana, S. (2013). Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced oxidative stress and inflammation in mouse skin: possible role of p38 MAP Kinase and NF-κB. *Exp. Mol. Pathol.* 94, 419–429.
- Khurana, S., Schouteden, S., Manesia, J.K., Santamaria-Martínez, A., Huelsken, J., Lacy-Hulbert, A., and Verfaillie, C.M. (2016). Outside-in integrin signalling regulates haematopoietic stem cell function via Periostin-Ilgav axis. *Nat. Commun.* 7.
- Kigel, B., Varshavsky, A., Kessler, O., and Neufeld, G. (2008). Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells. *PLoS One* 3, e3287.
- Kim, C.J., Yoshioka, N., Tambe, Y., Kushima, R., Okada, Y., and Inoue, H. (2005). Periostin is down-regulated in high grade human bladder cancers and suppresses in vitro cell invasiveness and in vivo metastasis of cancer cells. *Int. J. Cancer* 117, 51–58.

- Kim, S., Han, J., Kim, N.-Y., Lee, S.K., Cho, D.H., Choi, M.-Y., Kim, J.S., Kim, J.-H., Choe, J.-H., Nam, S.J., et al. (2012). Effect of berberine on p53 expression by TPA in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 27, 210–215.
- Kim, S.-J., Hwang, J.-A., Ro, J.Y., Lee, Y.-S., and Chun, K.-H. (2013). Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer. *Oncotarget* 4, 1461–1471.
- Kim, Y.W., Hur, S.Y., Kim, T.E., Lee, J.M., Namkoong, S.E., Kim, I.-K., and Kim, J.W. (2001). Protein kinase C modulates telomerase activity in human cervical cancer cells. *Exp. Mol. Med.* 33, 156–163.
- Kirsch, A. (2016). Implication des mécanismes épigénétiques dans le potentiel cancérigène des nanomatériaux. Master 2 INRS Univ. Lorraine.
- Kirsch, A., Dubois-Pot-Schneider, H., Fontana, C., Schohn, H., Gaté, L., and Guichard, Y. (2019). Predictive early gene signature during mouse Bhas 42 cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles. *Chem. Biol. Interact.* 108900.
- Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441, 46–52.
- Kolling, A., Ernst, H., Rittinghausen, S., and Heinrich, U. (2011). Relationship of pulmonary toxicity and carcinogenicity of fine and ultrafine granular dusts in a rat bioassay. *Inhal. Toxicol.* 23, 544–554.
- Koper, O.M., Kamińska, J., Sawicki, K., and Kemonia, H. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11, and their receptor (CXCR3) in neuroinflammation and neurodegeneration. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* 27, 849–856.
- Koskivirta, I., Rahkonen, O., Mäyränpää, M., Pakkanen, S., Husheem, M., Sainio, A., Hakovirta, H., Laine, J., Jokinen, E., Vuorio, E., et al. (2006). Tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (TIMP4) is involved in inflammatory processes of human cardiovascular pathology. *Histochem. Cell Biol.* 126, 335–342.
- Kovalenko, O.V., Golub, E.I., Bray-Ward, P., Ward, D.C., and Radding, C.M. (1997). A novel nucleic acid-binding protein that interacts with human rad51 recombinase. *Nucleic Acids Res.* 25, 4946–4953.
- Krug, H.F., and Wick, P. (2011). Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 50, 1260–1278.
- Kunzmann, A.T., Murray, L.J., Cardwell, C.R., McShane, C.M., McMenamin, U.C., and Cantwell, M.M. (2013). PTGS2 (Cyclooxygenase-2) expression and survival among colorectal cancer patients: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 22, 1490–1497.
- Kuwabara, I., Kuwabara, Y., Yang, R.-Y., Schuler, M., Green, D.R., Zuraw, B.L., Hsu, D.K., and Liu, F.-T. (2002). Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 277, 3487–3497.
- La, D.K., and Swenberg, J.A. (1996). DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutat. Res.* 365, 129–146.
- Labrie, M., Vladoiu, M.C., Grosset, A.-A., Gaboury, L., and St-Pierre, Y. (2014). Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer. *Oncotarget* 5, 7705–7721.
- Lam, C.-W., James, J.T., McCluskey, R., and Hunter, R.L. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 77, 126–134.
- Lamph, W.W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P., and Verma, I.M. (1988). Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 334, 629–631.

- Langenbach, R., and Kuszynski, C. (1975). Nonspecific inhibition of DNA repair by promoting and nonpromoting phorbol esters. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 801–802.
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., and Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open* 7, 1–9.
- Lee, S.J., Talamantes, F., Wilder, E., Linzer, D.I., and Nathans, D. (1988). Trophoblastic giant cells of the mouse placenta as the site of proliferin synthesis. *Endocrinology* 122, 1761–1768.
- Lee, S.-Y., Jang, C., and Lee, K.-A. (2014). Polo-Like Kinases (Plks), a Key Regulator of Cell Cycle and New Potential Target for Cancer Therapy. *Dev. Reprod.* 18, 65–71.
- Leung, C.C., Yu, I.T.S., and Chen, W. (2012). Silicosis. *Lancet Lond. Engl.* 379, 2008–2018.
- Lévy, P., Vidaud, D., Leroy, K., Laurendeau, I., Wechsler, J., Bolasco, G., Parfait, B., Wolkenstein, P., Vidaud, M., and Bièche, I. (2004). Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. *Mol. Cancer* 3, 20.
- Lewinson, J., Mayr, W., and Wagner, H. (1994). Characterization and toxicological behavior of synthetic amorphous hydrophobic silica. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 20, 37–57.
- Li, Z., and Xu, X. (2019). Post-Translational Modifications of the Mini-Chromosome Maintenance Proteins in DNA Replication. *Genes* 10.
- Li, C.-Y., Devappa, R.K., Liu, J.-X., Lv, J.-M., Makkar, H.P.S., and Becker, K. (2010). Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48, 620–625.
- Li, P., Qian, J., Yu, G., Chen, Y., Liu, K., Li, J., and Wang, J. (2012). Down-regulated SPARCL1 is associated with clinical significance in human gastric cancer. *J. Surg. Oncol.* 105, 31–37.
- Li, W.-M., Huang, C.-N., Ke, H.-L., Li, C.-C., Wei, Y.-C., Yeh, H.-C., Chang, L.-L., Huang, C.-H., Liang, P.-I., Yeh, B.-W., et al. (2016a). MCM10 overexpression implicates adverse prognosis in urothelial carcinoma. *Oncotarget* 7, 77777–77792.
- Li, X., Roife, D., Kang, Y., Dai, B., Pratt, M., and Fleming, J.B. (2016b). Extracellular lumican augments cytotoxicity of chemotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma cells via autophagy inhibition. *Oncogene* 35, 4881–4890.
- Liao, H.-Y., Chung, Y.-T., Lai, C.-H., Wang, S.-L., Chiang, H.-C., Li, L.-A., Tsou, T.-C., Li, W.-F., Lee, H.-L., Wu, W.-T., et al. (2014). Six-month follow-up study of health markers of nanomaterials among workers handling engineered nanomaterials. *Nanotoxicology* 8 *Suppl 1*, 100–110.
- Lieu, A.-S., Cheng, T.-S., Chou, C.-H., Wu, C.-H., Hsu, C.-Y., Huang, C.-Y.F., Chang, L.-K., Loh, J.-K., Chang, C.-S., Hsu, C.-M., et al. (2010). Functional characterization of AIBp, a novel Aurora-A binding protein in centrosome structure and spindle formation. *Int. J. Oncol.* 37, 429–436.
- Liljenström, C., Lazarevic, D., and Finnveden, G. (2013). Silicon-based nanomaterials in a life-cycle perspective, including a case study on self-cleaning coatings. *Environ. Strateg. Res.* 62.
- Lindgren, D., Liedberg, F., Andersson, A., Chebil, G., Gudjonsson, S., Borg, A., Månsson, W., Fioretos, T., and Höglund, M. (2006). Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene* 25, 2685–2696.
- Lingel, A., Weiss, T.M., Niebuhr, M., Pan, B., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Bazan, J.F., and Fairbrother, W.J. (2009). Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 1398–1410.
- Linzer, D.I., Lee, S.J., Ogren, L., Talamantes, F., and Nathans, D. (1985). Identification of proliferin mRNA and protein in mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4356–4359.

- Liou, S.-H., Tsou, T.-C., Wang, S.-L., Li, L.-A., Chiang, H.-C., and Li, W.-F. (2014). Epidemiological study of health hazards among workers handling engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 14, 8.
- Liu, H., Chen, S., Yao, X., Li, Y., Chen, C.-H., Liu, J., Saifudeen, Z., and El-Dahr, S.S. (2018a). Histone deacetylases 1 and 2 regulate the transcriptional programs of nephron progenitors and renal vesicles. *Dev. Camb. Engl.* 145.
- Liu, W., Li, J., Liu, M., Zhang, H., and Wang, N. (2015). PPAR- γ promotes endothelial cell migration by inducing the expression of Sema3g. *J. Cell. Biochem.* 116, 514–523.
- Liu, X., Zhu, L., Lu, X., Bian, H., Wu, X., Yang, W., and Qin, Q. (2014). IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 486–492.
- Liu, Z.-L., Bi, X.-W., Liu, P.-P., Lei, D.-X., Wang, Y., Li, Z.-M., Jiang, W.-Q., and Xia, Y. (2018b). Expressions and prognostic values of the E2F transcription factors in human breast carcinoma. *Cancer Manag. Res.* 10, 3521–3532.
- de Lorenzo, A. (1970). The olfactory neuron and the blood-brain barrier. *Taste Smell Vertebr. Wolstenholme G Kn. J Eds Lond. Churchill* 151–176.
- Lou, J., Chen, H., Han, J., He, H., Huen, M.S.Y., Feng, X.-H., Liu, T., and Huang, J. (2017). AUNIP/C1orf135 directs DNA double-strand breaks towards the homologous recombination repair pathway. *Nat. Commun.* 8, 985.
- Loukil, A., Cheung, C.T., Bendris, N., Lemmers, B., Peter, M., and Blanchard, J.M. (2015). Cyclin A2: At the crossroads of cell cycle and cell invasion. *World J. Biol. Chem.* 6, 346–350.
- Lu, X., Miousse, I.R., Pirela, S.V., Melnyk, S., Koturbash, I., and Demokritou, P. (2016). Short-term exposure to engineered nanomaterials affects cellular epigenome. *Nanotoxicology* 10, 140–150.
- Ma, G.T., Roth, M.E., Groskopf, J.C., Tsai, F.Y., Orkin, S.H., Grosveld, F., Engel, J.D., and Linzer, D.I. (1997). GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Dev. Camb. Engl.* 124, 907–914.
- Maeshima, H., Ohno, K., Tanaka-Azuma, Y., Nakano, S., and Yamada, T. (2009). Identification of tumor promotion marker genes for predicting tumor promoting potential of chemicals in BALB/c 3T3 cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 23, 148–157.
- Maeshima, H., Ohno, K., Nakano, S., and Yamada, T. (2010). Validation of an in vitro screening test for predicting the tumor promoting potential of chemicals based on gene expression. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 24, 995–1001.
- Mahadevappa, R., Neves, H., Yuen, S.M., Jameel, M., Bai, Y., Yuen, H.-F., Zhang, S.-D., Zhu, Y., Lin, Y., and Kwok, H.F. (2018). DNA Replication Licensing Protein MCM10 Promotes Tumor Progression and Is a Novel Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target in Breast Cancer. *Cancers* 10.
- Maire, M.-A. (2004). Inhibition de l'apoptose comme facteur de transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster Syrien. *Thèse Univ. Metz-UFR Sci FA* 1–186.
- Marcher, A.-B., Bendixen, S.M., Terkelsen, M.K., Hohmann, S.S., Hansen, M.H., Larsen, B.D., Mandrup, S., Dimke, H., Detlefsen, S., and Ravnkjaer, K. (2019). Transcriptional regulation of Hepatic Stellate Cell activation in NASH. *Sci. Rep.* 9, 1–13.
- Mascolo, M.G., Perdichizzi, S., Rotondo, F., Morandi, E., Guerrini, A., Silingardi, P., Vaccari, M., Grilli, S., and Colacci, A. (2010). BALB/c 3T3 cell transformation assay for the prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 24, 1292–1300.

Maser, E., Schulz, M., Sauer, U.G., Wiemann, M., Ma-Hock, L., Wohlleben, W., Hartwig, A., and Landsiedel, R. (2015). In vitro and in vivo genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO₂ nanomaterials. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 794, 57–74.

Maywald, R.L., Doerner, S.K., Pastorelli, L., De Salvo, C., Benton, S.M., Dawson, E.P., Lanza, D.G., Berger, N.A., Markowitz, S.D., Lenz, H.-J., et al. (2015). IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E2487-2496.

McCracken, C., Zane, A., Knight, D.A., Dutta, P.K., and Waldman, W.J. (2013). Minimal intestinal epithelial cell toxicity in response to short- and long-term food-relevant inorganic nanoparticle exposure. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1514–1525.

McDermott, J.E., Archuleta, M., Thrall, B.D., Adkins, J.N., and Waters, K.M. (2011). Controlling the response: predictive modeling of a highly central, pathogen-targeted core response module in macrophage activation. *PLoS One* 6, e14673.

Meephansan, J., Komine, M., Tsuda, H., Karakawa, M., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2013). Expression of IL-33 in the epidermis: The mechanism of induction by IL-17. *J. Dermatol. Sci.* 71, 107–114.

Meisel, C., Bonhagen, K., Löhning, M., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Radbruch, A., and Kamradt, T. (2001). Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4⁺ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 3143–3150.

Messerschmidt, C., Hofmann, D., Kroeger, A., Landfester, K., Mailänder, V., and Lieberwirth, I. (2016). On the pathway of cellular uptake: new insight into the interaction between the cell membrane and very small nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol.* 7, 1296–1311.

Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie (2018). <https://www.ecologie-solidaire.gouv.fr/nanomateriaux>.

Mitin, N., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol. CB* 15, R563-574.

Mondal, S., Brankow, D.W., and Heidelberger, C. (1976). Two-stage chemical oncogenesis in cultures of C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res.* 36, 2254–2260.

Morino, H., Matsuda, Y., Muguruma, K., Miyamoto, R., Ohsawa, R., Ohtake, T., Otobe, R., Watanabe, M., Maruyama, H., Hashimoto, K., et al. (2015). A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol. Brain* 8, 89.

Mu, Q., Hondow, N.S., Krzemiński, L., Brown, A.P., Jeuken, L.J.C., and Routledge, M.N. (2012). Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 29.

Muramatsu, D., Sasaki, K., Kuroda, S., Hayashi, K., Tanaka, N., and Sakai, A. (2009). Comparison of sensitivity to arsenic compounds between a Bhas 42 cell transformation assay and a BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutat. Res.* 675, 66–70.

Murray, A.W., and Fitzgerald, D.J. (1979). Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 395–401.

Murugadoss, S., Lison, D., Godderis, L., Van Den Brule, S., Mast, J., Brassinne, F., Sebaihi, N., and Hoet, P.H. (2017). Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Arch. Toxicol.* 91, 2967–3010.

Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Matsuo, K., Arimori, A., Isobe, M., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., et al. (2011a). Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials* 32, 2713–2724.

- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Nagano, K., Abe, Y., et al. (2011b). Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. Part. Fibre Toxicol. 8, 1.
- Nam, S.W., Clair, T., Kim, Y.S., McMarlin, A., Schiffmann, E., Liotta, L.A., and Stracke, M.L. (2001). Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. Cancer Res. 61, 6938–6944.
- Napierska, D., Thomassen, L.C.J., Lison, D., Martens, J.A., and Hoet, P.H. (2010). The nanosilica hazard: another variable entity. Part. Fibre Toxicol. 7, 39.
- Neagu, M., Caruntu, C., Constantin, C., Boda, D., Zurac, S., Spandidos, D.A., and Tsatsakis, A.M. (2016). Chemically induced skin carcinogenesis: Updates in experimental models (Review). Oncol. Rep. 35, 2516–2528.
- Neame, P.J., Kay, C.J., McQuillan, D.J., Beales, M.P., and Hassell, J.R. (2000). Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 57, 859–863.
- Newbold, R.F., Overell, R.W., and Connell, J.R. (1982). Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. Nature 299, 633–635.
- Nilsen-Hamilton, M., Shapiro, J.M., Massoglia, S.L., and Hamilton, R.T. (1980). Selective stimulation by mitogens of incorporation of 35S-methionine into a family of proteins released into the medium by 3T3 cells. Cell 20, 19–28.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258, 607–614.
- Noël, A., Charbonneau, M., Cloutier, Y., Tardif, R., and Truchon, G. (2013). Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO₂: effect of primary particle size and agglomeration state. Part. Fibre Toxicol. 10, 48.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., and Cox, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. Inhal. Toxicol. 16, 437–445.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ. Health Perspect. 113, 823–839.
- OCDE (2016). Ser. Test. Assess. No 231 ENVJMMONO20161 OECD Publ. 1–34.
- O'Donnell, K.A., Yu, D., Zeller, K.I., Kim, J.-W., Racke, F., Thomas-Tikhonenko, A., and Dang, C.V. (2006). Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. Mol. Cell. Biol. 26, 2373–2386.
- OECD (2007). Detailed Review Paper on Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 31 ENV/JM/MONO(2007)18. 1–164.
- OECD (2016). DRAFT Guidance Document, In Vitro Bhas 42 Cell Transformation Assay. 1–28.
- Ohmori, K., Sasaki, K., Asada, S., Tanaka, N., and Umeda, M. (2004). An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells. Mutat. Res. 557, 191–202.
- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P, L.F., and Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. An. Acad. Bras. Cienc. 79, 593–616.
- Panas, A., Comouth, A., Saathoff, H., Leisner, T., Al-Rawi, M., Simon, M., Seemann, G., Dössel, O., Mühlhopt, S., Paur, H.-R., et al. (2014). Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure. Beilstein J. Nanotechnol. 5, 1590–1602.

- Pang, Y., Li, W., Ma, R., Ji, W., Wang, Q., Li, D., Xiao, Y., Wei, Q., Lai, Y., Yang, P., et al. (2008). Development of human cell models for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 478–486.
- Parfett, C.L.J. (2005). Mitogen-regulated protein/proliferin mRNA induction following single applications of tumor promoters to murine skin. *Mol. Carcinog.* 43, 117–129.
- Parfett, C.L., Pilon, R., and Caldeira, A.A. (1996). Asbestos promotes morphological transformation and elevates expression of a gene family invariably induced by tumor promoters in C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 17, 2719–2726.
- Parfett, C.L., Marquardt, T., and Pilon, R. (2000). Promotion of morphological transformation by Di-n-butyltin dichloride in C3H/10T1/2 cells: prediction by prior expression of tumour promoter-responsive genes. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 38, 339–349.
- Park, J.Y., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 119, 229–240.
- Pavan, C., Tomatis, M., Ghiazza, M., Rabolli, V., Bolis, V., Lison, D., and Fubini, B. (2013). In search of the chemical basis of the hemolytic potential of silicas. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1188–1198.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* 2, 764–776.
- Perdiguero, E., and Nebreda, A.R. (2004). Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 733–737.
- Perkins, T.N., Peeters, P.M., Shukla, A., Arijis, I., Dragon, J., Wouters, E.F.M., Reynaert, N.L., and Mossman, B.T. (2015). Indications for distinct pathogenic mechanisms of asbestos and silica through gene expression profiling of the response of lung epithelial cells. *Hum. Mol. Genet.* 24, 1374–1389.
- Petros, R.A., and DeSimone, J.M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 615–627.
- Pflücker, F., Wendel, V., Hohenberg, H., Gärtner, E., Will, T., Pfeiffer, S., Wepf, R., and Gers-Barlag, H. (2001). The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14 Suppl 1, 92–97.
- Pisani, C., Gaillard, J.-C., 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.
- Pohjolainen, V., Rysä, J., Näpänkangas, J., Kööbi, P., Eräranta, A., Ilves, M., Serpi, R., Pörsti, I., and Ruskoaho, H. (2012). Left ventricular periostin gene expression is associated with fibrogenesis in experimental renal insufficiency. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 27, 115–122.
- Pott, F., and Roller, M. (2005). Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur. J. Oncol.* 10: 249-281.
- Poulsen, S.S., Saber, A.T., Williams, A., Andersen, O., Købler, C., Atluri, R., Pozzebon, M.E., Mucelli, S.P., Simion, M., Rickerby, D., et al. (2015). MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differences in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284, 16–32.
- Queiroz, G.A., Costa, R.S., Alcantara-Neves, N.M., Costa, G.N. de O., Barreto, M.L., Carneiro, V.L., and Figueiredo, C.A. (2017). IL33 and IL1RL1 variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population. *Int. J. Immunogenet.* 44, 51–61.

- Rangarajan, A., and Weinberg, R.A. (2003). Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat. Rev. Cancer* 3, 952–959.
- Rangarajan, A., Hong, S.J., Gifford, A., and Weinberg, R.A. (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* 6, 171–183.
- Rasmussen, K., Mech, A., Mast, J., De Temmerman, P.-J., Van Doren, E., Waegeneers, N., Van Steen, F., Pizzolon, J.-C., De Temmerman, L., and Jensen, K.-A. (2013). Synthetic Amorphous Silicon Dioxide (NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204). Characterisation and Physico-Chemical Properties. JRC Repos. NM-Ser. Represent. Manuf. Banomaterials Publ. Off. Eur. Union Luxemb. 200.
- Reagan-Shaw, S., and Ahmad, N. (2005). Polo-like kinase (Plk) 1 as a target for prostate cancer management. *IUBMB Life* 57, 677–682.
- Refsnes, M., Skuland, T., Låg, M., Schwarze, P.E., and Øvrevik, J. (2014). Differential NF- κ B and MAPK activation underlies fluoride- and TPA-mediated CXCL8 (IL-8) induction in lung epithelial cells. *J. Inflamm. Res.* 7, 169–185.
- Reiser, K.M., and Last, J.A. (1979). Silicosis and fibrogenesis: fact and artifact. *Toxicology* 13, 51–72.
- Reuzel, P.G., Buijntjes, J.P., Feron, V.J., and Woutersen, R.A. (1991). Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 29, 341–354.
- Reznikoff, C.A., Bertram, J.S., Brankow, D.W., and Heidelberger, C. (1973). Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res.* 33, 3239–3249.
- Ricaud, M. (2007). Point des connaissances ED 5033, Les silices amorphes. 1–6.
- Riedel, C.G., Katis, V.L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Gálová, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., et al. (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441, 53–61.
- Rimal, B., Greenberg, A.K., and Rom, W.N. (2005). Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 11, 169–173.
- Rohrbeck, A., Salinas, G., Maaser, K., Linge, J., Salovaara, S., Corvi, R., and Borlak, J. (2010). Toxicogenomics applied to in vitro carcinogenicity testing with Balb/c 3T3 cells revealed a gene signature predictive of chemical carcinogens. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 118, 31–41.
- Romani, M., Pistillo, M.P., and Banelli, B. (2015). Environmental Epigenetics: Crossroad between Public Health, Lifestyle, and Cancer Prevention. *BioMed Res. Int.* 2015, 587983.
- Rozengurt, E., and Walsh, J.H. (2001). Gastrin, CCK, signaling, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 49–76.
- Russell, W.M.S. (1995). The development of the three Rs concept. *Altern. Lab. Anim. ATLA* 23, 298–304.
- Saffiotti, U. (1992). Lung cancer induction by crystalline silica. *Prog. Clin. Biol. Res.* 374, 51–69.
- Saffiotti, U., and Ahmed, N. (1995). Neoplastic transformation by quartz in the BALB/3T3/A31-1-1 cell line and the effects of associated minerals. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 15, 339–356.
- Sakai, A., Sasaki, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endou, N., Kuroda, S., Hayashi, K., Lim, Y., Yamazaki, S., Umeda, M., et al. (2010). A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat. Res.* 702, 100–122.

Sakai, A., Sasaki, K., Hayashi, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endou, N., Kuroda, S., Poth, A., Bohnenberger, S., Kunkelmann, T., et al. (2011). An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat. Res.* 725, 57–77.

Sakamuri, S.S.V.P., Watts, R., Takawale, A., Wang, X., Hernandez-Anzaldo, S., Bahitham, W., Fernandez-Patron, C., Lehner, R., and Kassiri, Z. (2017). Absence of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 (TIMP4) ameliorates high fat diet-induced obesity in mice due to defective lipid absorption. *Sci. Rep.* 7, 6210.

Sasaki, H., Lo, K.M., Chen, L.B., Auclair, D., Nakashima, Y., Moriyama, S., Fukai, I., Tam, C., Loda, M., and Fujii, Y. (2001). Expression of Periostin, homologous with an insect cell adhesion molecule, as a prognostic marker in non-small cell lung cancers. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 92, 869–873.

Sasaki, H., Sato, Y., Kondo, S., Fukai, I., Kiriya, M., Yamakawa, Y., and Fujii, Y. (2002). Expression of the periostin mRNA level in neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* 37, 1293–1297.

Sasaki, K., Mizusawa, H., and Ishidate, M. (1988). Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 79, 921–930.

Sasaki, K., Mizusawa, H., Ishidate, M., and Tanaka, N. (1990). Transformation of ras transfected BALB 3T3 clone (Bhas 42) by promoters: Application for screening and specificity of promoters. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 4, 657–659.

Sasaki, K., Bohnenberger, S., Hayashi, K., Kunkelmann, T., Muramatsu, D., Poth, A., Sakai, A., Salovaara, S., Tanaka, N., Thomas, B.C., et al. (2012). Photo catalogue for the classification of foci in the BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutat. Res.* 744, 42–53.

Sasaki, K., Umeda, M., Sakai, A., Yamazaki, S., and Tanaka, N. (2015). Transformation assay in Bhas 42 cells: a model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals. *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 33, 1–35.

Sayes, C.M., Reed, K.L., and Warheit, D.B. (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 97, 163–180.

Schechtman, L.M. (1985). Metabolic activation of procarcinogens by subcellular enzyme fractions in the C3H 10T1/2 and BALB/c 3T3 cell transformation systems. *IARC Sci. Publ.* 67, 137–162.

Seddighi, S., Varma, V.R., An, Y., Varma, S., Beason-Held, L.L., Tanaka, T., Kitner-Triolo, M.H., Kraut, M.A., Davatzikos, C., and Thambisetty, M. (2018). SPARCL1 Accelerates Symptom Onset in Alzheimer's Disease and Influences Brain Structure and Function During Aging. *J. Alzheimers Dis. JAD* 61, 401–414.

Seidel, C., Kirsch, A., Fontana, C., Visvikis, A., Remy, A., Gaté, L., Darne, C., and Guichard, Y. (2017). Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation. *Nanotoxicology* 11, 923–935.

Senfter, D., Erkan, E.P., Özer, E., Jungwirth, G., Madlener, S., Kool, M., Ströbel, T., Saydam, N., and Saydam, O. (2017). Overexpression of minichromosome maintenance protein 10 in medulloblastoma and its clinical implications. *Pediatr. Blood Cancer* 64.

Sergent, J.-A., Paget, V., and Chevillard, S. (2012). Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann. Occup. Hyg.* 56, 622–630.

Shacter, E., and Weitzman, S.A. (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncol. Williston Park* N 16, 217–226, 229; discussion 230-232.

- Shafqat, N., Turnbull, A., Zschocke, J., Oppermann, U., and Yue, W.W. (2010). Crystal structures of human HMG-CoA synthase isoforms provide insights into inherited ketogenesis disorders and inhibitor design. *J. Mol. Biol.* 398, 497–506.
- Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36.
- Shi, H., He, X., Yuan, Y., Wang, K., and Liu, D. (2010). Nanoparticle-based biocompatible and long-life marker for lysosome labeling and tracking. *Anal. Chem.* 82, 2213–2220.
- Shimpo, M., Morrow, D.A., Weinberg, E.O., Sabatine, M.S., Murphy, S.A., Antman, E.M., and Lee, R.T. (2004). Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation* 109, 2186–2190.
- Smith, J.P., Wang, S., Nadella, S., Jablonski, S.A., and Weiner, L.M. (2018). Cholecystokinin receptor antagonist alters pancreatic cancer microenvironment and increases efficacy of immune checkpoint antibody therapy in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 67, 195–207.
- Snider, P., Standley, K.N., Wang, J., Azhar, M., Doetschman, T., and Conway, S.J. (2009). Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ. Res.* 105, 934–947.
- Snyder, R.D., and Green, J.W. (2001). A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 488, 151–169.
- Sohaebuddin, S.K., Thevenot, P.T., Baker, D., Eaton, J.W., and Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 22.
- Song, Y., Li, X., and Du, X. (2009). Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur. Respir. J.* 34, 559–567.
- Sugimura, T. (1992). Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science* 258, 603–607.
- Sullivan, M.M., Barker, T.H., Funk, S.E., Karchin, A., Seo, N.S., Höök, M., Sanders, J., Starcher, B., Wight, T.N., Puolakkainen, P., et al. (2006). Matricellular hevin regulates decorin production and collagen assembly. *J. Biol. Chem.* 281, 27621–27632.
- Sun, G., Cui, Q., and Shi, Y. (2017). Nuclear Receptor TLX in Development and Diseases. *Curr. Top. Dev. Biol.* 125, 257–273.
- Sun, Q., Kim, H.-E., Cho, H., Shi, S., Kim, B., and Kim, O. (2018). Red light-emitting diode irradiation regulates oxidative stress and inflammation through SPHK1/NF- κ B activation in human keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B* 186, 31–40.
- Sylvester, A.M., Chen, D., Krasinski, K., and Andrés, V. (1998). Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Clin. Invest.* 101, 940–948.
- Taeger, D., McCunney, R., Bailer, U., Barthel, K., Küpper, U., Brüning, T., Morfeld, P., and Merget, R. (2016). Cross-Sectional Study on Nonmalignant Respiratory Morbidity due to Exposure to Synthetic Amorphous Silica. *J. Occup. Environ. Med.* 58, 376–384.
- Takeshita, S., Kikuno, R., Tezuka, K., and Amann, E. (1993). Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem. J.* 294 (Pt 1), 271–278.
- Tang, M.W., Malvar Fernández, B., Newsom, S.P., van Buul, J.D., Radstake, T.R.D.J., Baeten, D.L., Tak, P.P., Reedquist, K.A., and García, S. (2018). Class 3 semaphorins modulate the invasive capacity of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 57, 909–920.
- Tarantini, A., Huet, S., Jarry, G., Lanceleur, R., Poul, M., Tavares, A., Vital, N., Louro, H., João Silva, M., and Fessard, V. (2015a). Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 1: oral route. *Environ. Mol. Mutagen.* 56, 218–227.

- Tarantini, A., Lanceleur, R., Mouro, A., Lavault, M.-T., Casterou, G., Jarry, G., Hogeveen, K., and Fessard, V. (2015b). Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 29, 398–407.
- Tavares, A.M., Louro, H., Antunes, S., Quarré, S., Simar, S., De Temmerman, P.-J., Verleysen, E., Mast, J., Jensen, K.A., Norppa, H., et al. (2014). Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 60–69.
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., and Karamanos, N.K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 4–27.
- Tilburgs, T., Meissner, T.B., Ferreira, L.M.R., Mulder, A., Musunuru, K., Ye, J., and Strominger, J.L. (2017). NLRP2 is a suppressor of NF- κ B signaling and HLA-C expression in human trophoblasts†,‡. *Biol. Reprod.* 96, 831–842.
- Tripathi, S., Flobak, Å., Chawla, K., Baudot, A., Bruland, T., Thommesen, L., Kuiper, M., and Lægred, A. (2015). The gastrin and cholecystokinin receptors mediated signaling network: a scaffold for data analysis and new hypotheses on regulatory mechanisms. *BMC Syst. Biol.* 9.
- Trosko, J.E. (2001). Commentary: is the concept of “tumor promotion” a useful paradigm? *Mol. Carcinog.* 30, 131–137.
- Trosko, J.E. (2003). The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 43–48.
- Trosko, J.E., Chang, C.C., Madhukar, B.V., and Klaunig, J.E. (1990). Chemical, oncogene and growth factor inhibition gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* 58, 265–278.
- Uboldi, C., Giudetti, G., Broggi, F., Gilliland, D., Ponti, J., and Rossi, F. (2012). Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutat. Res.* 745, 11–20.
- Ueda, S., Kuwabara, I., and Liu, F.-T. (2004). Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer Res.* 64, 5672–5676.
- Vanparys, P., Corvi, R., Aardema, M., Gribaldo, L., Hayashi, M., Hoffmann, S., and Schechtman, L. (2011). ECVAM prevalidation of three cell transformation assays. *ALTEX* 28, 56–59.
- Vanparys, P., Corvi, R., Aardema, M.J., Gribaldo, L., Hayashi, M., Hoffmann, S., and Schechtman, L. (2012). Application of in vitro cell transformation assays in regulatory toxicology for pharmaceuticals, chemicals, food products and cosmetics. *Mutat. Res.* 744, 111–116.
- Vasseur, P., and Lasne, C. (2012). OECD Detailed Review Paper (DRP) number 31 on “Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens”: main results and conclusions. *Mutat. Res.* 744, 8–11.
- Vecchi, M., Nuciforo, P., Romagnoli, S., Confalonieri, S., Pellegrini, C., Serio, G., Quarto, M., Capra, M., Roviato, G.C., Contessini Avesani, E., et al. (2007). Gene expression analysis of early and advanced gastric cancers. *Oncogene* 26, 4284–4294.
- Venkatesan, N., Yoshimitsu, J., Ito, Y., Shibata, N., and Takada, K. (2005). Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials* 26, 7154–7163.
- Volkheimer, G. (1974). Passage of particles through the wall of the gastrointestinal tract. *Environ. Health Perspect.* 9, 215–225.
- Vuong, N.Q., Goegan, P., De Rose, F., Breznan, D., Thomson, E.M., O'Brien, J.S., Karthikeyan, S., Williams, A., Vincent, R., and Kumarathasan, P. (2017). Responses of A549 human lung epithelial cells

to cristobalite and α -quartz exposures assessed by toxicoproteomics and gene expression analysis. *J. Appl. Toxicol.* **JAT 37**, 721–731.

Waalkes, M.P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* **533**, 107–120.

Wang, J.-W., Jiang, Y.-N., Huang, C.-Y., Huang, P.-Y., Huang, M.-C., Cheng, W.T.-K., Shen, C.-K.J., and Ju, Y.-T. (2006). Proliferin enhances microvilli formation and cell growth of neuroblastoma cells. *Neurosci. Res.* **56**, 80–90.

Warren, E.M., Huang, H., Fanning, E., Chazin, W.J., and Eichman, B.F. (2009). Physical interactions between Mcm10, DNA, and DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* **284**, 24662–24672.

Watanabe, H., Shimokado, K., Asahara, T., Dohi, K., and Niwa, O. (1999). Analysis of the c-myc, K-ras and p53 Genes in Methylcholanthrene induced Mouse Sarcomas. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* **90**, 40–47.

Wen-Sheng, W., and Jun-Ming, H. (2005). Activation of protein kinase C alpha is required for TPA-triggered ERK (MAPK) signaling and growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *J. Biomed. Sci.* **12**, 289–296.

Witschger, O., and Fabries, J.-F. (2005). Particules ultrafines et sante au travail 2. Sources Caracterisation L'exposition INRS 1–15.

Witschger, O., and Ricaud, M. (2012). Les nanoparticules, définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesure de prévention. INRS 1–52.

Woodruff, P.G., Boushey, H.A., Dolganov, G.M., Barker, C.S., Yang, Y.H., Donnelly, S., Ellwanger, A., Sidhu, S.S., Dao-Pick, T.P., Pantoja, C., et al. (2007). Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15858–15863.

Wu-Baer, F., Lagazon, K., Yuan, W., and Baer, R. (2003). The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J. Biol. Chem.* **278**, 34743–34746.

Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M., Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R.F., Nguyen-Ba, G., Parodi, S., Rivedal, E., Schiffmann, D., et al. (1996). Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat. Res.* **353**, 47–63.

Yanaka, N., Imai, Y., Kawai, E., Akatsuka, H., Wakimoto, K., Nogusa, Y., Kato, N., Chiba, H., Kotani, E., Omori, K., et al. (2003). Novel membrane protein containing glycerophosphodiester phosphodiesterase motif is transiently expressed during osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 43595–43602.

Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., and Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* **JAT 29**, 69–78.

Yang, X., Zou, P., Yao, J., Yun, D., Bao, H., Du, R., Long, J., and Chen, X. (2010). Proteomic dissection of cell type-specific H2AX-interacting protein complex associated with hepatocellular carcinoma. *J. Proteome Res.* **9**, 1402–1415.

Yang, X., Meyer, K., and Friedl, A. (2013). STAT5 and Prolactin Participate in a Positive Autocrine Feedback Loop That Promotes Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 21184–21196.

Yang, X., Liu, X., Li, Y., Huang, Q., He, W., Zhang, R., Feng, Q., and Benayahu, D. (2017). The negative effect of silica nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **81**, 341–348.

- Yang, Y.-X., Song, Z.-M., Cheng, B., Xiang, K., Chen, X.-X., Liu, J.-H., Cao, A., Wang, Y., Liu, Y., and Wang, H. (2014). Evaluation of the toxicity of food additive silica nanoparticles on gastrointestinal cells. *J. Appl. Toxicol. JAT* 34, 424–435.
- Yang, Z., Liang, X., Fu, Y., Liu, Y., Zheng, L., Liu, F., Li, T., Yin, X., Qiao, X., and Xu, X. (2019). Identification of AUNIP as a candidate diagnostic and prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma. *EBioMedicine* 47, 44–57.
- Yao, Z., and Seger, R. (2009). The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments. *BioFactors Oxf. Engl.* 35, 407–416.
- Yoshioka, N., Inoue, H., Nakanishi, K., Oka, K., Yutsudo, M., Yamashita, A., Hakura, A., and Nojima, H. (2000). Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras. *J. Virol.* 74, 1008–1013.
- van der Zande, M., Vandebriel, R.J., Groot, M.J., Kramer, E., Herrera Rivera, Z.E., Rasmussen, K., Ossenkoppele, J.S., Tromp, P., Gremmer, E.R., Peters, R.J.B., et al. (2014). Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 8.
- Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1985). Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 315, 382–385.
- Zhan, T., Rindtorff, N., and Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36, 1461–1473.
- Zhang, H., Wang, P., Hou, H., Wen, H., Zhou, H., Gao, F., Wu, J., Qiu, Z., and Li, L. (2016). Histone Modification Is Involved in Okadaic Acid (OA) Induced DNA Damage Response and G2-M Transition Arrest in Maize. *PLoS ONE* 11.
- Zhao, J.J., Roberts, T.M., and Hahn, W.C. (2004). Functional genetics and experimental models of human cancer. *Trends Mol. Med.* 10, 344–350.
- Zheng, H., Högberg, J., and Stenius, U. (2017). ATM-activated autotaxin (ATX) propagates inflammation and DNA damage in lung epithelial cells: a new mode of action for silica-induced DNA damage? *Carcinogenesis* 38, 1196–1206.
- Zhou, X., Ma, L., Li, J., Gu, J., Shi, Q., and Yu, R. (2012). Effects of SEMA3G on migration and invasion of glioma cells. *Oncol. Rep.* 28, 269–275.

Chapitre VIII : ANNEXES

Tableau annexe 1: Liste des 50 premières signatures de la SAS pyrogénée NM-203, de la silice cristalline Min-U-Sil 5® et du TPA, score d'enrichissement et p-value.

50 Premières signatures sur-exprimées de NM-203	NES	p-value	50 Premières signatures sur-exprimées de Min-U-Sil 5®	NES	p-value	50 Premières signatures sur-exprimées de NM-203	NES	p-value
DUTERTRE_ESTRADIOL_RESPONSE_6HR_UP	2.066	< 0.005	DUTERTRE_ESTRADIOL_RESPONSE_24HR_UP	2.151	< 0.005	CHIANG_LIVER_CANCER_SUBCLASS_PROLIFERATION_UP	2.342	< 0.005
KRIGE_AMINO_ACID_DEPRIVATION	2.038	< 0.005	ODONNELL_TFRC_TARGETS_DN	2.150	< 0.005	FISCHER_G2_M_CELL_CYCLE	2.306	< 0.005
FISCHER_G1_S_CELL_CYCLE	2.037	< 0.005	GAVIN_FOXP3_TARGETS_CLUSTER_P6	2.133	< 0.005	SCIBETTA_KDM5B_TARGETS_DN	2.301	< 0.005
DUTERTRE_ESTRADIOL_RESPONSE_24HR_UP	2.030	< 0.005	KOBAYASHI_EGFR_SIGNALING_24HR_DN	2.123	< 0.005	SHEPARD_CRUSH_AND_BURN_MUTANT_DN	2.274	< 0.005
CHEMNITZ_RESPONSE_TO_PROSTAGLANDIN_E2_UP	2.029	< 0.005	GRAHAM_CML_DIVIDING_VS_NORMAL QUIESCENT_UP	2.117	< 0.005	NAKAYAMA_SOFT_TISSUE_TUMORS_PCA2_UP	2.247	< 0.005
BASSO_B_LYMPHOCYTE_NETWORK	2.019	< 0.005	GOBERT_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION_UP	2.116	< 0.005	SHEPARD_BMYB_MORPHOLINO_DN	2.217	< 0.005
BHATI_G2M_ARREST_BY_2METHOXYESTRADIOL_UP	2.016	< 0.005	MORI_PRE_BI_LYMPHOCYTE_UP	2.115	< 0.005	MARKEY_RB1_ACUTE_LOF_UP	2.215	< 0.005
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	1.993	< 0.005	FURUKAWA_DUSP6_TARGETS_PCI35_DN	2.109	< 0.005	BHATI_G2M_ARREST_BY_2METHOXYESTRADIOL_UP	2.193	< 0.005
GOBERT_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION_UP	1.991	< 0.005	SHEPARD_BMYB_TARGETS	2.108	< 0.005	WHITFIELD_CELL_CYCLE_G2_M	2.187	< 0.005
WHITFIELD_CELL_CYCLE_S	1.990	< 0.005	RUIZ_TNC_TARGETS_DN	2.102	< 0.005	ODONNELL_TFRC_TARGETS_DN	2.187	< 0.005
REACTOME_CELL_CYCLE	1.979	< 0.005	LE_EGR2_TARGETS_UP	2.095	< 0.005	GAL_LEUKEMIC_STEM_CELL_DN	2.186	< 0.005
ZHANG_TLX_TARGETS_36HR_DN	1.978	< 0.005	LEE_EARLY_T_LYMPHOCYTE_UP	2.094	< 0.005	MORI_MATURE_B_LYMPHOCYTE_DN	2.180	< 0.005
HORIUCHI_WTAP_TARGETS_DN	1.973	< 0.005	PID_FOXM1_PATHWAY	2.079	< 0.005	LINDGREN_BLADDER_CANCER_CLUSTER_1_DN	2.174	< 0.005
FUJII_YBX1_TARGETS_DN	1.972	< 0.005	GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_TURQUOISE_DN	2.079	< 0.005	LINDGREN_BLADDER_CANCER_CLUSTER_3_UP	2.174	< 0.005
BASAKI_YBX1_TARGETS_UP	1.967	< 0.005	STEIN_ESR1_TARGETS	2.070	< 0.005	DUTERTRE_ESTRADIOL_RESPONSE_24HR_UP	2.167	< 0.005
CHANG_CORE_SERUM_RESPONSE_UP	1.961	< 0.005	ROSTY_CERVICAL_CANCER_PROLIFERATION_CLUSTER	2.067	< 0.005	HORIUCHI_WTAP_TARGETS_DN	2.166	< 0.005
FURUKAWA_DUSP6_TARGETS_PCI35_DN	1.958	< 0.005	CHIANG_LIVER_CANCER_SUBCLASS_PROLIFERATION_UP	2.064	< 0.005	YAMAZAKI_TCEB3_TARGETS_DN	2.162	< 0.005
MARKEY_RB1_ACUTE_LOF_UP	1.953	< 0.005	FERREIRA_EWINGS_SARCOMA_UNSTABLE_VS_STABLE_UP	2.062	< 0.005	LEE_EARLY_T_LYMPHOCYTE_UP	2.162	< 0.005
REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA	1.951	< 0.005	AMUNDSON_GAMMA_RADIATION_RESPONSE	2.060	< 0.005	CROONQUIST_NRAS_VS_STROMAL_STIMULATION_DN	2.162	< 0.005
REACTOME_HOST_INTERACTIONS_OF_HIV_FACTORS	1.950	< 0.005	SARRIO_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP	2.059	< 0.005	GOLDRATH_ANTIGEN_RESPONSE	2.160	< 0.005
STEIN_ESR1_TARGETS	1.947	< 0.005	LI_WILMS_TUMOR_VS_FETAL_KIDNEY_1_DN	2.055	< 0.005	PETROVA_ENDOTHELIUM_LYMPHATIC_VS_BLOOD_UP	2.158	< 0.005
BENPORATH_ES_1	1.944	< 0.005	FUJII_YBX1_TARGETS_DN	2.054	< 0.005	SERVITUA_LIVER_HNF1A_TARGETS_UP	2.155	< 0.005
BERENJENO_TRANSFORMED_BY_RHOA_UP	1.940	< 0.005	BASAKI_YBX1_TARGETS_UP	2.053	< 0.005	TOYOTA_TARGETS_OF_MIR34B_AND_MIR34C	2.154	< 0.005
LINDGREN_BLADDER_CANCER_CLUSTER_3_UP	1.936	< 0.005	SMIRNOV_RESPONSE_TO_IR_6HR_DN	2.052	< 0.005	WHITFIELD_CELL_CYCLE_G2	2.152	< 0.005
MANALO_HYPOXIA_DN	1.933	< 0.005	HOFFMANN_LARGE_TO_SMALL_PRE_BII_LYMPHOCYTE_UP	2.051	< 0.005	BLUM_RESPONSE_TO_SALIRASIB_DN	2.149	< 0.005
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CLUSTER_11	1.931	< 0.005	WANG_RESPONSE_TO_GSK3_INHIBITOR_SB216763_DN	2.045	< 0.005	PUJANA_BRCA2_PCC_NETWORK	2.148	< 0.005
VECCHI_GASTRIC_CANCER_EARLY_UP	1.930	< 0.005	WAKASUGI_HAVE_ZNF143_BINDING_SITES	2.042	< 0.005	PID_FANCONI_PATHWAY	2.142	< 0.005
PUIFFE_INVASION_INHIBITED_BY_ASCITES_UP	1.927	< 0.005	ZHANG_TLX_TARGETS_60HR_DN	2.039	< 0.005	CHEMNITZ_RESPONSE_TO_PROSTAGLANDIN_E2_UP	2.137	< 0.005
GRADE_COLON_AND_RECTAL_CANCER_UP	1.926	< 0.005	BROWN_MYELOID_CELL_DEVELOPMENT_DN	2.038	< 0.005	GOBERT_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION_UP	2.136	< 0.005
ZHANG_TLX_TARGETS_60HR_DN	1.925	< 0.005	FISCHER_G1_S_CELL_CYCLE	2.037	< 0.005	CHANG_CYCLING_GENES	2.133	< 0.005
WANG_RESPONSE_TO_GSK3_INHIBITOR_SB216763_DN	1.915	< 0.005	HESS_TARGETS_OF_HOXA9_AND_MEIS1_UP	2.035	< 0.005	BASAKI_YBX1_TARGETS_UP	2.129	< 0.005
MORI_PRE_BI_LYMPHOCYTE_UP	1.914	< 0.005	BURTON_ADIPOGENESIS_3	2.026	< 0.005	FISCHER_G1_S_CELL_CYCLE	2.128	< 0.005
REACTOME_ORC1_REMOVAL_FROM_CHROMATIN	1.913	< 0.005	VECCHI_GASTRIC_CANCER_EARLY_UP	2.024	< 0.005	SENGUPTA_NASOPHARYNGEAL_CARCINOMA_UP	2.124	< 0.005
BENPORATH_PROLIFERATION	1.912	< 0.005	BHATI_G2M_ARREST_BY_2METHOXYESTRADIOL_UP	2.019	< 0.005	RIZ_ERYTHROID_DIFFERENTIATION	2.117	< 0.005
MARKEY_RB1_CHRONIC_LOF_UP	1.908	< 0.005	NAKAMURA_CANCER_MICROENVIRONMENT_DN	2.018	< 0.005	MISSIAGLIA_REGULATED_BY_METHYLATION_DN	2.116	< 0.005
REACTOME_S_PHASE	1.905	< 0.005	BOHN_PRIMARY_IMMUNODEFICIENCY_SYNDROM_UP	2.017	< 0.005	FURUKAWA_DUSP6_TARGETS_PCI35_DN	2.109	< 0.005
KAUFFMANN_DNA_REPAIR_GENES	1.905	< 0.005	CHEMNITZ_RESPONSE_TO_PROSTAGLANDIN_E2_UP	2.010	< 0.005	WHITFIELD_CELL_CYCLE_S	2.107	< 0.005
ZHENG_GLIOMASTOMA_PLASTICITY_UP	1.905	< 0.005	REACTOME_PHASE_II_CONJUGATION	2.003	< 0.005	FUJII_YBX1_TARGETS_DN	2.102	< 0.005
FEVR_CTNNB1_TARGETS_DN	1.903	< 0.005	MOLENAAR_TARGETS_OF_COND1_AND_CDK4_DN	1.998	< 0.005	GAVIN_FOXP3_TARGETS_CLUSTER_P6	2.097	< 0.005
GARCIA_TARGETS_OF_FLI1_AND_DAX1_DN	1.902	< 0.005	DUTERTRE_ESTRADIOL_RESPONSE_6HR_UP	1.997	< 0.005	SHEPARD_BMYB_TARGETS	2.095	< 0.005
BROWN_MYELOID_CELL_DEVELOPMENT_DN	1.901	< 0.005	GREENBAUM_E2A_TARGETS_UP	1.996	< 0.005	VECCHI_GASTRIC_CANCER_EARLY_UP	2.094	< 0.005
SHEDDEN_LUNG_CANCER_POOR_SURVIVAL_A6	1.898	< 0.005	STEIN_ESRRA_TARGETS_RESPONSIVE_TO_ESTROGEN_DN	1.993	< 0.005	VANTVEER_BREAST_CANCER_METASTASIS_DN	2.087	< 0.005
KOBAYASHI_EGFR_SIGNALING_24HR_DN	1.896	< 0.005	YAMAZAKI_TCEB3_TARGETS_DN	1.987	< 0.005	ALCALAY_AML_BY_NPM1_LOCALIZATION_DN	2.085	< 0.005
REACTOME_MITOTIC_G1_S_PHASES	1.895	< 0.005	GOLDRATH_ANTIGEN_RESPONSE	1.983	< 0.005	SLEBOS_HEAD_AND_NECK_CANCER_WITH_HPV_UP	2.083	< 0.005
SARRIO_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP	1.894	< 0.005	LINDGREN_BLADDER_CANCER_CLUSTER_3_UP	1.981	< 0.005	LI_WILMS_TUMOR_VS_FETAL_KIDNEY_1_DN	2.078	< 0.005
KEGG_AMINOACYL_TRNA_BIOSYNTHESIS	1.891	< 0.005	BASSO_B_LYMPHOCYTE_NETWORK	1.98	< 0.005	CHICAS_RB1_TARGETS_GROWING	2.077	< 0.005
OXFORD_RALA_OR_RALB_TARGETS_UP	1.89	< 0.005	MORI_IMMATURE_B_LYMPHOCYTE_DN	1.978	< 0.005	RIZ_ERYTHROID_DIFFERENTIATION_HBZ	2.077	< 0.005
ODONNELL_TFRC_TARGETS_DN	1.886	< 0.005	REACTOME_SULFUR_AMINO_ACID_METABOLISM	1.977	< 0.005	FERREIRA_EWINGS_SARCOMA_UNSTABLE_VS_STABLE_UP	2.075	< 0.005
FERREIRA_EWINGS_SARCOMA_UNSTABLE_VS_STABLE_UP	1.885	< 0.005	WU_APOPTOSIS_BY_CDKN1A_VIA_TP53	1.976	< 0.005	KAUFFMANN_DNA_REPAIR_GENES	2.074	< 0.005
WHITFIELD_CELL_CYCLE_G2_M	1.883	< 0.005	MANALO_HYPOXIA_DN	1.973	< 0.005	PID_FOXM1_PATHWAY	2.071	< 0.005

Tableau annexe 2 : Effet dose de la SAS pyrogénée NM-203.

Liste des gènes différentiellement exprimés dans les cellules Bhas 42 suite à l'exposition à la SAS pyrogénée NM-203 aux doses 1, 2 et 5 µg/cm² (P-value < 0,005 et FC >4).

Gènes	FC NM203(1) vs H ₂ O	FC NM203(2) vs H ₂ O	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(1) vs H ₂ O	FC NM203(2) vs H ₂ O	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(1) vs H ₂ O	FC NM203(2) vs H ₂ O	FC NM203(5) vs H ₂ O
Actn3	-1.26	-1.61	-6.01	Cdca2	1.79	2.17	5.36	Ect2	1.53	3.34	4.88
Adamts12	-1.41	-2.13	-5.06	Cdca3	1.83	4.38	3.37	Egfl7	-1.37	-1.42	-8.38
Adh1	-1.04	-1.78	-8.18	Cdca5	1.64	3.31	6.35	Enpp2	-1.17	-2.01	-8.67
Adhfe1	1.11	1.28	-4.06	Cdca8	1.60	3.40	4.66	Ercc6l	1.60	3.05	5.55
Agt	-1.81	-2.57	-10.33	Cdt1	1.41	3.21	6.14	Espl1	1.70	3.61	5.12
Alx3	-1.36	-1.5	-4.07	Cenph	1.59	2.88	4.48	Exo1	1.48	2.93	7.66
Apoc1	-1.20	-1.59	-5.77	Cenpi	1.49	3.16	5.70	Fam83d	1.97	3.69	4.23
Arhgap11a	1.57	2.66	4.36	Cenpk	1.47	2.49	4.40	Fanca	1.62	3.62	4.06
Asf1b	1.35	2.65	4.32	Cenpu	1.41	2.95	4.98	Fancb	1.37	1.99	4.18
Aspn	-1.29	-1.52	-7.76	Cenpw	1.63	3.04	4.47	Fanci	1.59	3.50	4.45
Atp1b1	-1.64	-2.00	-4.20	Ces1a	-1.17	-1.6	-8.10	Fbxo32	-1.06	1.06	-5.72
Aunip	1.75	3.91	6.85	Cfh	-1.34	-1.24	-7.06	Fbxo5	1.44	2.73	4.77
Aurkb	1.39	2.34	4.17	Cfhr2	-1.26	-1.55	-7.46	Fen1	1.23	2.44	4.24
Avil	1.95	4.72	9.48	Chadl	-2.32	-3.70	-13.67	Fhl1	1.00	2.04	7.42
Bard1	1.37	2.93	5.35	Chek1	1.49	2.70	5.94	Fign1	1.41	2.88	5.27
BC030867	1.49	2.75	5.27	Cib3	-1.52	-2.97	-14.73	Fosl1	1.02	1.28	5.07
Bcat1	1.33	1.69	4.59	Ckap2l	1.75	3.17	4.28	Foxm1	1.45	3.00	4.48
Bend5	-1.55	-2.03	-4.36	Cldn19	-1.77	-2.85	-5.88	Foxred2	-1.14	1.03	-4.14
Bglap2	1.02	-1.69	-4.81	Clec11a	-1.25	-1.42	-4.58	Fxyd1	-1.67	-4.38	-9.66
Bglap3	1.12	-1.56	-4.34	Clspn	1.72	1.92	7.43	Gdap111	1.32	1.99	4.14
Birc5	1.68	3.92	4.77	Cmb1	-1.29	-1.97	-12.90	Gdpd2	-1.96	-3.30	-16.52
Bmf	-1.17	-1.50	-5.02	Col27a1	-1.38	-3.15	-11.73	Gen1	1.60	2.99	4.90
Bmyc	1.08	1.16	6.62	Col5a3	-1.26	-1.81	-6.02	Ggt5	-1.81	-3.25	-13.29
Boc	-1.40	-1.69	-5.10	Cox6a2	1.37	2.24	5.30	Ghr	-1.17	-1.25	-5.35
Btg1	-1.02	-1.12	-4.01	Cp	-1.20	-1.04	-4.45	Gins1	1.25	2.07	4.62
Bub1	1.73	3.33	5.68	Crif1	-1.42	-1.88	-4.15	Glis1	-1.35	-1.87	-4.01
C3	-1.52	-1.91	-4.22	Cxcl10	1.62	2.30	6.70	Gm2022	1.89	3.48	5.30
Cacna1g	-1.95	-2.73	-17.72	D17H6S56E-5	1.28	1.81	4.84	Gm42151	-1.42	-1.39	-4.04
Calml4	-1.08	-1.06	-4.89	Dbf4	1.56	2.05	4.15	Gm4544	-1.04	-1.22	-4.65
Camsap3	-1.28	-1.68	-5.10	Dcp2	1.10	1.39	4.17	Gm45935	1.73	2.55	5.66
Capn6	-1.02	-1.22	-6.21	Ddx21	1.15	1.58	5.77	Gm4841	1.92	3.20	4.20
Car6	2.36	5.49	18.29	Depdc1b	1.68	3.79	4.89	Gm8300	2.02	3.65	4.32
Carns1	-1.38	-1.68	-4.52	Dhfr	1.35	1.93	6.17	Gmnn	1.54	3.26	4.45
Ccna2	1.58	3.49	4.93	Dleu2	-1.49	-1.74	-4.79	Gper1	1.23	1.29	-7.41
Ccnb1	1.87	5.09	4.66	Dlgap5	1.70	3.58	4.16	Gtse1	1.51	3.41	4.13
Ccnb1-ps	1.72	3.81	4.86	Dtl	1.52	3.42	6.67	Haspin	1.4	1.75	5.57
Cd247	-1.06	-5.8	-1.07	Dusp4	1.39	1.38	7.14	Hells	1.43	2.26	6.12
Cdc20	1.72	2.82	4.17	E2f2	1.46	2.61	4.82	Herc6	1.54	2.70	5.50
Cdc45	1.25	1.96	4.30	E2f7	1.30	2.56	4.49	Hid1	-1.03	-1.32	-5.83
Cdc6	1.30	2.25	8.03	Ebf1	-1.79	-2.73	-4.45	Hist1h1b	1.60	1.91	5.07

Gènes	FC NM203(1) vs H ₂ O	FC NM203(2) vs H ₂ O	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(1) vs H ₂ O	FC NM203(2) vs H ₂ O	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(1) vs H ₂ O	FC NM203(2) vs H ₂ O	FC NM203(5) vs H ₂ O
Hist1h2ab	1.38	1.13	4.16	Mki67	1.69	3.38	4.09	Ppp1r3c	-1.39	-1.89	-5.36
Hist1h2ai	1.31	1.18	4.01	Mif1	1.06	1.79	4.42	Prl2c1	1.39	2.62	20.07
Hist1h3c	1.26	1.05	4.10	Mmp2	-1.23	-1.33	-4.35	Prl2c3	1.52	3.58	24.22
Hist1h3i	1.47	1.27	4.41	Mmp3	-1.33	-1.37	-11.25	Prl2c5	1.51	3.17	18.44
Hist2h2aa1	-1.57	-2.62	-4.44	Mmp9	-1.55	-2.48	-11.00	Prokr1	-1.39	-2.41	-7.87
Hist2h2be	-1.55	-1.85	-6.09	Mmrn2	-1.45	-1.41	-4.57	Psat1	1.25	1.27	4.56
Hist2h3b	1.31	1.06	4.77	Mterf4	-1.37	-2.26	-7.2	Ptgds	-1.33	-2.49	-19.53
Hmgcs2	-2.17	-3.84	-40.86	Mx1	1.59	1.12	4.41	Ptgs2	1.20	1.55	6.83
Ifi205	1.78	4.32	7.08	Mybl2	1.30	1.99	7.20	Ptms	-1.02	-4.20	-1.36
Ifitm1	-1.21	-1.90	-8.55	Myc	1.07	1.05	5.72	Rab3il1	-1.15	-1.01	-4.40
Ifrd2	1.19	1.78	4.99	Mylk	-1.16	-1.49	-6.02	Racgap1	1.6	3.06	4.65
Igf2r	-1.26	-1.02	-6.87	Nasp	1.27	1.91	4.11	Rad18	1.41	3.63	4.96
Il1r1	1.43	2.60	6.59	Ncam1	-1.32	-1.61	-4.37	Rad51	1.42	2.86	5.52
Incenp	1.42	2.08	4.41	Ncapg	1.63	3.00	4.76	Rad51ap1	1.69	3.76	5.79
Islr	-1.29	-1.51	-5.02	Ndc80	2.08	3.85	4.90	Rad54l	1.81	2.90	5.08
Itga10	-1.17	-1.61	-8.47	Neil3	1.70	2.62	4.20	Rarres2	-1.90	-2.88	-4.93
Itgb7	1.36	2.48	4.81	Nek2	1.78	4.22	5.14	Rcc1	1.19	1.67	4.41
Itgb1	1.05	1.40	-4.59	Net1	1.45	2.71	4.87	Recql4	1.15	2.14	5.22
Kif11	1.90	2.19	4.29	Nlrp2	1.50	2.63	11.46	Rpph1	-1.44	-5.17	-1.20
Kif20b	1.76	3.85	4.30	Nop56	1.08	1.17	4.78	Rsad2	1.76	2.36	8.11
Kif22	1.64	3.36	4.33	Nrep	-1.14	-1.31	-7.41	S100b	-1.27	-1.44	-19.23
Kif23	1.78	3.42	4.10	Nsl1	1.74	2.87	5.73	Saa3	2.24	3.45	30.33
Kif2c	1.90	3.10	4.90	Nuf2	1.59	2.91	4.69	Sema3g	-1.83	-3.05	-7.09
Kn1	1.83	3.21	4.94	Oas1g	1.86	3.19	5.36	Sgf29	1.09	1.77	4.15
Lama4	-1.40	-2.40	-5.55	Oas3	1.81	2.93	4.55	Sgo1	1.76	3.23	6.13
Lcn2	1.13	1.38	6.64	Oas1	1.83	2.99	11.18	Sh2d3c	-1.21	-1.06	-4.13
Lgals7	-1.34	-2.19	-10.00	Oip5	1.65	3.30	4.58	Shcbp1	1.53	3.81	4.24
Lgi4	-1.61	-2.29	-5.10	Olf1388	1.07	-1.23	5.92	Shmt2	1.21	1.74	4.02
Lrr1	1.36	2.18	4.46	Orc1	1.42	3.54	5.85	Ska1	1.81	3.51	5.97
Ltbp2	-1.34	-1.62	-4.37	Orm3	-1.42	-1.96	-4.41	Slc22a1	-1.29	-1.55	-7.77
Lum	-1.72	-2.14	-8.99	Paxx	-1.33	-2.22	-5.01	Slc43a2	-1.32	-1.59	-4.72
Ly6a	1.82	2.10	4.06	Pbk	1.59	2.91	5.39	Slc7a11	1.44	1.57	6.92
Mad2l1	1.47	2.91	4.04	Pcdhb15	-1.34	-1.93	-4.03	Slc7a7	1.03	-1.01	-6.56
Mamstr	-1.14	-1.49	-7.21	Pcdhb9	-1.45	-2.08	-4.07	Slc9a3r2	-1.58	-2.14	-4.72
Mastl	1.83	2.52	4.20	Peg3	-1.54	-1.27	-4.28	Slc9a9	-1.17	-1.22	-5.62
Matn2	-1.33	-1.32	-5.44	Pf4	1.05	-1.16	-6.99	Slco2b1	-1.59	-2.59	-50.09
Mcm10	1.51	3.46	7.74	Phf11a	1.64	2.45	4.15	Slnf9	1.37	1.33	4.23
Mcm3	1.26	2.52	4.26	Phf11d	1.58	2.59	4.24	Sned1	-1.70	-3.15	-8.42
Mcm5	1.46	2.79	6.12	Plekha6	-1.31	-1.52	-8.16	Soat2	1.53	2.87	7.50
Mcm7	1.24	1.66	4.21	Plk1	1.79	4.07	5.35	Sorcs2	-2.02	-2.58	-9.46
Mcm8	1.38	2.04	4.28	Pole	1.53	1.96	4.65	Sort1	-1.27	-1.24	-4.23
Melk	1.64	3.04	5.27	Postn	-2.12	-5.09	-11.32	Spag5	1.87	4.19	4.00
Mir99ahg	-1.42	-2.56	-6.19	Ppargc1a	-1.01	-1.03	-4.00	Sparcl1	-1.8	-2.3	-22.98

Gènes	FC NM203(1) vs H ₂ O	FC NM203(2) vs H ₂ O	FC NM203(5) vs H ₂ O
Spc25	1.53	2.65	4.01
Spd1	1.28	2.44	4.09
Spib	-1.35	-2.13	-12.72
Spon2	-1.02	-1.19	-8.61
Ssu2	-1.42	-2.5	-5.58
St3gal1	-1.24	-1.35	-4.10
St6galnac2	-1.19	-4.64	1.26
Stab2	-1.20	-1.52	-7.00
Steap1	1.44	2.48	6.76
Sult5a1	-1.28	-2.31	-5.12
Tcf7l2	-1.42	-4.42	-2.27
Tex30	1.20	2.04	4.09
Thbs1	-1.35	-4.44	-1.06
Ticrr	1.79	4.16	7.82
Timeless	1.37	3.20	4.69
Timp4	-1.89	-2.67	-12.35
Tk1	1.39	2.08	4.55
Tnnt1	-1.62	-2.38	-5.13
Tnnt3	-1.36	-2.45	-5.52
Top2a	1.79	3.85	5.63
Tpx2	1.61	2.37	4.28
Traip	1.46	3.23	6.29
Trim63	-1.19	-1.89	-6.68
Trip13	1.35	2.63	6.13
Troap	1.96	3.41	4.71
Trpm5	-1.46	-2.10	-7.84
Ttk	1.64	3.04	4.76
Uhrf1	1.30	1.42	4.72
Wdhd1	1.14	2.26	4.53
Wfdc21	1.05	-1.35	-4.30
Xpnpep2	-1.36	-1.57	-5.55
Ypel1	-1.25	-2.65	-4.56
Ypel2	1.02	-1.29	-4.79
Zbp1	1.64	2.74	5.40
Zbtb7c	-1.13	-4.01	1.37
Zwilch	1.60	3.14	5.43
2010204K13Rik	1.13	1.38	5.68
2700099C18Rik	1.81	3.60	4.49
4933406K04Rik	-1.48	-4.69	1.10
A230065H16Rik	-1.35	-1.99	-14.00
C330020E22Rik	-1.28	-1.81	-4.58

Tableau annexe 3 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les cellules Bhas 42 suite à l'exposition à la SAS pyrogénée NM-203 à 5 µg/cm² en comparaison avec son témoin H₂O (p-value < 0,005 et FC >4).

Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O
Abcb9	-5.40	Cdc45	4.30	Ect2	4.88	Hist1h1b	5.07
Actn3	-6.01	Cdc6	8.03	Egfl7	-8.38	Hist1h2ab	4.16
Adamts12	-5.06	Cdca2	4.68	Enpp2	-8.67	Hist1h2ai	4.01
Adh1	-8.18	Cdca5	6.35	Erc6l	5.55	Hist1h3c	4.10
Adhfe1	-4.06	Cdca8	4.66	Esp1	5.12	Hist1h3i	4.41
Agt	-10.33	Cdt1	6.14	Exo1	7.66	Hist2h2aa1	-4.44
Alx3	-4.07	Cenph	4.48	Fam83d	4.23	Hist2h2be	-6.09
Apoc1	-5.77	Cenpi	5.70	Fanca	4.06	Hist2h3b	4.77
Arhgap11a	4.36	Cenpk	4.40	Fancb	4.18	Hmgcs2	-40.86
Asf1b	4.32	Cenpu	4.98	Fanci	4.45	Ifitm1	-8.55
Aspn	-7.76	Cenpw	4.47	Fbxo32	-5.72	lfrd2	4.99
Atp1b1	-4.20	Ces1a	-8.10	Fbxo5	4.77	Igf2r	-6.87
Aunip	6.85	Cfh	-7.06	Fen1	4.24	Il1rl1	6.59
Aurkb	4.17	Cfhr2	-7.46	Fhl1	7.42	Incenp	4.41
Avil	9.48	Chadl	-13.67	Figl1	5.27	Islr	-5.02
Bard1	5.35	Chaf1a	4.59	Fmod	-7.42	Itgb7	4.81
BC030867	5.27	Chek1	5.94	Fosl1	5.07	Itgbl1	-4.59
Bcat1	4.59	Ckap2l	4.28	Foxm1	4.48	Kif11	4.29
Bend5	-4.36	Clec11a	-4.58	Foxred2	-4.14	Kif20b	4.30
Bglap2	-4.81	Cmb1	-12.9	Gdap111	4.14	Kif22	4.33
Birc5	4.77	Col27a1	-11.73	Gdpd2	-16.52	Kif23	4.10
Bmf	-5.02	Col5a3	-6.02	Gen1	4.9	Kif2c	4.90
Bmyc	6.62	Cox6a2	5.30	Ggt5	-13.29	Kn1	4.94
Boc	-5.10	Crlf1	-5.99	Ghr	-5.35	Kntc1	5.03
Bub1	5.68	Cxcl10	6.70	Gins1	4.62	Lama4	-5.55
C3	-4.22	D17H6S56E-5	4.84	Gm2022	5.30	Lcn2	4.70
Cacna1g	-17.72	Dbf4	4.15	Gm42151	-4.04	Lgals7	-10.00
Calml4	-4.89	Dcp2	4.17	Gm45935	5.66	Lgi4	-5.10
Camsap3	-5.10	Ddx21	5.77	Gm4841	4.20	Lrr1	4.46
Capn6	-6.21	Depdc1b	4.89	Gm8300	4.32	Ltbp2	-4.37
Car6	18.29	Dhfr	6.17	Gmnn	4.45	Lum	-8.99
Carns1	-4.52	Dleu2	-4.79	Gtse1	4.13	Ly6a	4.06
Ccna2	4.93	Dtl	6.67	Haspin	5.57	Mad211	4.04
Ccnb1	4.66	Dusp4	7.14	Hells	6.12	Mastl	4.20
Ccnb1-ps	4.86	E2f7	4.49	Herc6	5.50	Matn2	-5.44
Cdc20	4.17	Ebf1	-4.45	Hid1	-5.83	Mcm10	7.74

Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O
Mcm3	4.26	Peg3	-4.28	Sfn9	4.23
Mcm5	6.12	Pf4	-6.99	Sned1	-8.42
Mcm7	4.21	Phf11a	4.15	Soat2	7.50
Mcm8	4.28	Phf11d	4.24	Sort1	-4.23
Melk	5.27	Plekha6	-8.16	Spag5	4.00
Mki67	4.09	Plk1	5.35	Sparcl1	-22.98
Mlf1	4.42	Pole	4.90	Spc25	4.01
Mmp2	-4.35	Postn	-11.32	Spdl1	4.09
Mmp9	-11.00	Ppp1r3c	-5.36	Spib	-12.72
Mmrn2	-4.57	Pri2c1	20.07	Spon2	-8.61
Mrgprf	-4.47	Pri2c3	24.22	Ssu2	-5.58
Mterf4	-7.20	Pri2c5	18.44	St3gal1	-4.10
Mx1	4.41	Prokr1	-7.87	Steap1	6.76
Mybl2	7.20	Psat1	4.56	Tex30	4.09
Myc	5.72	Ptgsd	-19.53	Ticrr	7.82
Mylk	-6.02	Ptgs2	6.83	Timeless	4.69
Nasp	4.11	Rab3il1	-4.40	Timp4	-12.35
Ncam1	-4.37	Racgap1	4.65	Tk1	4.55
Ncapg	4.76	Rad51	5.52	Tnnt1	-5.13
Ndc80	4.90	Rad51ap1	5.79	Top2a	5.63
Neil3	4.20	Rad54l	5.08	Tpx2	4.28
Nek2	5.14	Rcc1	4.41	Traip	6.29
Net1	4.87	Recql4	5.22	Trim63	-6.68
Nlrp2	11.46	Rsad2	8.11	Trip13	6.13
Nop56	4.78	S100b	-19.23	Trpm5	-7.84
Nrep	-7.41	Saa3	30.33	Ttk	4.76
Nsl1	5.73	Sema3g	-7.09	Uhrf1	4.72
Nuf2	4.69	Sgf29	4.15	Wfdc21	-4.3
Oas1g	5.36	Sgo1	6.13	Xpnpep2	-5.55
Oas3	4.55	Shcbp1	4.24	Ypel1	-4.56
Oasl1	11.18	Shmt2	4.02	Ypel2	-4.79
Oip5	4.58	Ska1	5.97	Zbp1	4.96
Olf1388	5.92	Ska3	5.27	Zwilch	5.43
Orc1	5.85	Slc22a1	-7.77	2010204K13Rik	5.68
Orm3	-4.41	Slc43a2	-4.72	2700099C18Rik	4.49
Paxx	-5.01	Slc9a3r2	-4.72	A230065H16Rik	-14.00
Pbk	5.39	Slc9a9	-5.62	C330020E22Rik	-4.58
Pcdhb15	-4.03	Slco2b1	-50.09		

Tableau annexe 4 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les cellules Bhas 42 suite à l'exposition à la silice cristalline Min-U-Sil 5® à 20 µg/cm² en comparaison avec son témoin H₂O (p-value < 0,005 et FC >4).

Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O
Actn3	-4.12	Gm4836	4.20	Prokr1	-4.39
Agt	-7.32	Gper1	-4.97	Ptgds	-8.39
Akr1b7	5.65	Gsta2	5.96	Ptprv	-5.73
Aoc3	-4.26	Gsta3	8.68	Rad51ap1	4.20
Aspn	-4.52	Hells	4.25	Recql4	4.13
Aunip	4.26	Hmgcs2	-15.04	S100b	-10.15
Avil	10.09	Ifitm1	-5.21	Saa3	15.61
C3	-4.82	Igf2	-4.53	Sema3g	-4.61
C5ar2	4.56	Il1r1	5.63	Sgo1	4.25
Cacna1g	-10.30	Islr	-4.29	Ska3	4.17
Car6	17.77	Itga10	-6.45	Slc43a2	-4.04
Cdc6	5.86	Itgb7	4.53	Slc7a11	7.04
Ces1a	-5.47	Kera	-6.22	Slco2b1	-20.48
Ces1d	-8.87	Kntc1	4.43	Sned1	-4.55
Cfh	-4.81	Lce1g	4.82	Sparcl1	-12.51
Cfhr2	-4.09	Lgals7	-7.55	Spib	-12.43
Chadl	-10.91	Lum	-5.32	Spon2	-4.71
Chaf1a	4.31	Maats1	12.13	Ssu2	-4.03
Chek1	4.25	Mamstr	-4.82	Steap1	5.38
Cib3	-4.83	Mcm10	5.27	Ticrr	4.14
Cmb1	-7.04	Mcm5	4.23	Timp4	-6.34
Col27a1	-4.70	Mep1a	4.70	Tnnt1	-4.10
Cox6a2	4.07	Mmp3	-4.42	Tnnt3	-6.47
Cyp2j9	-4.06	Mmp9	-5.61	Trim63	-4.23
Ddx21	4.17	Mterf4	-5.39	Trip13	4.10
Dtl	4.42	Myc	4.90	Xpnpep2	-4.10
Dusp4	5.18	Mylk	-4.29	A230065H16Rik	-6.21
Egfl7	-5.95	Nlrp2	7.31		
Enpp2	-5.07	Nrep	-4.28		
Exo1	5.73	Orc1	4.61		
Fos1	4.64	Orm3	-4.23		
Gdpd2	-8.46	Plekha6	-5.61		
Gen1	4.09	Postn	-12.85		
Ggt5	-11.98	Pri2c1	14.78		
Gm10639	5.74	Pri2c3	19.25		
Gm4788	-4.11	Pri2c5	14.77		

Tableau annexe 5 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les cellules Bhas 42 suite à l'exposition Au TPA en comparaison avec son témoin DMSO (p-value < 0,005 et FC >4).

Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O	Gènes	FC NM203(5) vs H ₂ O
Anln	5.03	Kif11	4.75	Sema3g	-5.91
Arhgap11a	4.61	Kif14	4.74	Sgo1	4.41
Arhgef39	4.62	Kif20a	4.41	Shcbp1	4.03
Aspm	4.68	Kif20b	4.61	Ska1	4.89
Aunip	4.13	Kif23	4.63	Spag5	4.55
Aurka	5.60	Kif2c	5.40	Sparcl1	-4.27
Aurkb	4.09	Kif4	4.88	Spc24	4.28
Birc5	4.51	Kn1	4.42	Spc25	4.11
Bub1	4.40	Lgals7	-4.16	Tacc3	4.08
Bub1b	5.47	Lum	-4.28	Timp4	-15.73
Cacna1g	-4.63	Mastl	4.59	Tk1	4.07
Ccna2	5.65	Mcm10	4.02	Top2a	5.01
Ccnb1	4.84	Mki67	4.21	Ttk	5.42
Ccnb1-ps	4.27	Mlana	-9.10	Ube2c	4.37
Ccnb2	4.62	Msln	4.26	Wisp2	5.76
Cdc20	4.12	Mxd3	5.13	2700099C18Rik	4.65
Cdc25c	4.16	Ncaph	4.08	A230065H16Rik	-4.07
Cdc45	4.12	Ndc80	5.23		
Cdca8	4.13	Neil3	4.40		
Cenpa	4.46	Nek2	4.41		
Cenpf	4.92	Nlrp2	10.24		
Cenpm	4.25	Nsl1	4.50		
Ckap2l	5.30	Nuf2	4.50		
Cmb1	-4.31	Nusap1	5.75		
Cyb561	5.02	Oip5	4.96		
Depdc1a	4.42	Pbk	4.61		
Depdc1b	4.39	Pimreg	5.17		
Enpp2	-7.04	Plk1	4.28		
Espl1	4.26	Postn	-16.50		
Fam83d	5.95	Prc1	4.37		
Gdpd2	-4.31	Pr12c1	11.30		
Gm8300	4.04	Pr12c3	17.45		
Hmgcs2	-13.38	Pr12c5	11.26		
Hmmr	5.20	Racgap1	4.24		
Il1rl1	4.74	Rad51ap1	4.12		
Iqgap3	5.56	Sapcd2	4.11		



In vitro cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles

Caroline Fontana, Anaïs Kirsch, Carole Seidel, Léa Marpeaux, Christian Darne, Laurent Gaté, Aurélie Remy, Yves Guichard^{*}

Institut National de Recherche et de Sécurité, Département de Toxicologie et de Biométrie, 1 rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandœuvre Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Synthetic amorphous silica
Nanomaterial
Cell transformation assay
Bhas 42

ABSTRACT

Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS) are among the most widely produced and used nanomaterials, but little is known about their carcinogenic potential. This study aims to evaluate the ability of four different SAS, two precipitated, NM-200 and NM-201, and two pyrogenic, NM-202 and NM-203, to induce the transformation process. For this, we used the recently developed in vitro Bhas 42 cell transformation assay (CTA). The genome of the transgenic Bhas 42 cells contains several copies of the v-Ha-ras gene, making them particularly sensitive to tumor-promoter agents. The Bhas 42 CTA, which includes an initiation assay and a promotion assay, was validated in our laboratory using known soluble carcinogenic substances. Its suitability for particle-type substances was verified by using quartz Min-U-Sil 5 (Min-U-Sil) and diatomaceous earth (DE) microparticles. As expected given their known transforming properties, Min-U-Sil responded positively in the Bhas 42 CTA and DE responded negatively. Transformation assays were performed with SAS at concentrations ranging from 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Results showed that all SAS have the capacity to induce transformed foci, interestingly only in the promotion assay, suggesting a mode of action similar to tumor-promoter substances. NM-203 exhibited transforming activity at a lower concentration than the other SAS. In conclusion, this study showed for the first time the transforming potential of different SAS, which act as tumor-promoter substances in the Bhas 42 model of cell transformation.

1. Introduction

The worldwide production of synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS) was estimated to be one million tons per year in 2006. These nanomaterials are used in many industrial applications such as chemistry, pharmaceuticals, cosmetics and foods [1]. Two main forms of SAS are produced in industries: precipitated SAS, obtained by acidification of sodium silicate under wet conditions; and pyrogenic SAS, obtained by hydrolysis of SiCl_4 at high temperature [2]. Because of their amorphous crystal phase, SAS belong to the group of silica particles that are not classifiable as to their carcinogenicity to humans (Group 3), according to the International Agency for Research of Cancer (IARC) [3]. However, there is a lack of information about the cancer risk associated with SAS exposure. A full assessment of the hazards and risks for producers and users of these nanomaterials is therefore necessary.

Several in vitro and in vivo studies have reported cytotoxic and inflammatory effects induced by SAS of various origins and characteristics [2,4]. Data on the genotoxic properties of SAS, mostly assessed by

the comet assay for detecting DNA damage or by the micronucleus assay for chromosomal damage, are however less clear. Generally, positive responses in genotoxicity assays are reported more frequently in vitro [5–9] than in vivo [10–12]. However, in vitro results remain quite variable and depend on the physical and chemical characteristics of the SAS and the cell type used. On the other hand, little is known about the carcinogenic potential of SAS. To our knowledge, only one long-term carcinogenesis study in rats and one in vitro study using a cell transformation assay (CTA) have been published to date [13,14].

The aim of the present study was to investigate the capacity of four different SAS (NM-200, NM-201, NM-202 and NM-203) to induce cell transformation. We therefore used the in vitro Bhas 42 CTA, which was recently the subject of a guidance document produced by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) [15].

The principle of this assay is the following [15,16]: the transgenic Bhas 42 cell line, established from Balb/c 3T3 cells, contains several copies of the v-Ha-ras gene. Similar to the parental Balb/c 3T3 cells, untransformed Bhas 42 cells grow to confluence forming a density-

^{*} Corresponding author.

E-mail address: yves.guichard@inrs.fr (Y. Guichard).

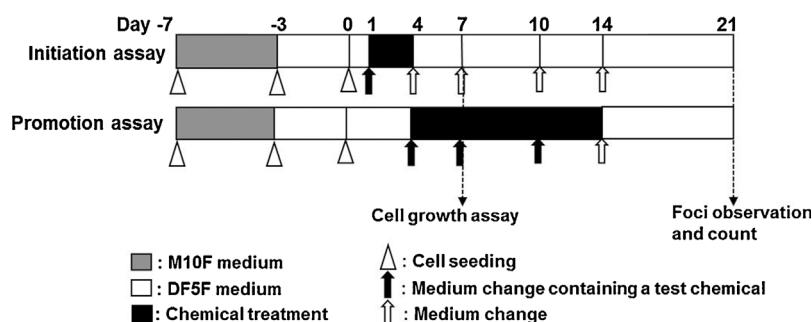


Fig. 1. Schematic representation of the Bhas 42 cell transformation assay, which includes the initiation and the promotion assay. Cytotoxic effect was assessed by cell growth assays performed on Day 7. On Day 21, cells were fixed with ethanol and stained with Giemsa solution and transformed foci were analysed under a microscope.

dependent contact-inhibited monolayer. However, after exposure to transforming stimuli, such cells become morphologically altered and form discrete colonies, referred to as transformed foci, atop the confluent monolayer. Interestingly, because they contain an activated oncogene, Bhas 42 cells can respond to tumor-promoter substances without undergoing preliminary treatment with an initiating substance, in contrast with other two-stage cell transformation models. Furthermore, tumor-initiator substances can also transform Bhas 42 cells, for example, by inducing mutation of transformation-related genes (oncogenes and/or tumor suppressor genes). Based on this, the Bhas 42 CTA two transformation assays were performed in parallel (Fig. 1). In the initiation assay, cells are seeded at low density and then treated once during the cell-growth phase (from Day 1 to Day 4). Cells are allowed to replicate and are then fixed and stained on Day 21 after plating for evaluation of the resulting transformed foci. These seeding and treatment conditions enable DNA damage and mutation fixation and favor the initiating activity of chemicals. In the promotion assay, cells are seeded at higher density. A first treatment is started at sub-confluence and is then repeated twice during a 10 day period (from Day 4 to Day 14). As in the initiation assay, the cells are then fixed and stained on Day 21 after plating. These conditions allow cell-to-cell communication and favor the promoting activity of chemicals. Thus, Bhas 42 cells can be used not only for the screening of chemicals with transforming activity but also for studying mechanisms of cell transformation.

In the present study, the suitability of the Bhas 42 CTA for particle-type substances was assessed using crystalline (quartz Min-U-Sil 5) and amorphous (diatomaceous earth) silica microparticles that have been previously evaluated for their transforming activity in the Syrian hamster embryonic (SHE) CTA [17,18].

2. Materials and methods

2.1. Particles

SAS (NM-200, NM-201, NM-202, and NM-203) were obtained from the Joint Research Centre nanomaterials repository (Ispra, Italy). Min-U-Sil 5 (Min-U-Sil) was obtained from US Silica Co. (Berkeley). Diatomaceous earth (DE) was obtained from CECA (Paris, France). A thorough physical and chemical characterisation of SAS batches was conducted in a previous study [19] (Table 1). Min-U-Sil and DE batches have also been characterised previously [17].

2.2. Cell culture

Bhas 42 cells were established from the *v-Ha-ras*-transfected BALB/c 3T3 cells by Sasaki et al. [20]. Frozen Bhas 42 cells at passage 19 were obtained from Harlan Laboratories (Rossdorf, Germany). In order to generate a large batch of cells from the same pool, the cells were cultivated in Eagle's minimum essential medium (Invitrogen, France), supplemented with 1% antibiotic (Streptomycin and Penicillin, Invitrogen) and 10% fetal bovine serum (FBS, Dutscher, France) (M10F) in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. When the cultures reached

about 70% confluence, they were subcultured using 0.25% trypsin (Invitrogen). Within two passages after thawing, the cultured cells were suspended at 5×10^5 cells/mL in fresh M10F containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, France), frozen in 0.5 mL volumes at -80 °C and stored in liquid nitrogen. All CTA performed in this study used this frozen batch of cells (passage 22), which was confirmed to be free from mycoplasma contamination. Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (Invitrogen) supplemented with 1% antibiotic and 5% FBS (DF5F) was used for CTA. The batch of FBS used throughout this study was pre-screened to produce a minimal number of transformed foci in the Bhas 42 cells treated with the solvent control, DMSO, and a substantially elevated number of transformed foci in the cells treated with positive controls, 3-methylcholanthrene (MCA, Sigma Aldrich) at 1 µg/mL in the initiation assay or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, Sigma Aldrich) at 0.05 µg/mL in the promotion assay [15].

2.3. Cell treatment with particles

Particle powders were mixed in a 20 mL glass vial with sterile de-ionized water. The concentration of particles was adjusted to 4.8 mg/mL for Min-U-Sil and 19.2 mg/mL for DE and SAS. The tube was placed in the cup horn of a 400 W Branson Sonifier S-450D (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, CT) containing ice-cold water and then sonicated for 5 min at 10% amplitude. Particle size distribution was analysed by dynamic light scattering (DLS), using a Malvern Nano ZS (Malvern Inc., UK), immediately after preparation. For cell treatment, serial dilutions were prepared in sterile de-ionized water from the sonicated suspension. An appropriate volume of each of these preparations was diluted ten times for Min-U-Sil and fifty times for DE and SAS in DF5F (see Section 2.4). Final particle concentrations were expressed as mass per cell culture surface area. The concentrations were tested ranged from 5 µg/cm² to 100 µg/cm² for Min-U-Sil and from 2 µg/cm² to 80 µg/cm² for DE and SAS.

2.4. CTA and concurrent cell growth assays

The CTA and concurrent cell growth assays in their six-well format were performed in accordance with the recommendations of the OECD [15]. The protocol is based on an initiation assay and a promotion assay and is illustrated in Fig. 1. One tube of the frozen Bhas 42 cells (passage 22) was thawed and grown in M10F up to about 70% confluence and then subcultured in DF5F to reach about 70% confluence again. The cells were trypsinised and suspended either at a density of 2000 cells/ml for seeding in 2 mL volume intended for the initiation assay (4000 cells/well, Day 0), or at a density of 7000 cells/ml for seeding in 2 mL volume intended for the promotion assay (14,000 cells/well, Day 0). In the initiation assay, the cells were treated 24 h after seeding (Day 1) by the addition of a particle suspension, MCA solution (1 mg/mL), or the vehicles (sterile de-ionized water or DMSO). The treatment was continued for 72 h (Day 4). Next, all treatment media were removed, and the cells were post-cultivated in fresh medium until Day 21, receiving

Table 1
Physical characteristics of silica particles used in this study.

Silica ^a	Origin	Main phase	Primary particle size ^b	Impurities (wt%) ^c	BET SSA (m ² /g) ^d	DLS ^e	
						Z-average in Water (nm)	Polydispersity index
NM-200	Precipitated	Amorphous	18.3 ± 4.5 nm	Al (0.87); Na (0.88); S (0.46)	189	ND ^f	ND
NM-201	Precipitated	Amorphous	18.0 ± 1.0 nm	Al (0.74); Na (0.44); S (0.46)	140	252.9 ± 11.3	0.583 ± 0.019
NM-202	Pyrogenic	Amorphous	17.7 ± 2.5 nm	Al (0.45); Ca (0.18)	204	232.8 ± 7.3	0.441 ± 0.012
NM-203	Pyrogenic	Amorphous	24.7 ± 17.7 nm	Al (0.43); S (0.04)	204	318.7 ± 4.9	0.423 ± 0.026
Min-U-Sil	Natural	Crystalline	1.33 ± 0.85 μm	Al (0.16); Fe (0.05); Ca (0.04); Mg (0.01)	5	1385.7 ± 377.0	0.318 ± 0.130
DE	Natural	Amorphous	1.35 ± 1.48 μm	Al (1.4); Fe (1.3); Ca (2.2); Ti (0.3); Mg (0.2)	20	ND	ND

^a With the exception of DLS data, detailed physical and chemical characterizations are available in [19] for SAS and [17] for Min-U-Sil and DE.

^b Primary size was determined by transmission electron microscopy.

^c Impurities were determined by energy dispersive spectrometry for SAS and by inductively coupled plasma spectrometry for Min-U-Sil and DE.

^d The BET (Brunauer-Emmet-Teller) specific surface area (SSA) was determined by nitrogen adsorption.

^e Dynamic light scattering (DLS) was performed using a Nanozetaser (Malvern). Samples were dispersed in water as described in the Materials and Methods section. Values represent the mean ± standard deviation of three DLS analyses.

^f Not determined, data obtained by DLS analysis did not meet the quality criteria.

medium exchanges on Day 7, Day 10 and Day 14. In the promotion assay, the cells were cultured after seeding for four days without a medium exchange. In the regular CTA promotion assay (Fig. 1), the culture medium was replaced on Day 4, Day 7, and Day 10 with a fresh medium containing particle suspensions, TPA solution (0.05 mg/mL) or the vehicles, and the treatment in the promotion phase was continued until Day 14 (for a total of 10 days). Observations of the cell cultures under a microscope showed that the majority of the tested particles were removed after each culture medium change. The cells were then cultured in the normal medium without the test chemical for one week until Day 21. A modified CTA promotion assay was also performed, in which cells were treated for three days only once, on Day 4. The cells were then post-cultivated in fresh medium until Day 21, receiving medium exchanges on Day 7, Day 10 and Day 14. For all CTA, the cells were fixed with ethanol and stained with a 5% Giemsa solution (Fisher, France) on Day 21 and the transformed foci were evaluated according to the morphological criteria recommended by OECD [15]. For each experiment, the mean of the number of transformed foci per treatment group was determined from the six replicate wells. Statistical analysis was performed on results obtained from three independent experiments. CTA results were considered positive when there were two or more sequential concentrations that induced statistically significant increases in the number of transformed foci, and negative when no concentration showed a statistically significant increase in foci.

Cell growth assays were performed on Day 7. The colorimetric method (with crystal violet) recommended by OECD [15] could not be applied to cultures treated with nano- or microparticles because the presence of particle agglomerates in wells interfered with the measure of the optical density. The Trypan-Blue exclusion method was used as alternative method. In a single well dedicated to the growth assay, cells were recovered using 0.25% trypsin, stained with 0.1% Trypan-Blue solution (Sigma-Aldrich), and then counted under a microscope using a Nageotte hemocytometer. The relative cell growth of cultures treated with particles was calculated as follows:

$$\text{Relative cell growth (\%)} = [(\text{Treatment})/(\text{Control})] \times 100$$

where “Treatment” and “Control” refer to the number of viable cells counted in each treatment group and the vehicle control group, respectively. The concentration of particles used to assess their transformation activity was selected according to the results of two independent cell growth assays. These concentrations ranged from little or no toxicity to the highest acceptable level of toxicity (less than 20% survival compared to the vehicle control) [15]. The maximum particle concentration did not exceed 80 or 100 μg/cm² in any case because the higher concentrations could have smothered cell cultures.

2.5. Statistical analysis

Data are given as a mean ± standard deviation (mean ± SD). Statistical analyses were performed using Stata 14.0 software. A logarithmic transformation was applied to the data. The mixed linear regression model was used to test the “dose” fixed effect, including a random effect “experience”. A multiple comparisons post hoc test (with Bonferroni correction) was applied to test the difference between control and different levels of doses. The statistical significant level was set to 5%.

3. Results

3.1. Transforming effect of MCA and TPA

MCA (1 μg/mL) and TPA (0.05 μg/mL) were used as positive controls in all cell transformation assays performed with silica micro- and nanoparticles. In this study, the average number of transformed foci per well induced by MCA in initiation assays was 13.2 ± 3.1, versus 3.2 ± 1.6 transformed foci in the control (0.1% DMSO), and the average number of transformed foci per well induced by TPA in promotion assays was 14.9 ± 3.0, versus 5.7 ± 2.0 transformed foci in the control (0.1% DMSO). Images of transformed foci obtained from CTA are shown in Fig. S1 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.002>.

3.2. Transforming effect of Min-U-Sil and DE

Bhas 42 CTA results are shown in Fig. 2 and photographs of representative CTA are shown in Fig. S2 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.002>. Min-U-Sil induced a decrease in cell proliferation in a concentration-dependant manner in the initiation assay, with a 50% inhibitory concentration (IC50) of around 20 μg/cm². In contrast, the IC50 was not reached in the promotion assay. DE induced a decrease in cell proliferation in a concentration-dependant manner in the initiation assay with an IC50 of around 20 μg/cm². In the promotion assay the IC50 was reached at 80 μg/cm².

In the initiation assay, Min-U-Sil treatment did not increase the number of transformed foci compared to the control. In the promotion conditions, however, Min-U-Sil treatment induced cell transformation, producing a bell-shaped response with a lowest observed adverse effect level (LOAEL) at 15 μg/cm². In contrast, DE did not show any transforming activity at any of the concentrations tested in the initiation and promotion assays. On the contrary, the number of transformed foci decreased with the increase of particle concentrations.

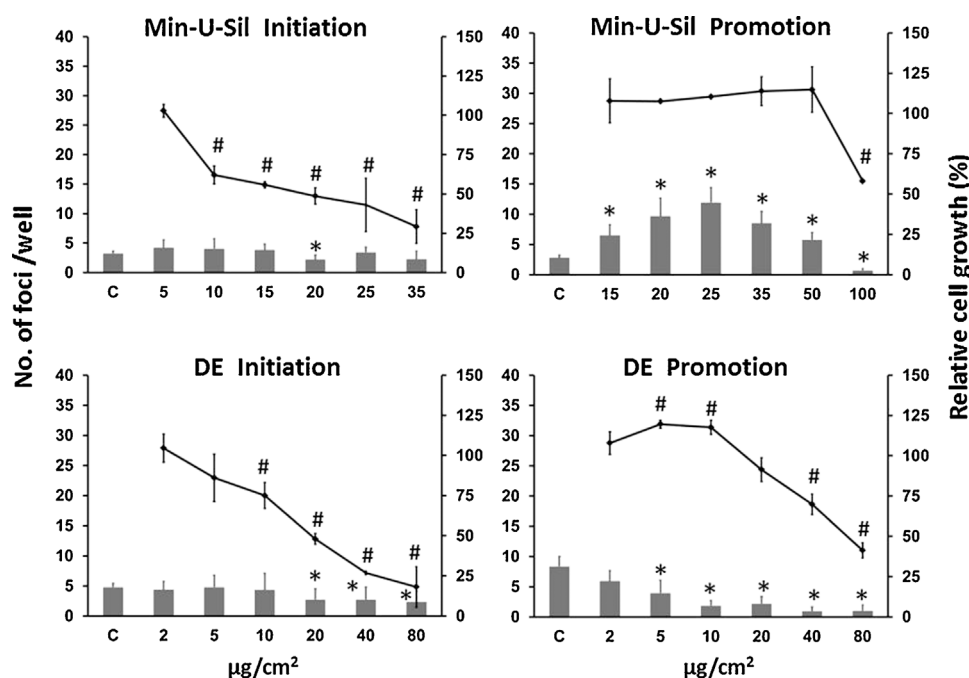


Fig. 2. Results of initiation and promotion Bhas 42 CTA (histogram, $n = 6$, $* p < 0.05$) and cell growth assays (curve, $\# p < 0.05$) on Min-U-Sil and diatomaceous earth (DE). C: control (treatment with 10% H₂O for Min-U-Sil or 2% H₂O for DE). Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments for CTA or two independent experiments for cell growth assays.

3.3. Transforming effect of SAS

Bhas 42 CTA results are shown in Fig. 3 and images of representative CTA are shown in Fig. S2 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.002>. With the exception of NM-200 treatment in the initiation assay, all SAS decreased cell proliferation in a concentration-dependant manner in both the initiation and promotion assay. In the initiation assay, the IC₅₀ were around 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NM-201 and NM-202, and around 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NM-203. In the promotion assay, NM-202 and NM-203 showed the lowest IC₅₀, at around 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, while for NM-200 and NM-201, the IC₅₀ was reached at 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

In the initiation assay, none of the SAS substantially increased the number of transformed foci compared to the control. In contrast, in the promotion assay, the four SAS significantly increased the number of transformed foci at least two sequential concentrations. A bell-shaped pattern of cell transformation was observed for all SAS. The LOAEL for cell transformation was observed at 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NM-203, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NM-200 and NM-202 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NM-201.

3.4. Transforming effect of Min-U-Sil and NM-203 in the promotion assay performed with a single treatment

The Transforming activity of Min-U-Sil and NM-203 were tested in a modified promotion assay, in which Bhas 42 cells were treated only on Day 4 (Fig. 4). Under these experimental conditions, both treatments increased the average number of transformed foci compared to the control, but at a lower magnitude than under the conditions of the regular promotion assay (with three sets of treatment as shown in Figs. 2 and 3). The LOAEL for cell transformation was observed at 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for Min-U-Sil and at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NM-203.

4. Discussion

Few data are available on the carcinogenic potential of SAS. To our knowledge, only one *in vivo* carcinogenesis study is reported in the literature. This study showed that five repeated intratracheal instillations of SAS in rats (3 mg per instillation) increased the incidence of lung tumours [13]. Interestingly, the characteristics of the SAS used in the study of [13] were very similar to NM-203. On the other hand, an *in vitro* cell transformation assay using Balb/c 3T3 cells showed no

transforming activities for different SAS, including NM-200 and NM-203 [14].

In the present study, we used an *in vitro* model of cell transformation; the transgenic Bhas 42 cells that are particularly sensitive to tumor-promoter substances but also being sensitive to tumor-initiator substances [16]. A validation study covering 98 chemicals established an 84% specificity of the Bhas 42 CTA towards carcinogens and non-carcinogens [21].

In this study, the numbers of transformed foci obtained in control culture and in treated culture (MCA in the initiation assay and TPA in the promotion assay) were in agreement with those previously published [21,22]. At the beginning of our study, the Bhas 42 CTA had not yet been tested with particle-type substances. Thus, we first submitted the assay to a known carcinogenic silica (Min-U-Sil) and to an amorphous silica (DE) so far not classified as carcinogenic [3,23]. As expected, the Bhas 42 CTA was also able to detect the transforming activity of Min-U-Sil, but interestingly only in the promotion assay. DE treatment did not induce cell transformation, but decreased the number of transformed foci in the initiation and promotion assays. Other non-carcinogen chemicals such as L-ascorbic acid or caffeine have been found to lower the number of spontaneous transformed Bhas 42 foci [21]. Nevertheless, the fact that DE did not induce cell transformation in the Bhas 42 assay strongly supports its specificity towards particle-type substances.

In this study, we focused on the transforming potential of representatives of pyrogenic or precipitated SAS produced in industry. Interestingly, the same batches of SAS were evaluated for their toxicological effect in previous *in vivo* or *in vitro* studies. All four SAS were able to cause lung inflammation in rats by intratracheal instillation, but did not induce any DNA damage, neither in the lung nor in other secondary organs [11]. Similarly, none of them induced DNA damage in different tissues of rats exposed by gavage. However, a weak genotoxic effect was detected by the micronucleus assay in colon cells from rats treated by gavage with the two pyrogenic silica nanoparticles (NM-202 and NM-203) [12]. On the other hand, the four silica nanoparticles that we used were unable to induce *in vitro* micronuclei in human lymphocytes [8], and micronucleus assays were negative in Balb/c 3T3 exposed to NM-200 or NM-203 [14].

To our knowledge, our study is the first study to have shown the *in*

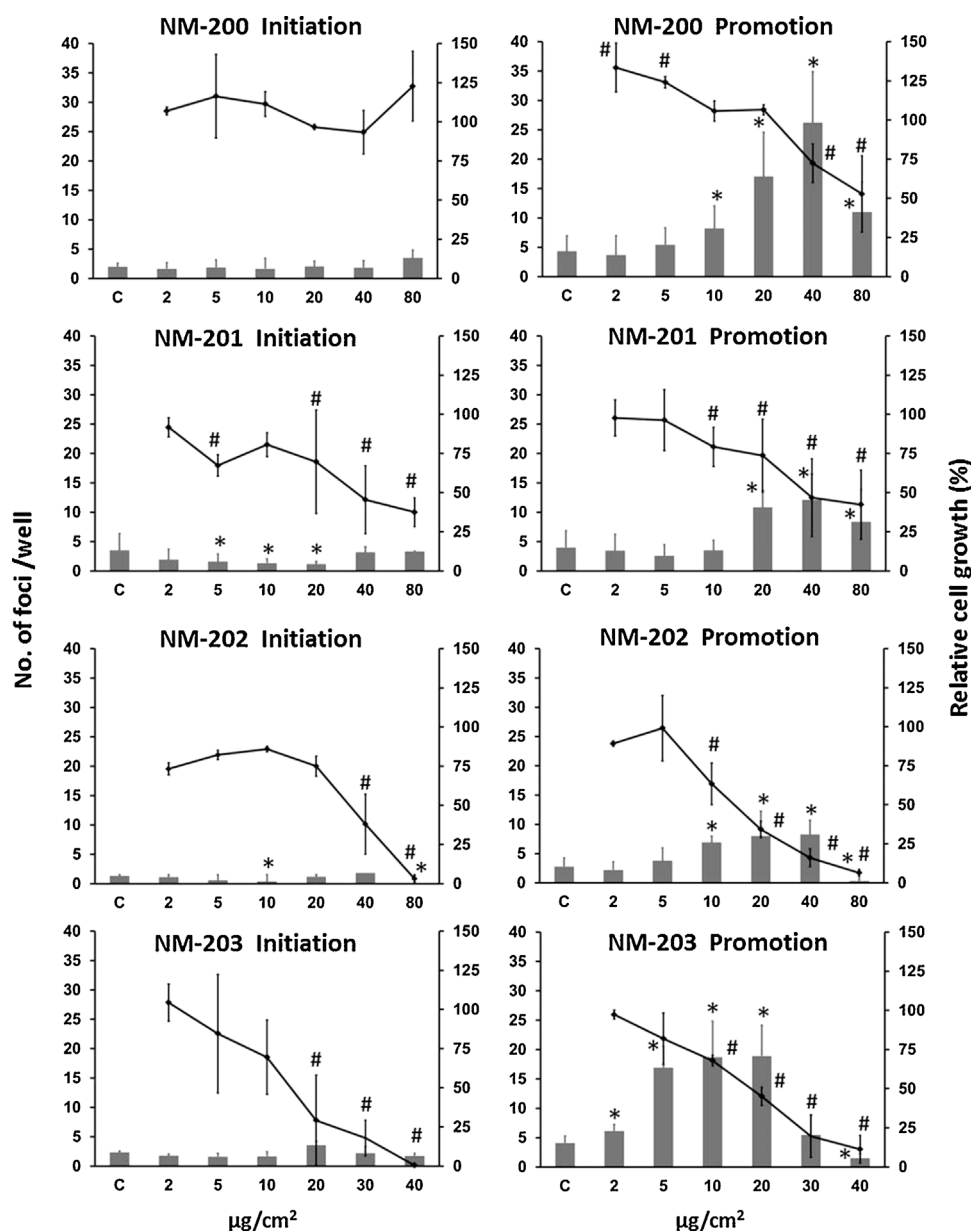


Fig. 3. Results of initiation and promotion Bhas 42 CTA (histogram, $n = 6$, $*p < 0.05$) and cell growth assays (curve, $\# p < 0.05$) on SAS. C: control (treatment with 2% H₂O). SAS: synthetic amorphous silica nanoparticles. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments for CTA or two independent experiments for cell growth assays.

in vitro transforming activity of SAS. Cell proliferation assays indicated higher levels of cytotoxicity for the pyrogenic SAS (NM-202 and NM-203) compared to the precipitated SAS. Interestingly, Tavares et al. did not observe any cytotoxic activity after 30 h treatment in human lymphocytes with any of the four SAS [8]. In our study, all SAS exhibited a bell-shaped-patterned transforming effect in the promotion assay. The decrease in cell transformation observed at the highest concentration of

SAS can probably be explained by more pronounced growth inhibition after 21 days of culture, which is emphasised by the application of three sets of treatment. This type of pattern has also been observed for soluble transforming substances in the Bhas 42 CTA [15,21]. Of the four SAS tested in the Bhas 42 CTA, NM-203, having induced cell transformation at the lowest concentration (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), appeared to have the highest transforming potency. Rasmussen et al. reported that NM 203 particle

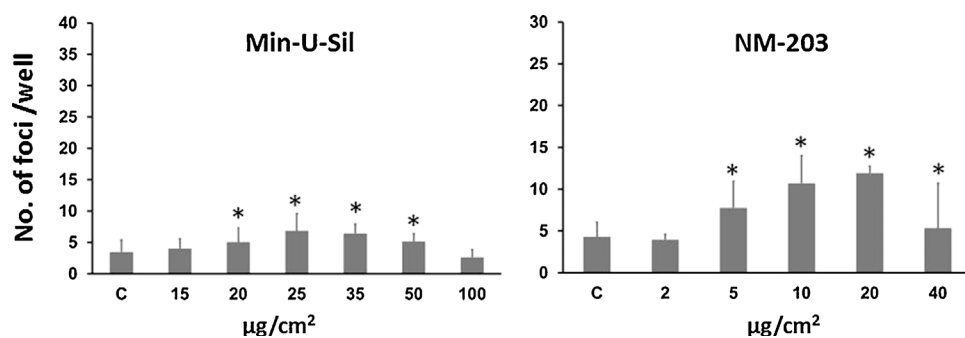


Fig. 4. Results of the modified promotion Bhas 42 CTA (treatment on Day 4 only) (histogram, $n = 6$, $*p < 0.05$) on Min-U-Sil and NM203. C: control (treatment with 10% H₂O for Min-U-Sil or 2% H₂O for NM-203). Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments for CTA.

aggregates possessed a particularly complex fractal structure that is associated with high production of oxygen species in aqueous solution [19]. This observation could explain the differential transforming effect of NM-203 compared to the other SAS.

Like with Min-U-Sil, the transforming effect of the four SAS was only detected under experimental conditions of promotion. On the other hand, the absence of any transforming effects of SAS in the initiation assay is consistent with the lack of genotoxicity of NM-200 or NM-203 previously shown in the Balb/c 3T3 cells [14]. Together, these observations suggest that the mode of action of SAS is similar to that of tumor-promoter agents. In order to test this hypothesis, we modified the promotion assay, performing only a single treatment of Min-U-Sil or NM-203 instead of the usual three sets of treatment. We observed that Min-U-Sil and NM-203 were still capable of inducing cell transformation, but at a lower magnitude than in the original procedure. This demonstrated the importance of the role of cell confluence at the time of treatment with either type of silica particles; cell confluence was much higher under the promotion conditions than it was under the initiation conditions, where no transformation effect was detected. As the authors of the Bhas 42 CTA point out, cell confluence favours intercellular communication, which is recognised as a key factor of promotion mechanisms in carcinogenesis processes [15]. The experiment also showed that in the context of the original promotion assay, the first of the three treatments with Min-U-Sil or NM-203 was sufficient to trigger a cell transformation process. When a single treatment is performed, the promotion mechanism is probably maintained by the persistence of particle uptake throughout the assay.

Some studies have shown that high levels of SAS airborne particles can be found in situations of occupational exposure [24,25]. However, based on an estimation derived from human tolerable levels, Murugadoss et al. concluded that relevant SAS concentrations for in vitro assays should not exceed 384 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [26]. Although it is generally difficult to extrapolate the in vitro dose to the in vivo status, SAS concentrations used in this study (ranging from 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) could be considered as physiologically relevant.

In conclusion, this study has shown, for the first time, the transforming potential of different SAS. We employed a promising model of cell transformation, the Bhas 42 CTA, which was designed for the detection of tumor-promoter agents. Further studies are now needed to understand, at the molecular level, the mechanisms of promotion involved in the transforming effect of SAS, such as epigenetic events.

References

- [1] ECETOC, ECETOC JACC REPORT, N°51 Synthetic Amorphous Silica (Cas 7631-86-9), (2006) 1–237.
- [2] C. Fruijtier-Polloth, The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-a nanostructured material, *Toxicology* 294 (2012) 61–79.
- [3] IARC., Silica, some silicates, coal dust and para-Aramid fibrils, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 68 (1997) 1–506.
- [4] D. Napierska, L.C. Thomassen, D. Lison, J.A. Martens, P.H. Hoet, The nanosilica hazard: another variable entity, Part. Fibre Toxicol. 7 (2010) 39.
- [5] C.A. Barnes, A. Elsaesser, J. Arkusz, A. Smok, J. Palus, A. Lesniak, A. Salvati, J.P. Hanrahan, W.H. Jong, E. Dziubaltowska, M. Stepnik, K. Ryzdzynski, G. McKerr, I. Lynch, K.A. Dawson, C.V. Howard, Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity, *Nano Lett.* 8 (2008) 3069–3074.
- [6] Q. Mu, N.S. Hondow, L. Krzeminski, A.P. Brown, L.J. Jeuken, M.N. Routledge, Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles, Part. Fibre Toxicol. 9 (2012) 29.
- [7] K. Gerloff, C. Albrecht, A.W. Boots, I. Förster, R.P. Schins, Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2Cells, *Nanotoxicology* 3 (2009) 355–364.
- [8] A.M. Tavares, H. Louro, S. Antunes, S. Quarre, S. Simar, P.J. De Temmerman, E. Verleysen, J. Mast, K.A. Jensen, H. Norppa, F. Nessler, M.J. Silva, Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes, *Toxicol. In Vitro* 28 (2014) 60–69.
- [9] Y. Guichard, C. Fontana, E. Chavancier, F. Terzetti, L. Gate, S. Binet, C. Darne, Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line, *Toxicol. Ind. Health* (2015).
- [10] C.J. Johnston, K.E. Driscoll, J.N. Finkelstein, R. Baggs, M.A. O'Reilly, J. Carter, R. Gelein, G. Oberdorster, Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica, *Toxicol. Sci.* 56 (2000) 405–413.
- [11] Y. Guichard, M.A. Maire, S. Sebillaud, C. Fontana, C. Langlais, J.C. Micillino, C. Darne, J. Roszak, M. Stepnik, V. Fessard, S. Binet, L. Gate, Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 2: intratracheal instillation and intravenous injection, *Environ. Mol. Mutagen.* 56 (2015) 228–244.
- [12] A. Tarantini, S. Huet, G. Jarry, R. Lancelleur, M. Poul, A. Tavares, N. Vital, H. Louro, M. Joao Silva, V. Fessard, Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 1: oral route, *Environ. Mol. Mutagen.* 56 (2015) 218–227.
- [13] F. Pott, M. Roller, Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats, *Eur. J. Oncol.* 10 (2005) 249–281.
- [14] C. Uboldi, G. Giudetti, F. Broggi, D. Gilliland, J. Ponti, F. Rossi, Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts, *Mutat. Res.* 745 (2012) 11–20.
- [15] OECD, Guidance Document On the In Vitro Bhas 42 Cell Transformation Assay Series on Testing & Assessment No. 231, ENV/JM/MONO(2016)1, OECD Publishing, Paris, 2016, pp. 1–34.
- [16] K. Sasaki, M. Umeda, A. Sakai, S. Yamazaki, N. Tanaka, Transformation assay in Bhas 42 cells: a model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals, *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 33 (2015) 1–35.
- [17] Z. Elias, O. Poirrot, I. Fenoglio, M. Ghiazza, M.C. Danieri, F. Terzetti, C. Darne, C. Coulais, I. Matekovits, B. Fubini, Surface reactivity, cytotoxic, and morphological transforming effects of diatomaceous Earth products in Syrian hamster embryo cells, *Toxicol. Sci.* 91 (2006) 510–520.
- [18] C. Darne, C. Coulais, F. Terzetti, C. Fontana, S. Binet, L. Gate, Y. Guichard, In vitro comet and micronucleus assays do not predict morphological transforming effects of silica particles in Syrian Hamster Embryo cells, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 796 (2016) 23–33.
- [19] K. Rasmussen, A. Mech, J. Mast, P.J. De Temmerman, E. Van Doren, N. Waegeneers, F. Van Steen, J.C. Pizzolon, L. De Temmerman, K.A. Jensen, Synthetic Amorphous Silicon Dioxide (NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204). Characterisation and Physico-Chemical Properties. JRC Repository: NM-series of Representative Manufactured Nanomaterials, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2013 200 p.
- [20] K. Sasaki, H. Mizusawa, M. Ishidate, Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, *Jpn. J. Cancer Res.* 79 (1988) 921–930.
- [21] A. Sakai, K. Sasaki, D. Muramatsu, S. Arai, N. Endou, S. Kuroda, K. Hayashi, Y.M. Lim, S. Yamazaki, M. Umeda, N. Tanaka, A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity, *Mutat. Res.* 702 (2010) 100–122.
- [22] A. Sakai, K. Sasaki, K. Hayashi, D. Muramatsu, S. Arai, N. Endou, S. Kuroda, A. Poth, S. Bohnenberger, T. Kunkelmann, M. Asakura, H. Hirose, N. Ishii, F. Mizuhashi, S. Kasamoto, M. Nagai, K. Pant, S.W. Bruce, J.E. Sly, S. Yamazaki, M. Umeda, N. Tanaka, An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity, *Mutat. Res.* 725 (2011) 57–77.
- [23] IARC, Arsenic, metals, fibres and dusts, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 100C (2012) 1–501.
- [24] S. Oh, B. Kim, H. Kim, Comparison of nanoparticle exposures between fumed and sol-gel nano-silica manufacturing facilities, *Ind. Health* 52 (2014) 190–198.
- [25] B. Kim, H. Kim, L.J. Yu, Assessment of nanoparticle exposure in nanosilica handling process: including characteristics of nanoparticles leaking from a vacuum cleaner, *Ind. Health* 52 (2014) 152–162.
- [26] S. Murugadoss, D. Lison, L. Godderis, S. Van Den Brule, J. Mast, F. Brassinne, N. Sebaili, P.H. Hoet, Toxicology of silica nanoparticles: an update, *Arch. Toxicol.* (2017).

Figures in Supplementary data.

FIGURE S.1

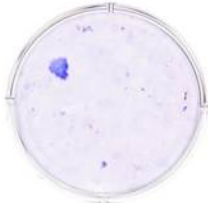
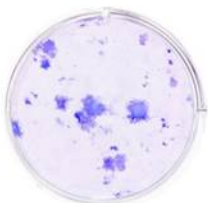

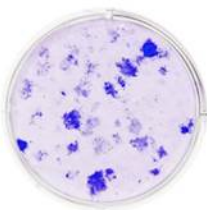

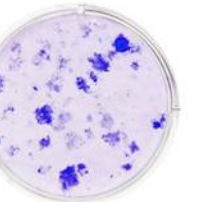
Treatment	Control (0.1 % DMSO)	MCA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	TPA (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Initiation assay			
Promotion assay			

Figure S.1: Representative cell cultures obtained on Day 21 from CTA performed with 3-methylcholanthrene (MCA) in the initiation assay or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in the promotion assay. Treatments with 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) were used as the negative control.

FIGURE S.2

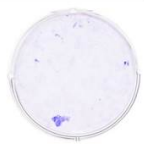
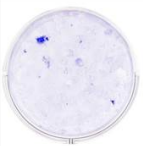
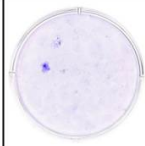
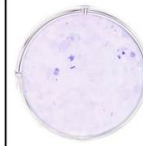
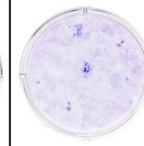
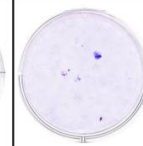
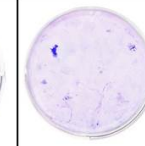
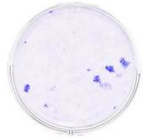
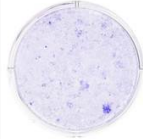
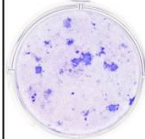
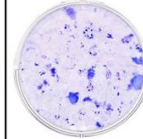
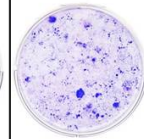
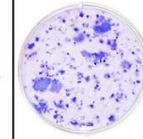
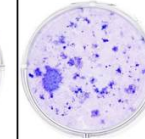
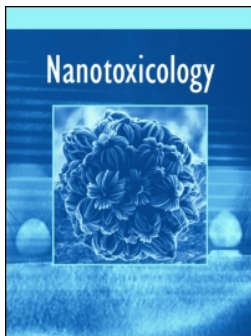
Treatment	Control (2 % H ₂ O)	DE (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Min-U-Sil (25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NM-200 (40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NM-201 (40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NM-202 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NM-203 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Initiation assay							
Promotion assay							

Figure S.2: Representative cell cultures obtained on Day 21 from CTA performed with DE, Min-U-Sil or SAS in the initiation assay and in the promotion assay. Treatments with 2% H₂O were used as negative controls in all CTA except for Min-U-Sil, for which the negative control was 10% H₂O (not shown).




Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation

Carole Seidel, Anaïs Kirsch, Caroline Fontana, Athanase Visvikis, Aurélie Remy, Laurent Gaté, Christian Darne & Yves Guichard

To cite this article: Carole Seidel, Anaïs Kirsch, Caroline Fontana, Athanase Visvikis, Aurélie Remy, Laurent Gaté, Christian Darne & Yves Guichard (2017): Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation, *Nanotoxicology*, DOI: [10.1080/17435390.2017.1382599](https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1382599)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/17435390.2017.1382599>

 View supplementary material 

 Published online: 28 Sep 2017.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation

Carole Seidel^a, Anaïs Kirsch^a, Caroline Fontana^a, Athanase Visvikis^b, Aurélie Remy^a, Laurent Gaté^a, Christian Darne^a and Yves Guichard^a

^aDépartement Toxicologie et Biométrie, Institut National de Recherche et Sécurité (INRS), Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France;

^bIngénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Biopôle, Campus Biologie Santé, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ABSTRACT

The increasing use of nanomaterials in numerous domains has led to growing concern about their potential toxicological properties, and the potential risk to human health posed by silica nanoparticles remains under debate. Recent studies proposed that these particles could alter gene expression through the modulation of epigenetic marks, and the possible relationship between particle exposure and these mechanisms could represent a critical factor in carcinogenicity. In this study, using the Bhas 42 cell model, we compare the effects of exposure to two transforming particles, a pyrogenic amorphous silica nanoparticle NM-203 to those of the crystalline silica particle Min-U-Sil[®] 5. Short-term treatment by Min-U-Sil[®] 5 decreased global DNA methylation and increased the expression of the two *de novo* DNMTs, DNMT3a and DNMT3b. NM-203 treatment affected neither the expression of these enzymes nor DNA methylation. Moreover, modified global histone H4 acetylation status and HDAC protein levels were observed only in the Min-U-Sil[®] 5-treated cells. Finally, both types of particle treatment induced strong c-Myc expression in the early stage of cell transformation and this correlated with enrichment in RNA polymerase II as well as histone active marks on its promoter. Lastly, almost all parameters that were modulated in the early stage were restored in transformed cells suggesting their involvement mainly in the first steps of cell transformation.

ARTICLE HISTORY

Received 6 May 2017
Revised 31 August 2017
Accepted 18 September 2017



KEYWORDS


Promotion assay; silica particles; c-myc expression; epigenetic modifications

Introduction

Over the last decades, the use of nanomaterials has emerged in industrial and medical domains for their particular physicochemical properties. However, the potential risks for human health posed by nanoparticles are not fully known and remain under debate, in part due to difficulties in evaluating the frequency, duration and concentrations of human exposure. An increasing number of studies have been devoted to the evaluation of nanomaterial toxicity. However, the general toxicological profiles of nanomaterials are complex to define due to differences in their physicochemical properties (Bakand and Hayes 2016). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified several particles, including crystalline silica particles, as carcinogens for humans, whereas amorphous silica particles, such as silica nanoparticles, have been

classified in Group 3 (not classifiable as to its carcinogenicity to humans) (International Agency for Research on Cancer 1997). Numerous epidemiological, *in vivo* and *in vitro* studies using crystalline silica have shown accumulation and activation of macrophages, an increase in neutrophils, the release of chemokines, and inflammation (Johnston et al. 2000; Mischler et al. 2016). In addition, silica particles can induce oxidative stress leading to DNA damage and are responsible for gene silencing through DNA methylation of genes involved in cell cycle regulation (Belinsky et al. 2002; Deshpande, Narayanan, and Lehnert 2002; Knaapen et al. 2002). While treatment by the crystalline silica microparticle Min-U-Sil[®] 5 induced *in vitro* neoplastic transformation, treatment by amorphous silica nanoparticles did not induce BALB/3T3 or SHE cell transformation (Darne et al. 2016; Saffiotti and

CONTACT Carole Seidel  carole.seidel@inrs.fr  Département Toxicologie et Biométrie, Institut National de Recherche et Sécurité (INRS), Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandoeuvre Les Nancy Cedex, France

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Ahmed 1995; Uboldi et al. 2012). However, recent studies described that synthetic amorphous silica nanoparticles induce in *in vitro* models oxidative stress and genotoxic effects or in *in vivo* models cellular cell death and fibrosis (Guichard et al. 2016; Murugadoss et al. 2017). Moreover, nanosilica particle treatments provoked epigenetic changes including changes in global DNA methylation, in methylation of specific sequences such as promoters of tumor suppressor genes or transposable elements, and in DNA methyltransferase (DNMT) expression (Bhattacharjee and Paul 2016; Di Cristo et al. 2016; Gong et al. 2012; Gong et al. 2010; Lu et al. 2016; Stoccoro et al. 2013). We have recently shown that Min-U-Sil[®] 5 and NM-203 induce transformation in Bhas 42 cell model under promotion conditions (Fontana et al. 2017).

Carcinogenetic processes include aberrant epigenetic modifications that are involved in the establishment and maintenance of altered cellular phenotypes (Wilting and Dannenberg 2012). Epigenetic modifications, such as DNA methylation and histone post-translational modifications, regulate the chromatin dynamics leading to the reprogramming of gene expression. An open chromatin state is induced by, among others, an increase in histone acetylation, methylation of specific histone residues and DNA hypomethylation, allowing the recruitment of transcription factors, RNA polymerase, and other proteins that promote gene transcription (Geiman and Robertson 2002). On the other hand, compaction of chromatin, thought to lead to transcription inhibition, is associated with histone hypoacetylation and an increase in DNA methylation. Aberrant DNA methylation and histone modifications appear to be early events in tumorigenesis and result from alterations in the activity of chromatin-modifying enzymes. It is generally accepted that global DNA hypomethylation in cancer cells is related to a lack of DNA methylation maintenance by DNMT1, leading to genome instability and increased expression of genes involved in invasion and metastasis (Gama-Sosa et al. 1983). In contrast, the repression of tumor suppressor genes seems to be a consequence of an overexpression of the *de novo* DNMTs, DNMT3a and DNMT3b, which are responsible for hypermethylation of their promoters (Weber et al. 2005). Cancer cells

also show altered patterns of histone post-translational modifications, and down or up-regulation of the enzymes involved can also appear early in tumorigenesis. For example, Wilting and Dannenberg (2012) observed that disturbance of the expression and/or activity of histone deacetylase (HDAC) isoenzymes led to a disruption in the balance between histone acetyltransferase (HAT) and HDAC activity, which was shown to be associated with cellular transformation. HDAC overexpression could lead to histone hypoacetylation associated with inhibition of tumor suppressor gene expression (Bradbury et al. 2005).

Among the oncogenes responsible for cell transformation, *c-myc* gene overexpression has been widely observed in various cancer types (20% of human cancers) and has been associated with aggressiveness and poor prognosis (Pelengaris, Khan, and Evan 2002). The alteration of *c-myc* expression in tumor cells could be a consequence of multiple mechanisms, such as chromosome translocation, mutations, gene amplification or modification of histone acetylation on its promoter (Koenig et al. 2010; Pelengaris, Khan, and Evan 2002). The *c-myc* gene codes a transcription factor that, when it heterodimerizes with its partner protein Max, binds to specific DNA sequences (e.g. the E-box sequence) and promotes gene expression (Pelengaris, Khan, and Evan 2002). The transcription factor c-Myc might also repress transcription through interaction with other factors such as Sp1 (Gartel et al. 2001). Consequently, the expression of 10–15% of all the genes transcribed by RNA polymerase II is controlled by c-Myc, including genes that are involved in cell growth and proliferation, regulation of metabolic pathways, cell differentiation, apoptosis, protein synthesis, cell adhesion, angiogenesis, and other processes (Lin et al. 2012; O'Connell et al. 2003).

The aim of this study was to investigate epigenetic modifications induced by silica particles during the early stage of the cell transformation process. An amorphous silica nanoparticle (NM-203), one of the representative silica nanomaterials produced in industry, was tested alongside Min-U-Sil[®] 5, a crystalline silica particle often used as a benchmark particle in toxicological studies such as cell transformation assay. We used the *in vitro* Bhas 42 cell transformation assay developed by Sasaki,

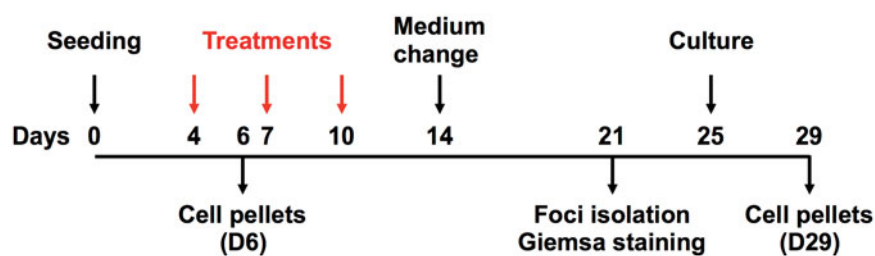


Figure 1. Treatment of Bhas 42 cells by Min-U-Sil[®] 5 and NM-203. Cells were seeded on D0, treated on D4, D7 and D10 (red arrows) and the medium was changed on D14. Cell pellets were collected on D6. Giemsa staining was carried out on foci on D21 and foci were isolated. Selected cells were cultured and cell pellets were collected on D29.

Mizusawa, and Ishidate (1988), which was recently the subject of an Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidance document (OECD 2016; Sasaki, Mizusawa, and Ishidate 1988). The effects of silica particles on global DNA methylation and histone acetylation, as well as on expression of enzymes involved in epigenetic modifications, were characterized. The impact of these epigenetic marks on the expression of c-Myc was also investigated, focusing on the occupancy of the promoter by RNA polymerase II as well as on enrichment of histone active marks.

Materials and methods

Compounds and particles

Min-U-Sil[®] 5 was obtained from US Silica Co. (Berkeley Springs, WV), whereas NM-203 was obtained from the Joint Research Centre nanomaterials repository (Ispra, Italy). Particles were dispersed in sterile water and sonicated for 5 min at 10% amplitude using a Branson Sonifier S-450 D equipped with a cup-horn device (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT). The physical and chemical characteristics of the silica samples are presented in Supplementary Table S1 (Elias et al. 2006; Rasmussen et al. 2013). 3-Methylcholanthrene (MCA, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France, ref# 213942), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, Sigma-Aldrich, ref# 1585), suberoylanilide hydroxamic acid (Sigma-Aldrich, ref# SML0061) and 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich, ref# A3656) were dissolved in DMSO.

Cell culture and treatments

The Bhas 42 cell line was obtained from Harlan Laboratories (Rossdorf, Germany). Bhas 42 cells are issued from the stable transfection of BALB/3T3/A31-

1-1 cells with v-Ha-ras (Sasaki, Mizusawa, and Ishidate 1988). Cells were maintained in a DMEM/HamF12 (1:1) culture medium (Gibco[™], Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) containing 1% antibiotic (streptomycin and penicillin, Gibco[™]) and 5% fetal calf serum (Hyclone), at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO₂. Cells were seeded at 15 × 10⁷ cells/cm² and treated with particle concentrations of 15 and 25 µg/cm² for Min-U-Sil[®] 5 or 2 and 5 µg/cm² for NM-203. The cell treatment schedule for the transformation assay is presented in Figure 1. Cell pellets were collected on Day 6 (D6). Foci were isolated and cultured on Day 21 (D21), and cell pellets were collected on Day 29 (D29).

Western blot analysis

Total protein and histone extractions were performed as previously described (Seidel et al. 2014). Proteins were separated on polyacrylamide gradient gels (4–20% Criterion[™] Tris-Glycine eXtended Stain-Free Protein Gel, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (BioRad). Membranes were incubated sequentially with blocking agent for 1 h at room temperature, then the primary antibody overnight at 4 °C and finally the secondary antibody for 1 h at room temperature (Supplementary Table S2). The loading controls were β-actin and Coomassie blue staining (Merck, Molsheim, France) for total proteins and histones, respectively. Western blot quantifications were performed using Image Lab (ChemiDoc[™] system, BioRad) and results were reported relative to the vehicle control.

DNA methylation analysis by ELISA

Genomic DNA was extracted from treated cells using the Wizard Genomic DNA kit (Promega,

Charbonnières-les-Bains, France). Global DNA methylation assays were performed according to the manufacturer's instructions (5-methylcytosine DNA ELISA kit, Enzo®). Percentages of 5-methylcytosine were calculated using a standard curve.

Gene expression analysis by RT-qPCR

Total RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed with iScript™ cDNA synthesis Kit (BioRad) following the manufacturer's protocol. Real-time PCR was performed with CFX96 Touch™ (BioRad) in the presence of iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad) and 2.5 μM of primers (Eurogentec, Angers, France; primer sequences are provided in Supplementary Table S3). No template control was carried out on each PCR mixture. Amplification was performed as follows: 5 min at 95°C, 35 × (15 s at 95°C and 60 s at 60°C). PCR results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method. The fold change of a target gene is expressed as treated cells with respect to vehicle control cells relative to four housekeeping genes (*β-actin*, *α-tubulin*, *Gapdh* and *Tbp*).

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed as previously described (Seidel et al. 2014), using primers to target *c-myc* promoter, a negative region (neg) and the second exon of the *c-myc* gene (e2) (Eurogentec; primer sequences are provided in Supplementary Table S3) and the following antibodies: RNA polymerase II, H3K4me3, H3K4Ac, H3K9Ac, H3K27Ac and 5-methylcytosine (Supplementary Table S2).

Statistical analyses

Statistical analyzes were performed using Stata 14.0 software (StataCorp LP, College Station, TX). A logarithmic transformation was applied to the data. A mixed linear regression model was used to test the 'dose' fixed effect, including a random effect termed 'experience.' When the 'dose' effect was significant, a multiple comparisons *post hoc* test (with Bonferroni correction) was applied to test the difference between the control and different levels of

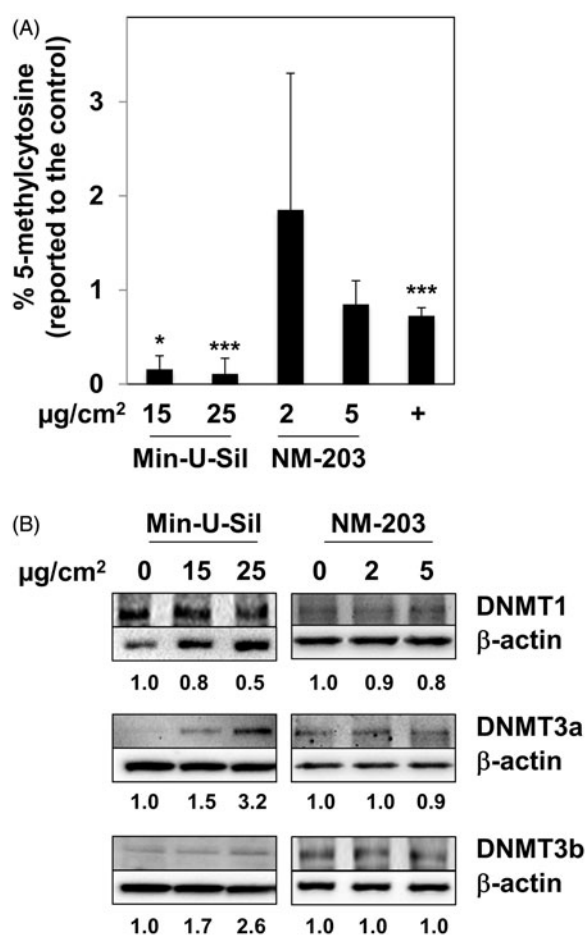


Figure 2. Microsilica particle treatment affects DNA methylation and DNMTs. (A) Global DNA methylation on D6 was analyzed by ELISA test on the total genomic DNA of treated cells by Min-U-Sil® 5 or NM-203 at the indicated concentrations. The positive controls were cells treated for 72 h with 0.05 μM 5-aza-2'-deoxycytidine (+). Histograms correspond to the mean ± standard deviation of three independent experiments. (B) DNMT1, 3a and 3b protein levels were determined by Western blot after cell treatment with Min-U-Sil® 5 or NM-203 at the indicated concentrations. The blots are representative of three independent experiments and the quantifications are indicated. β-Actin was used as a loading control. * and *** indicate $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively, versus untreated cells in a Bonferroni multiple comparison tests.

does. The statistical significance threshold was set at 5%.

Results

Modulation of total DNA methylation

We investigated the effect of particle treatment on total DNA methylation on D6. Regardless of the concentration used, Min-U-Sil® 5 treatment resulted in a dramatic decrease (~80%) in total DNA methylation (Figure 2(A)) ($p = 0.015$ for 15 μg/cm² and

$p=0.001$ for $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). As expected, 5-aza-2'-deoxycytidine treatment also decreased the 5-methylcytosine content ($p<0.001$). In contrast, NM-203 did not affect total DNA methylation under any of the conditions.

Under our experimental conditions, Min-U-Sil[®] 5 treatment (15 and $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) increased DNMT3a and 3b protein levels (Figure 2(B)). Whereas the DNMT1 protein level remained unchanged after treatment with $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of Min-U-Sil[®] 5, it even decreased after treatment with $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Treatment with NM-203 did not affect the levels of the three DNMTs at any of the concentrations tested.

Effect of Min-U-Sil[®] 5 on HDAC protein levels

Cellular extracts of Min-U-Sil[®] 5-treated cells taken on D6 contained an increased amount of the HDAC2 protein, while the level of HDAC1 decreased significantly and the level of the HDAC3 protein remained unchanged (Figure 3(A)). Treatments with both concentrations of Min-U-Sil[®] 5 reduced the HDAC6 protein level by 50%. Despite the modulation of the HDAC protein level after Min-U-Sil[®] 5 treatment, a moderate but significant increase in histone H4 acetylation was observed while the level of histone H3 acetylation remained unchanged (Figure 3(B)). The four HDACs tested remained unchanged under NM-203 treatment and no modification of histone acetylation was observed for histones H3 or H4.

Induction of *c-Myc* expression and modulation of histone modifications on the *c-Myc* promoter

We analyzed the expression of *c-myc* after Min-U-Sil[®] 5 and NM-203 treatments. Treatment by both particles induced high *c-Myc* protein levels (Figure 4(A)). Six-fold increase was observed after treatment with 15 and $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of Min-U-Sil[®] 5, while treatment with NM-203 increased *c-Myc* protein levels by 2.5- and 11-fold at 2 and $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. We observed 7-fold and 11-fold increases in the *c-myc* mRNA level after treatment with $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p<0.001$) and $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p<0.001$) of Min-U-Sil[®] 5, respectively (Figure 4(B)). Treatment with the lowest concentration of NM-203 ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) did not modulate *c-myc* mRNA, whereas

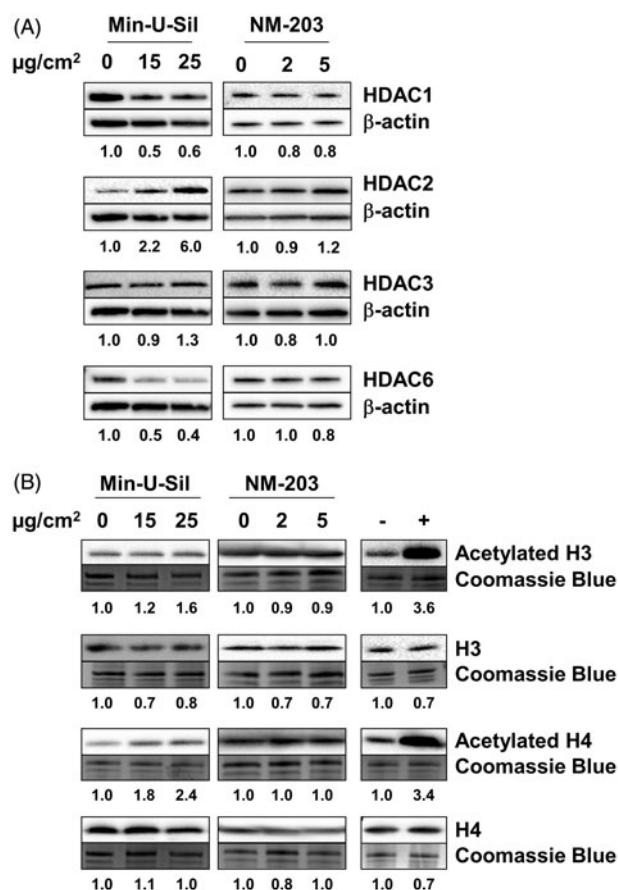


Figure 3. Modulation of HDAC protein levels and histone acetylation. Western blot analyses of (A) HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC6 and (B) acetylated and total histone H3 and H4 were carried out on D6 after treatment with Min-U-Sil[®] 5 or NM-203 at the indicated concentrations. The positive controls were cells treated for 24 h with $2 \mu\text{M}$ of suberoylanilide hydroxamic acid (+). The blots are representative of three independent experiments and the quantifications are indicated. β -Actin and Coomassie blue staining were used as loading controls for total proteins and histones, respectively.

treatment with the highest concentration ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) resulted in a significant (4-fold) increase ($p<0.001$). In addition, we observed a decrease of the *c-Myc* target gene *col1A2* mRNA after treatment by both concentrations of Min-U-Sil[®] 5 (70 and 80% decrease for 15 and $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively, $p<0.005$, Figure 4(C)). Treatment with the lowest concentration of NM-203 slightly decreased *col1A2* expression (20%), whereas the highest concentration decreased by half its mRNA level ($p<0.001$). In order to study the effect of *c-Myc* overexpression, we analyzed also the cell cycle progression. Treatment with both particle increased the number of cells in S-phase in a dose-dependent manner ($p<0.001$, Supplementary Figure S1).

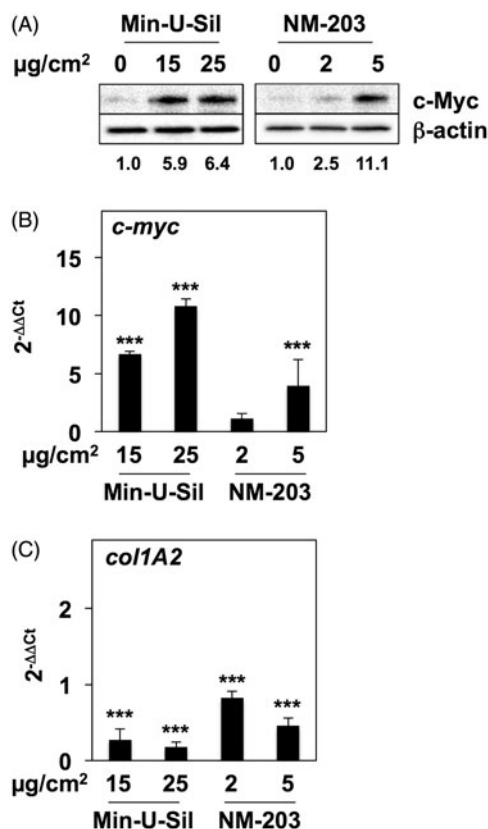


Figure 4. Silica particle treatment increases *c-myc* expression. (A) Western blot analyses of the *c-Myc* protein level were performed after Min-U-Sil[®] 5 and NM-203 treatment at the indicated concentrations. Blots are representative of three independent experiments and the quantifications are indicated. β -Actin was used as a loading control. (B) *c-myc* expression and (C) *col1A2* expression were examined by RT-qPCR on D6 after treatment with Min-U-Sil[®] 5 and NM-203. β -Actin, α -tubulin, *Gapdh* and *Tbp* were used as housekeeping genes. *** indicates $p < 0.005$ versus untreated cells in a Bonferroni multiple comparison tests.

NM-203 treatment also increased the cell population in G2/M phase and decreased it in G0/G1 phase.

The *c-myc* gene is mainly transcribed from two promoters, known as P1 and P2, of which P2 is the major one (Figure 5(A)). CHIP showed a significant increase in the level of RNA polymerase II at both promoters after Min-U-Sil[®] 5 treatment (Figure 5(B)) ($p < 0.001$). This was consistent with the increased expression of *c-myc* and the enrichment of RNA polymerase II on its promoters. We also found an enrichment of this protein in exon 2 of the *c-myc* gene after treatment with Min-U-Sil[®] 5 ($p = 0.002$ for 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $p = 0.04$ for 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). This indicates that increased binding of RNA polymerase II to the *c-myc* promoters is associated with a higher transcription of the gene. Furthermore, Min-U-Sil[®] 5

treatment significantly increased marks of actively transcribed chromatin, such as acetylated or trimethylated histone H3 lysine 4 (H3K4Ac, H3K4me3) ($p = 0.009$ for 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for H3K4Ac- $p < 0.001$ for 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for H3K4Ac and for both doses for H3K4me3), acetylated histone H3 lysine 9 (H3K9Ac) and acetylated histone H3 lysine 27 (H3K27Ac), on the P1 promoter (Figure 5(C)) ($p < 0.001$ for 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for H3K9Ac and H3K27Ac- $p = 0.04$ for 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for H3K9Ac). Promoter enrichment after NM-203 treatment was analyzed with the highest concentration as the lowest concentration had no effect on the *c-myc* mRNA level. NM-203 treatment increased the level of RNA polymerase II only at the P1 promoter ($p < 0.001$) concomitantly with enrichment of all of the histone active marks examined ($p < 0.001$). Neither Min-U-Sil[®] 5 nor NM-203 treatments modulated 5-methylcytosine levels on P1 promoter.

Reversion of molecular mechanisms in isolated foci

Isolated foci were amplified and collected in order to study the effects of repeated treatments with Min-U-Sil[®] 5 and NM-203 particles (treatments on D4, D7 and D10, Figure 1). As shown in Figure 6(A), almost all parameters modulated on D6 were restored to basal levels on D29. Indeed, in isolated foci DNA methylation as well as HDAC2 and 6 protein levels were similar to those of control cells (Figure 6(B)). However, on D29 we still observed an increase of DNMT3a and 3b protein levels upon Min-U-Sil[®] 5 treatment. Western blot analysis of the other DNMT and HDAC did not reveal any changes in their protein levels (Supplementary Figure S2). Total and acetylated histones H3 and H4 levels were not affected by repeated treatments (Supplementary Figure S2). A moderate but significant increase of *c-myc* mRNA was observed only after treatment by the highest concentration of Min-U-Sil[®] 5 ($p = 0.035$, Figure 6(C)). In agreement with *c-myc* RNA level, its protein level remained higher than control cells after repeated treatments by the highest concentration of Min-U-Sil[®] 5 (Figure 6(D)). In isolated transformed foci after NM-203 treatment, *c-myc* mRNA and protein levels were similar to the control cells.

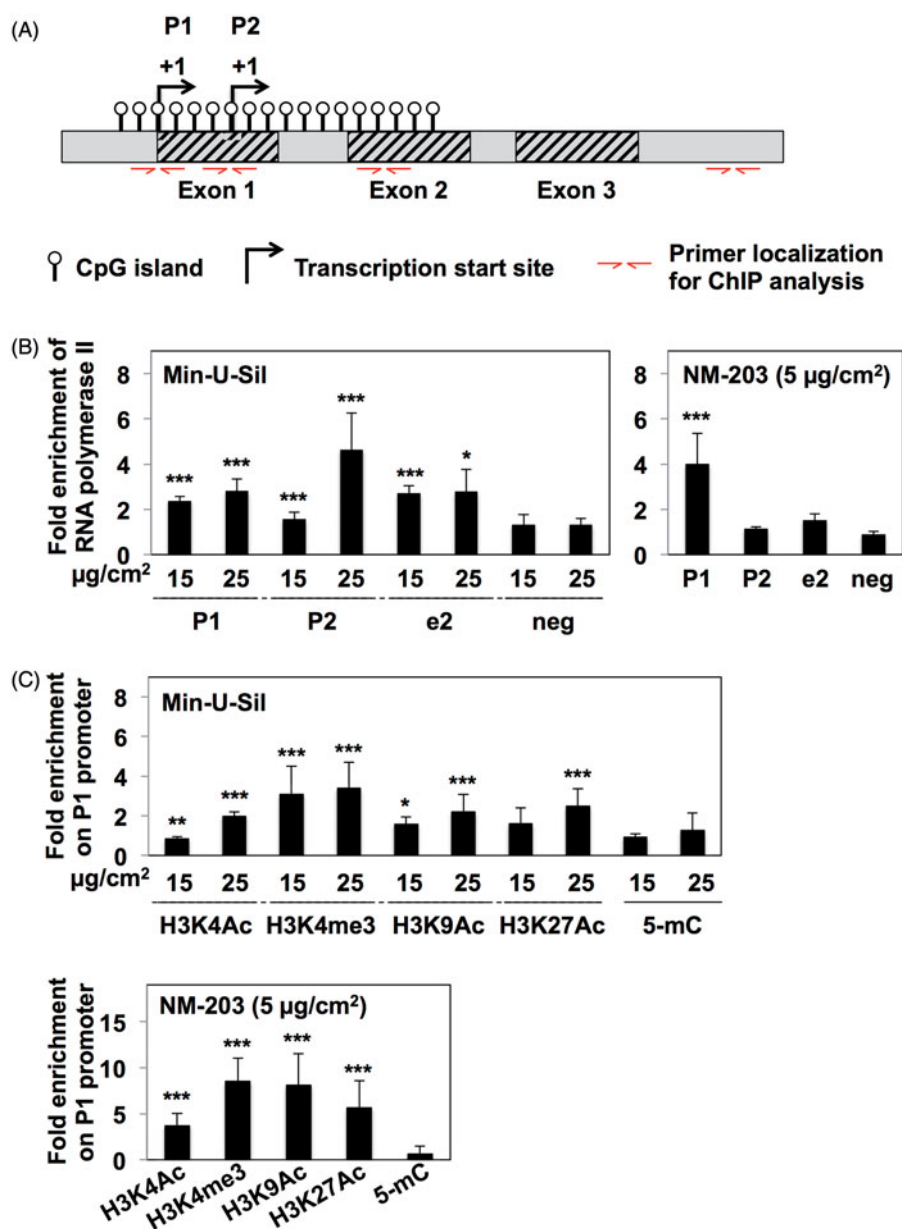


Figure 5. Transcriptional up-regulation of *c-myc* through modulation of epigenetic marks on its promoter. (A) Schematic representation of *c-myc* promoters. The CpG island is represented by open circles, and transcription start sites are indicated as well as the primers used for ChIP analysis (red half-arrows). (B) RNA polymerase II enrichment on promoters P1 and P2 as well as on exon 2 (e2), and a negative region (neg) was analyzed on D6 after treatment by Min-U-Sil[®] 5 and NM-203. (C) Acetylated histone H3 lysine 4 (H3K4Ac), trimethylated histone H3 lysine 4 (H3K4me3), acetylated histone H3 lysine 9 (H3K9Ac), acetylated histone H3 lysine 27 (H3K27Ac) and 5-methylcytosine (5-mC) enrichment were carried out after Min-U-Sil[®] 5 or NM-203 treatment on the P1 promoter. Histograms correspond to the mean \pm standard deviation of three independent experiments. *, ** and *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.005$, respectively, versus control cells, in a Bonferroni multiple comparison tests.

Discussion

The increasing use of nanomaterials makes the study of their impact on human health a necessity. Evaluation of the epigenetic effects of particles is a recent approach in nanotoxicology, and several recent studies support the involvement of epigenetic modulation in carcinogenicity induced by

nanomaterial (Belinsky et al. 2002; Gong et al. 2010; Patil, Gade, and Deobagkar 2016).

Accordingly, we investigated the effect of a nanosilica particle, NM-203, on Bhas 42 cells. In parallel, we also tested a crystalline silica microparticle, Min-U-Sil[®] 5, known for its transforming and carcinogenic properties (Darne et al. 2016). In a previous

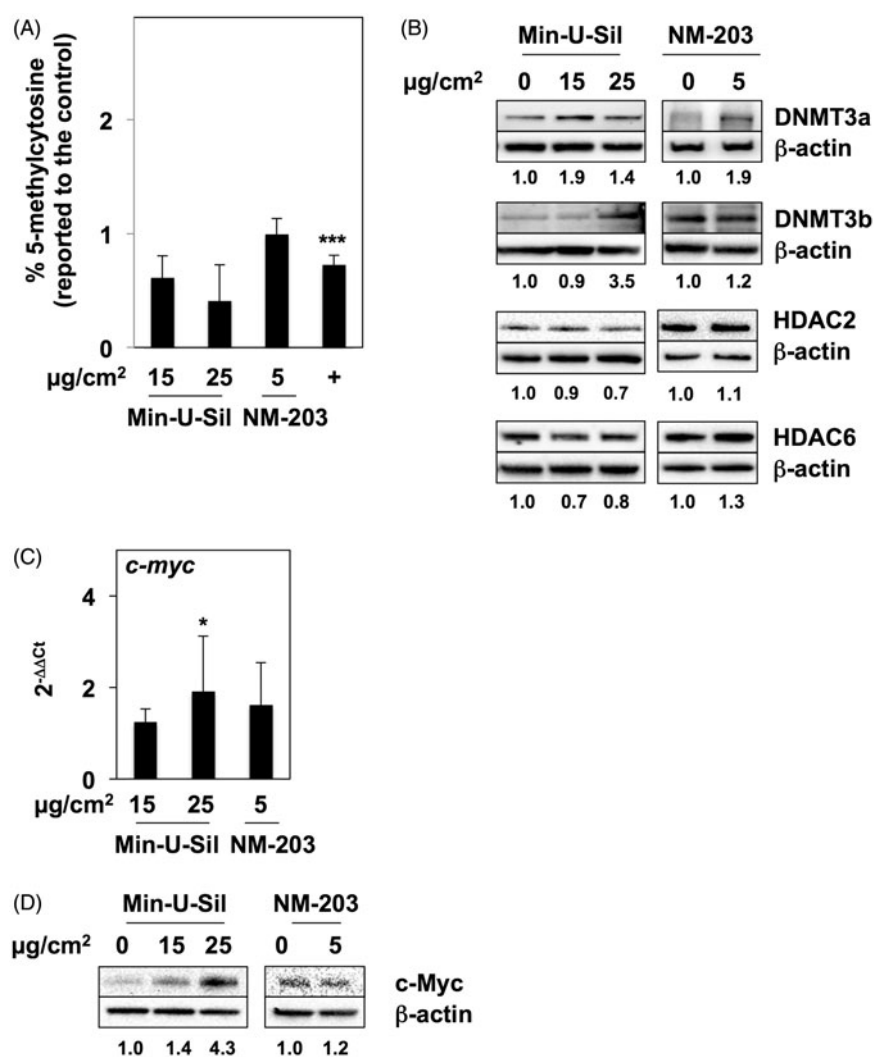


Figure 6. Reversion of molecular mechanisms in isolated foci. (A) Global DNA methylation on D29 was analyzed by ELISA test on the total genomic DNA of cells treated by Min-U-Sil[®] 5 or NM-203 at the indicated concentrations. The positive controls were cells treated for 72 h with 0.05 μM 5-aza-2'-deoxycytidine (+). Histograms correspond to the mean \pm standard deviation of three independent experiments. (B) DNMT3a and 3b, HDAC2 and 6 protein levels were determined by Western blot after cell treatment with Min-U-Sil[®] 5 or NM-203 at the indicated concentrations. (C) *c-myc* expression was analyzed by RT-qPCR on D29 after treatment with Min-U-Sil[®] 5 and NM-203. β -Actin, α -tubulin, *Gapdh* and *Tbp* were used as housekeeping genes. (D) Western blot analyses of the c-Myc protein level on D29 were performed after Min-U-Sil[®] 5 and NM-203 treatment at the indicated concentrations. The blots are representative of three independent experiments and the quantifications are indicated. β -Actin was used as a loading control. * and *** indicate $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively, versus untreated cells, in a Bonferroni multiple comparison tests.

work, we observed that both particles induced Bhas 42 cell transformation in the promotion assay (Fontana et al., 2017). Several studies reported an increased production of ROS after particle treatment and suggested that increased oxidative stress could be one of the causes of cellular transformation (Carpenter et al. 2011; Yang et al. 2007; Zhou and Ryeom 2014). In addition, transforming effects of silica particles have previously been associated with the production of ROS (Elias et al. 2000; Elias et al. 2006). Under our experimental conditions, we did not observe any increase in ROS production, which

may suggest the lack of involvement of this mechanism in Min-U-Sil[®] 5- or NM-203-induced Bhas 42 cell transformation (data not shown).

Global DNA hypomethylation could result in aberrant expression of many important (onco)genes as well as in the reactivation of mobile elements and consequently in genome instability that could lead to cellular transformation (Gama-Sosa et al. 1983). In the Bhas 42 cell model, while Min-U-Sil[®] 5 treatment was found to decrease global DNA methylation, treatment of Bhas 42 cells with NM-203 did not affect it. Gong et al. (2010) observed

that amorphous silica nanoparticle treatment of human HaCaT cells decreased global DNA methylation, suggesting that modification of the methylation status of DNA after such treatment could be cell line-specific. Other particles, such as titanium dioxide and zinc oxide, also decreased DNA methylation and this was accompanied by the induction of oxidative stress, which is known to be associated with gene hypomethylation (Patil, Gade, and Deobagkar 2016). Despite the absence of ROS overproduction in Min-U-Sil[®] 5 treated cells, the strong DNA hypomethylation suggests that mechanisms other than those controlled by ROS could be involved. Three main enzymes are considered responsible for DNA methylation—a maintenance enzyme, DNMT1, and the *de novo* enzymes, DNMT3a and DNMT3b—and several studies suggest an increase in DNMT expression in cancer cells (Robertson et al. 1999). While the treatment with NM-203 particles did not modulate the DNMT protein level, Min-U-Sil[®] 5 treatment decreased the DNMT1 protein level at the highest concentration tested. This observation might suggest a link with DNA hypomethylation. Recent studies suggest that DNA hypomethylation after particle treatment is related to a decrease in the DNMT mRNA, protein levels, or enzyme activity (Gong et al. 2010; Patil, Gade, and Deobagkar 2016). At the lowest concentration of Min-U-Sil[®] 5 tested, the observed DNA hypomethylation could be a consequence of reduced DNMT1 recruitment or reduced availability of DNMT1 partners, such as UHRF1 and PCNA, during mitosis (Liu et al. 2013). Under our experimental model, we observed that cell treatment with both concentrations of Min-U-Sil[®] 5 induced *de novo* DNMT3a and DNMT3b protein levels that might induce DNA methylation only at specific loci, and thus participate in cellular transformation. Indeed, the majority of tumor cells exhibit local hypermethylation that leads to aberrant gene silencing, including the silencing of tumor suppressor genes (Seidel et al. 2012).

Other epigenetic modifications, such as histone acetylation regulated by HDAC enzymes that play an active role in epigenetic regulation of gene expression, could also be involved in cell transformation (Wilting and Dannenberg 2012). In our model, only the treatment with the highest concentration of Min-U-Sil[®] 5 induced an increase in histone H4

acetylation. However, treatment with Min-U-Sil[®] 5 decreased the levels of HDAC1 and HDAC6 proteins and increased the level of HDAC2. Down-regulation of HDAC6 could be linked to tumor development through modulation of the acetylation status of various cytoplasmic proteins (Seidel et al. 2015). An increase in HDAC2 could result in an HDAC1 decrease, as demonstrated previously (Winter et al. 2013; Yamaguchi et al. 2010). Modulation of HDAC1, HDAC2 and HDAC3 protein levels should alter the acetylation status of histones on specific sequences, whereas disruption of the HDAC6 protein level should modulate the activity of non-histone proteins.

Taken together, these data indicate that changes in global epigenetic modifications, as well as changes in DNMT and HDAC protein levels, are not directly related to the transformation of Bhas 42 cells induced by Min-U-Sil[®] 5 and NM-203 treatment. Nevertheless, changes in expression of specific genes could be an important parameter in cell transformation. It is well-known that the *c-myc* oncogene is involved in cell transformation (Flores et al. 2004). We therefore investigated the expression of the *c-myc* oncogene and observed that both Min-U-Sil[®] 5 and NM-203 treatments increased it. The treatment with the lowest dose of NM-203 increased c-Myc at the protein level but not at the mRNA level, suggesting a possible effect on protein stability. It is well-known that the c-Myc protein has a short half-life (~30 min) that is regulated by a number of different mechanisms (Facchini et al. 1997). Treatment with the highest concentration of NM-203 or with Min-U-Sil[®] 5 increased both protein and mRNA levels, suggesting the involvement of additional regulation mechanisms. Indeed, we observed an increase of RNA polymerase II occupancy on *c-myc* promoters, suggesting an increase in transcription initiation and mRNA synthesis. The *c-myc* gene is transcribed from four different promoters (from 5' to 3' P0, P1, P2, P3), with P2 considered to be the main promoter (Hu et al. 2007; Luo and Krause 1994). Our results revealed that NM-203 treatment triggers only the P1 promoter whereas treatment with Min-U-Sil[®] 5 induces transcription from P1 and P2 promoters. This could explain the smaller increase in mRNA level observed after

treatment with NM-203 particles compared to exposure to Min-U-Sil[®] 5 particles. The observed transcriptional induction was accompanied by enrichment in chromatin active marks on the P1 promoter, indicating that the particle treatments induced an open chromatin state in this region. Unchanged levels in 5-methylcytosine on P1 promoter suggests that the methylation status of *c-myc* promoter was already in favor for transcriptional activation. As a consequence of c-Myc overexpression, we observed the transcriptional repression of *col1A2* gene as previously described in a mice cell model and could be linked to cell transformation (Hatamochi et al. 1991; Yang et al. 1991). Moreover, we observed that both particle treatments induced an increase of cells in S-phase, whereas NM-203 treatment also induced the number of cells in G2/M phase. Cell cycle progression is controlled by several checkpoints in order to ensure a faithful replication and division (Visconti, Della Monica, and Grieco 2016). Cell cycle arrest could allow cells to repair damages or induce cell death. Since, cancer cells are often defective in some checkpoint mechanisms, we hypothesized that particle treatments could induce replication stress, a potential consequence of c-Myc overexpression, between D4 and D6 leading to an arrest of cell cycle progression in S-phase (Visconti, Della Monica, and Grieco 2016; Zeman and Cimprich 2014). DNA damages were probably not involved in S-phase arrest, since we did not observe strand breaks upon Min-U-Sil[®] 5 nor NM-203 treatments in comet assay (data not shown). We could suggest that some cells are able to escape cell cycle controls and that may lead to foci transformation.

Study of epigenetic modifications and c-Myc expression in transformed foci revealed a global reversion of the alterations described on D6. Indeed, except DNMT3a and 3b protein levels and the level of c-Myc mRNA and protein after treatment by the highest concentration of Min-U-Sil[®] 5, none of the parameters analyzed on D6 were modulated on D29 in isolated transformed foci. These results suggest that epigenetic changes and c-Myc overexpression are involved in the early stage of silica-induced cell transformation as suggested by Chen et al (2017) in gastric neoplasia (Chen et al. 2017).

Conclusion

The need to characterize the toxicological properties of nanomaterials and the mechanisms responsible for their pathogenicity are important. However, conventional tests of carcinogenicity in animals are time consuming and costly to address the very wide variety of particles that exist. In this context, *in vitro* cell transformation tests are valuable first-line screening tools for assessing the carcinogenic potential of particles. Epigenetic mechanisms are involved in cell transformation, and analysis of epigenetic changes during cancer cell development appears to be an important parameter in the early stages of disease development. Our study highlighted the fact that global epigenetic changes alone may not be sufficient for identifying any modulation of epigenetic marks caused by nanomaterial exposure, and we therefore suggest analyzing specific genome loci. Even though both tested particles induced cell transformation, the mechanisms driving this process might differ from one particle to another. This work has revealed that a number of different mechanisms might lead to cell transformation induced by silica particles, and evaluation of other specific genes could lead us to a better understanding of these mechanisms.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Sylvie Sébillaud and Mylène Lorcin for cell cycle analysis.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Bakand, S., and A. Hayes. 2016. "Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles." *International Journal of Molecular Sciences* 17: 929.
- Belinsky, S. A., S. S. Snow, K. J. Nikula, G. L. Finch, C. S. Tellez, and W. A. Palmisano. 2002. "Aberrant CpG Island Methylation of the p16(INK4a) and Estrogen Receptor Genes in Rat Lung Tumors Induced by Particulate Carcinogens." *Carcinogenesis* 23: 335–339.
- Bhattacharjee, P., and S. Paul. 2016. "Risk of Occupational Exposure to Asbestos, Silicon and Arsenic on Pulmonary Disorders: Understanding The Genetic-Epigenetic Interplay

- and Future Prospects." *Environmental Research* 147: 425–434.
- Bradbury, C. A., F. L. Khanim, R. Hayden, C. M. Bunce, D. A. White, M. T. Drayson, C. Craddock, and B. M. Turner. 2005. "Histone Deacetylases in Acute Myeloid Leukaemia Show A Distinctive Pattern of Expression That Changes Selectively in Response to Deacetylase Inhibitors." *Leukemia* 19: 1751–1759.
- Carpenter, R. L., Y. Jiang, Y. Jing, J. He, Y. Rojanasakul, L. Z. Liu, and B. H. Jiang. 2011. "Arsenite Induces Cell Transformation by Reactive Oxygen Species, AKT, ERK1/2, and p70S6K1." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414: 533–538.
- Chen, Z., M. Soutto, B. Rahman, M. W. Fazili, D. Peng, M. Blanca Piauelo, H. Chen, M. Kay Washington, Y. Shyr, and W. El-Rifai. 2017. "Integrated Expression Analysis Identifies Transcription Networks in Mouse and Human Gastric Neoplasia." *Genes, Chromosomes & Cancer* 56: 535–547.
- Darne, C., C. Coulais, F. Terzetti, C. Fontana, S. Binet, L. Gate, and Y. Guichard. 2016. "In Vitro Comet and Micronucleus Assays Do Not Predict Morphological Transforming Effects of Silica Particles in Syrian Hamster Embryo Cells." *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 796: 23–33.
- Deshpande, A., P. K. Narayanan, and B. E. Lehnert. 2002. "Silica-Induced Generation of Extracellular Factor(s) Increases Reactive Oxygen Species in Human Bronchial Epithelial Cells." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 67: 275–283.
- Di Cristo, L., D. Movia, M. G. Bianchi, M. Allegri, B. M. Mohamed, A. P. Bell, C. Moore, et al. 2016. "Proinflammatory Effects of Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica Nanoparticles in Innate Immunity Cells." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 150: 40–53.
- Elias, Z., O. Poirot, M. C. Daniere, F. Terzetti, A. M. Marande, S. Dzwigaj, H. Pezerat, I. Fenoglio, and B. Fubini. 2000. "Cytotoxic and Transforming Effects of Silica Particles with Different Surface Properties in Syrian Hamster Embryo (SHE) Cells." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with Bibra* 14: 409–422.
- Elias, Z., O. Poirot, I. Fenoglio, M. Ghiazza, M. C. Daniere, F. Terzetti, C. Darne, C. Coulais, I. Matekovits, and B. Fubini. 2006. "Surface Reactivity, Cytotoxic, and Morphological Transforming Effects of Diatomaceous Earth Products in Syrian Hamster Embryo Cells." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 91: 510–520.
- Facchini, L. M., S. Chen, W. W. Marhin, J. N. Lear, and L. Z. Penn. 1997. "The Myc Negative Autoregulation Mechanism Requires Myc-Max Association and Involves the c-myc P2 Minimal Promoter." *Molecular and Cellular Biology* 17: 100–114.
- Flores, I., D. J. Murphy, L. B. Swigart, U. Knies, and G. I. Evan. 2004. "Defining the Temporal Requirements for Myc in the Progression and Maintenance of Skin Neoplasia." *Oncogene* 23: 5923–5930.
- Fontana, C., A. Kirsch, C. Seidel, L. Marpeaux, C. Darne, L. Gaté, A. Remy, and Y. Guichard. 2017. "In Vitro Cell Transformation Induced by Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles." *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 823: 22–27.
- Gama-Sosa, M. A., V. A. Slagel, R. W. Trewyn, R. Oxenhandler, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, and M. Ehrlich. 1983. "The 5-methylcytosine Content of DNA from Human Tumors." *Nucleic Acids Research* 11: 6883–6894.
- Gartel, A. L., X. Ye, E. Goufman, P. Shianov, N. Hay, F. Najmabadi, and A. L. Tyner. 2001. "Myc Represses the p21(WAF1/CIP1) Promoter and Interacts with Sp1/Sp3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 98: 4510–4515.
- Geiman, T. M., and K. D. Robertson. 2002. "Chromatin Remodeling, Histone Modifications, and DNA Methylation—How Does It All Fit Together?." *Journal of Cellular Biochemistry* 87: 117–125.
- Gong, C., G. Tao, L. Yang, J. Liu, Q. Liu, W. Li, and Z. Zhuang. 2012. "Methylation of PARP-1 Promoter Involved in the Regulation of Nano-SiO₂-Induced Decrease of PARP-1 mRNA Expression." *Toxicology Letters* 209: 264–269.
- Gong, C., G. Tao, L. Yang, J. Liu, Q. Liu, and Z. Zhuang. 2010. "SiO₂ Nanoparticles Induce Global Genomic Hypomethylation in HaCaT Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397: 397–400.
- Guichard, Y., C. Fontana, E. Chavinier, F. Terzetti, L. Gate, S. Binet, and C. Darne. 2016. "Cytotoxic and Genotoxic Evaluation of Different Synthetic Amorphous Silica Nanomaterials in the V79 Cell Line." *Toxicology and Industrial Health* 32: 1639–1650.
- Hatamochi, A., M. Ono, H. Ueki, and M. Namba. 1991. "Regulation of collagen gene expression by transformed human fibroblasts: decreased type I and type III collagen RNA transcription." *The Journal of Investigative Dermatology* 96: 473–477.
- Hu, H. M., K. Kanda, L. Zhang, and L. M. Boxer. 2007. "Activation of the c-myc p1 Promoter in Burkitt's Lymphoma by the hs3 Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Enhancer." *Leukemia* 21: 747–753.
- Johnston, C. J., K. E. Driscoll, J. N. Finkelstein, R. Baggs, M. A. O'reilly, J. Carter, R. Gelein, and G. Oberdorster. 2000. "Pulmonary Chemokine And Mutagenic Responses in Rats After Subchronic Inhalation of Amorphous and Crystalline Silica." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 56: 405–413.
- Knaapen, A. M., C. Albrecht, A. Becker, D. Hohl, A. Winzer, G. R. Haenen, P. J. Borm, and R. P. Schins. 2002. "DNA Damage in Lung Epithelial cells Isolated From Rats Exposed to Quartz: Role of Surface Reactivity and Neutrophilic Inflammation." *Carcinogenesis* 23: 1111–1120.
- Koenig, A., T. Linhart, K. Schlegemann, K. Reutlinger, J. Wegele, G. Adler, G. Singh, et al. 2010. "NFAT-induced Histone Acetylation Relay Switch Promotes c-Myc-dependent Growth in Pancreatic Cancer Cells." *Gastroenterology* 138: 1189–1199.e1–2.

- Lin, C. Y., J. Loven, P. B. Rahl, R. M. Paranal, C. B. Burge, J. E. Bradner, T. I. Lee, and R. A. Young. 2012. "Transcriptional Amplification In Tumor Cells with Elevated c-Myc." *Cell* 151: 56–67.
- Liu, X., Q. Gao, P. Li, Q. Zhao, J. Zhang, J. Li, H. Koseki, and J. Wong. 2013. "UHRF1 Targets DNMT1 for DNA Methylation Through Cooperative Binding of Hemimethylated DNA and Methylated H3K9." *Nature Communications* 4: 1563.
- Lu, X., I. R. Miousse, S. V. Pirela, S. Melnyk, I. Koturbash, and P. Demokritou. 2016. "Short-Term Exposure to Engineered Nanomaterials Affects Cellular Epigenome." *Nanotoxicology* 10: 140–150.
- Luo, Y., and M. O. Krause. 1994. "Changes in Promoter Utilization in Human and Mouse c-myc Genes Upon Transformation Induction in Temperature-Sensitive Cell Lines." *Journal of Cellular Physiology* 160: 303–315.
- Mischler, S. E., E. G. Cauda, M. Di Giuseppe, L. J. McWilliams, C. St Croix, M. Sun, J. Franks, and L. A. Ortiz. 2016. "Differential Activation of RAW 264.7 Macrophages by Size-Segregated Crystalline Silica." *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)* 11: 57.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1997. "Silica, Some Silicates, Coal Dust and Para-Aramid Fibrils." *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Volume 68, Lyon, France.
- Murugadoss, S., D. Lison, L. Godderis, S. Van Den Brule, J. Mast, F. Brassinne, N. Sebaihi, and P. H. Hoet. 2017. "Toxicology of Silica Nanoparticles: An Update." *Archives of Toxicology*. Advance online publication.
- O'connell, B. C., A. F. Cheung, C. P. Simkevich, W. Tam, X. Ren, M. K. Mateyak, and J. M. Sedivy. 2003. "A Large Scale Genetic Analysis of c-Myc-Regulated Gene Expression Patterns." *The Journal of Biological Chemistry* 278: 12563–12573.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2016. Guidance Document on the In Vitro Bhas 42 Cell Transformation Assay. Series on Testing & Assessment No. 231. ENV/JM/MONO (2016)1. Paris: Environment Directorate, OECD.
- Patil, N. A., W. N. Gade, and D. D. Deobagkar. 2016. "Epigenetic Modulation Upon Exposure of Lung Fibroblasts to TiO₂ and ZnO Nanoparticles: Alterations in DNA Methylation." *International Journal of Nanomedicine* 11: 4509–4519.
- Pelengaris, S., M. Khan, and G. Evan. 2002. "c-MYC: More Than Just a Matter of Life And Death." *Nature Reviews. Cancer* 2: 764–776.
- Rasmussen, K., A. Mech, J. Mast, P. J. De Temmerman, E. Van Doren, N. Waegeneers, F. Van Steen, J. C. Pizzolon, L. De Temmerman, and K. A. Jensen. 2013. Synthetic Amorphous Silicon Dioxide (NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204). Characterisation and Physico-Chemical Properties. JRC repository: NM-series of Representative Manufactured Nanomaterials. EUR - Scientific and Technical Research Reports. Publications Office of the European Union. 200 p. <http://www.jrc.ec.europa.eu/>
- Robertson, K. D., E. Uzvolgyi, G. Liang, C. Talmadge, J. Sumegi, F. A. Gonzales, and P. A. Jones. 1999. "The human DNA Methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: Coordinate mRNA Expression in Normal Tissues and Overexpression in Tumors." *Nucleic Acids Research* 27: 2291–2298.
- Saffiotti, U., and N. Ahmed. 1995. "Neoplastic Transformation by Quartz in the BALB/3T3/A31-1-1 Cell Line and the Effects of Associated Minerals." *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 15: 339–356.
- Sasaki, K., H. Mizusawa, and M. Ishidate. 1988. "Isolation and Characterization of Ras-transfected BALB/3T3 Clone Showing Morphological Transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate." *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 79: 921–930. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/cancersci1959>.
- Seidel, C., C. Florean, M. Schneckeburger, M. Dicato, and M. Diederich. 2012. "Chromatin-Modifying Agents in Anti-cancer Therapy." *Biochimie* 94: 2264–2279.
- Seidel, C., M. Schneckeburger, M. Dicato, and M. Diederich. 2014. "Antiproliferative and Proapoptotic Activities of 4-hydroxybenzoic Acid-based Inhibitors of Histone Deacetylases." *Cancer Letters* 343: 134–146.
- Seidel, C., M. Schneckeburger, M. Dicato, and M. Diederich. 2015. "Histone Deacetylase 6 in Health and Disease." *Epigenomics* 7: 103–118.
- Stoccoro, A., H. L. Karlsson, F. Coppede, and L. Migliore. 2013. "Epigenetic Effects of Nano-sized Materials." *Toxicology* 313: 3–14.
- Uboldi, C., G. Giudetti, F. Broggi, D. Gilliland, J. Ponti, and F. Rossi. 2012. "Amorphous Silica Nanoparticles Do Not Induce Cytotoxicity, Cell Transformation or Genotoxicity in Balb/3T3 Mouse Fibroblasts." *Mutation Research* 745: 11–20.
- Visconti, R., R. Della Monica, and D. Grieco. 2016. "Cell Cycle Checkpoint in cancer: A Therapeutically Targetable Double-edged Sword." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35: 153.
- Weber, M., J. J. Davies, D. Wittig, E. J. Oakeley, M. Haase, W. L. Lam, and D. Schubeler. 2005. "Chromosome-wide and Promoter-specific Analyses Identify Sites of Differential DNA Methylation In Normal And Transformed Human Cells." *Nature Genetics* 37: 853–862.
- Wilting, R. H., and J. H. Dannenberg. 2012. "Epigenetic Mechanisms in Tumorigenesis, Tumor Cell Heterogeneity and Drug Resistance." *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 15: 21–38.
- Winter, M., M. A. Moser, D. Meunier, C. Fischer, G. Machat, K. Mattes, B. M. Lichtenberger, et al. 2013. "Divergent Roles of HDAC1 and HDAC2 in the Regulation of Epidermal Development and Tumorigenesis." *The EMBO Journal* 32: 3176–3191.
- Yamaguchi, T., F. Cubizolles, Y. Zhang, N. Reichert, H. Kohler, C. Seiser, and P. Matthias. 2010. "Histone Deacetylases 1 and 2 act in Concert to promote the G1-to-S progression." *Genes & Development* 24: 455–469.

- Yang, B. S., T. J. Geddes, R. J. Pogulis, B. De Crombrughe, and S. O. Freytag. 1991. "Transcriptional Suppression of Cellular Gene Expression by c-Myc." *Molecular and Cellular Biology* 11: 2291–2295.
- Yang, S., B. J. Misner, R. J. Chiu, and F. L. Meyskens Jr. 2007. "Redox Effector factor-1, Combined With Reactive Oxygen Species, Plays an Important Role in the Transformation of JB6 Cells." *Carcinogenesis* 28: 2382–2390.
- Zeman, M. K., and K. A. Cimprich. 2014. "Causes and Consequences of Replication Stress." *Nature Cell Biology* 16: 2–9.
- Zhou, A. Y., and S. Ryeom. 2014. "Cyclosporin A Promotes Tumor Angiogenesis in A Calcineurin-Independent Manner by Increasing Mitochondrial Reactive Oxygen Species." *Molecular Cancer Research* 12: 1663–1676.

Supplementary material and methods

Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation

Carole Seidel, Anaïs Kirsch, Caroline Fontana, Athanase Visvikis, Aurélie Remy,
Laurent Gaté, Christian Darne, Yves Guichard

Table S1: Physical characteristics of the silica samples.

Sample ^a	Origin	Main phase	Primary particle size ^b	Main impurities (wt %) ^c	BET SSA (m ² /g) ^d	DLS ^e	
						Z-average diameter in water (nm)	Polydispersity index
NM-203	Pyrogenic	Amorphous	24.7 ± 17.7 nm	Al (0.43)	204	318.7 ± 4.9	0.420 ± 0.026
Min-U-Sil 5	Natural; US Silica Co. (Berkeley)	Crystalline	1.33 ± 0.85 μm	Al (0.16) ^d	5	1385.7 ± 377.0	0.380 ± 0.130

^a In-depth physical and chemical characterizations of the samples (except DLS data) are available in Rasmussen *et al*, 2013 (NM-203) and Elias *et al*, 2006 (Min-U-Sil);

^b Determined by transmission electron microscopy;

^c Impurities were determined by energy dispersive spectrometry for NM-203 and by inductively coupled plasma spectrometry for Min-U-Sil;

^d The BET (Brunauer-Emmet-Teller) specific surface area (SSA) was determined by nitrogen adsorption;

^e Dynamic light scattering (DLS) was performed using a Nanozetasizer (Malvern). Samples were dispersed in water as described in the Materials and methods section. Values represent the mean ± standard deviation of three DLS analyses.

Table S2: Antibodies used for Western Blot and ChIP analyses.

Target	Supplier	Reference	Molecular weight (kDa)
DNMT1	Cell Signaling	5119	200
DNMT3a	Cell Signaling	2160	130
DNMT3b	Abcam	ab2851	100
HDAC1	Cell Signaling	2062	63
HDAC2	Cell Signaling	2540	60
HDAC3	Cell Signaling	2632	49
HDAC6	Cell Signaling	7612	140
Total histone H3	Millipore	06-755	17
Acetylated histone H3	Millipore	06-599	17
Total histone H4	Millipore	05-858	10
Acetylated histone H4	Millipore	06-866	10
β-actin	Cell Signaling	4970	42
c-Myc	Cell Signaling	13987	57
RNA polymerase II	Abcam	ab210527	
Trimethylated histone H3 lysine 4	Abcam	ab8580	
Acetylated histone H3 lysine 4	Abcam	ab113672	
Acetylated histone H3 lysine 9	Millipore	06-942	
Acetylated histone H3 lysine 27	Abcam	ab4729	
5-methylcytosine	Diagenode	C15200081	

Table S3: Primers used for QRT-PCR and ChIP analyses.

Target gene	Forward and reverse sequences	Amplicon size
<i>β-actin</i>	F: GGCCAACCGTGAAAAGATGA R: TACGACCAGAGGCATACAGG	104
<i>α-tubulin</i>	F: CACTACACCATTGGCAAGGA R: GCTGTGGAAAACCAAGAAGC	102
<i>Gapdh</i>	F: CTGCACCACCAACTGCTTAG R: GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	108
<i>Tbp</i>	F: ACGGACAACCTGCGTTGATTTT R: ACTTAGCTGGGAAGCCCAAC	128
<i>c-myc</i>	F : CCCTAGTGCTGCATGAGGA R : TGCCTCTTCTCCACAGACAC	103
<i>CollA2</i>	F: TTGCAATCGGGATCAGTACG R : TGGGACCATCAACACCATCT	103
P1	F: CGCCCTTTATATTCCGGGGG R: GAGCTGAGTGAGGCGAGTC	96
P2	F: AGGGATCCTGAGTCGCAGT R: CGCTCACTCCCTCTGTCTCT	92
e2	F: GAGGAGACATGGTGAACCAGA R: AACCGCTCCACATACAGTCC	93
neg	F: CAGTCTTCACCCGACCATCT R: CTGACAGAGCTTTCCCCAAA	92

Supplementary data

Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation

Carole Seidel, Anaïs Kirsch, Caroline Fontana, Athanase Visvikis, Aurélie Remy,
Laurent Gaté, Christian Darne, Yves Guichard

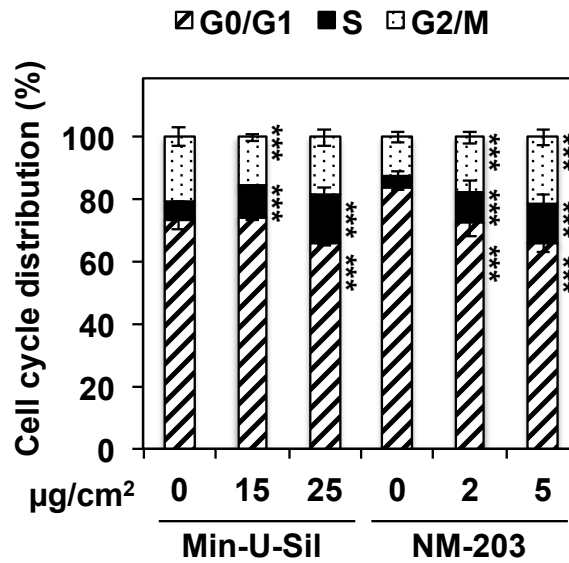


Figure S1: Modulation of cell cycle distribution after Min-U-Sil and NM-203 treatments.

Cell cycle distribution was analyzed after 48 hours of treatment by Min-U-Sil or NM-203 at the indicated concentrations. Distribution of cells in G0/G1, S and G2/M phases was number by the flow cytometer Accuri C6 (BD Bioscience) after 20 minutes incubation with 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of RNase and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of propidium iodide. The histograms correspond to the mean \pm SD of three independent experiments. *** indicates $p < 0.005$ versus control cells in a Bonferroni multiple comparison tests.

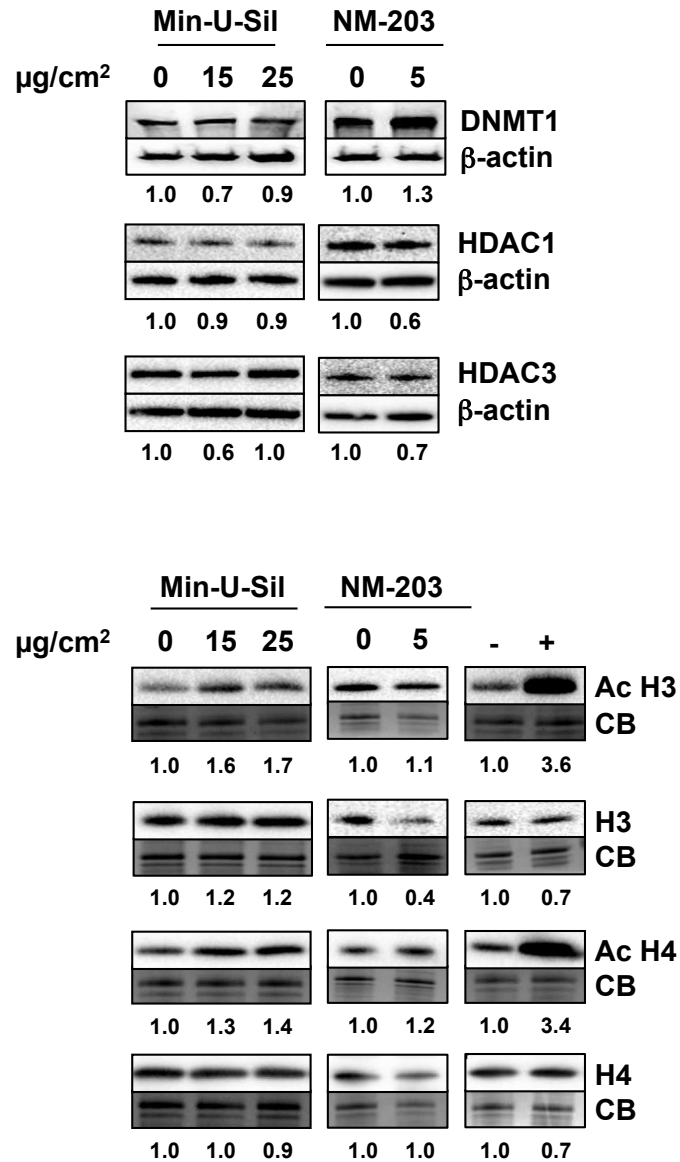
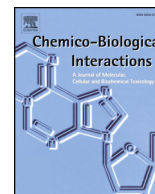


Figure S2: Neither Min-U-Sil nor NM-203 treatment modulated levels of DNMT1, HDAC1 and 3 and acetylated histone in isolated foci.

DNMT1, HDAC1, HDAC3, acetylated and total histone H3 and H4 levels were determined by Western Blot after cell treatment with Min-U-Sil and NM-203 at the indicated concentrations in isolated foci. The positive controls were cells treated for 24 hours with 2 μM of suberoylanilide hydroxamic acid (+). The blots are representative of three independent experiments and the quantifications are indicated. β-actin and Coomassie Blue staining were used as loading controls for total proteins and histones, respectively.



Predictive early gene signature during mouse Bhas 42 cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles



Anaïs Kirsch^{a,b}, Hélène Dubois-Pot-Schneider^b, Caroline Fontana^a, Hervé Schohn^b, Laurent Gat e^a, Yves Guichard^{a,*}

^a Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), 1, rue du Morvan - CS 60027, 54519, Vandoeuvre Cedex, France

^b Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000, Nancy, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Silica particles
Nanomaterials
Bhas 42 cells
Cell transformation
Transcriptomic profile

ABSTRACT

Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS) are used widely in industrial applications. These nanoparticles are not classified for their carcinogenicity in humans. However, some data still demonstrate a potential carcinogenic risk of these compounds in humans. The Bhas 42 cell line was developed to screen chemicals, as tumor-initiators or -promoters according to their ability to trigger cell-to-cell transformation, in a cell transformation assay. In the present study, we performed unsupervised transcriptomic analysis after exposure of Bhas 42 cells to NM-203 SAS as well as to positive (Min-U-Sil 5^o crystalline silica microparticles, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) and negative (diatomaceous earth) control compounds. We identified a common gene signature for 21 genes involved in the early stage of the SAS- Min-U-Sil 5^o- or TPA-induced cell transformation. These genes were related to cell proliferation (over expression) and cell adhesion (under expression). Among them, 12 were selected on the basis of their potential impact on cell transformation. RT-qPCR and western blotting were used to confirm the transcriptomic data. Moreover, similar gene alterations were found when Bhas 42 cells were treated with two other transforming SAS. In conclusion, the results obtained in the current study highlight a 12-gene signature that could be considered as a potential early "bio-marker" of cell transformation induced by SAS and perhaps other chemicals.

1. Introduction

Synthetic amorphous silica (SAS) is one of the nanomaterials produced and used most widely in industrial applications, with worldwide production estimated at 1.5 million tons. SAS are mainly produced in industry by either a wet process, to yield precipitated SAS, or a thermal process, to form pyrogenic SAS [1]. Being a nanostructured material, SAS possesses appealing properties such as a large specific surface area, and it has been used for decades in various industrial applications such as chemistry, cosmetics, pharmaceuticals and food [2].

Several studies have reported toxicological effects of SAS, including oxidative stress, cytotoxicity, inflammation and genotoxicity [1,3]. Precipitated and pyrogenic SAS have also been found to cause increased dose-dependent changes in lung inflammation after repeated intratracheal instillations in rats [4]. However, little is known about the carcinogenic potential of SAS. Unlike crystalline silicas, which are classified as carcinogenic in humans by the International Agency for Research of Cancer, SAS are not classified as carcinogenic due to a lack

of data [5]. Two long-term carcinogenesis studies with SAS have been published to date, showing that repeated intratracheal instillations of pyrogenic SAS in rats increased the incidence of lung tumors [6,7]. Recently, we showed that precipitated and pyrogenic SAS (NM-200, NM-201 NM-202 and NM-203) induced the transformation of Bhas 42 cells in cell transformation assays (CTA) [8].

The Bhas 42 CTA is one of the existing *in vitro* models for cell transformation [9]. Cell transformation is an early event of *in vivo* multistep carcinogenesis, involving changes in the morphological properties of normal to neoplastic cells. Cell transformation assays simulate *in vivo* initiation and promotion stages of carcinogenesis and can be used to distinguish tumor initiators from tumor promoters [9–11].

The transgenic Bhas 42 cell line, established from Balb/c 3T3 cells [12], contains several copies of the v-Ha-ras gene. Similar to the parental Balb/c 3T3 cells, untransformed Bhas 42 cells grow to confluence, forming a cell-density-dependent monolayer. However, after exposure to a transforming chemical, cells become morphologically altered and form discrete foci on the confluent monolayer. Bhas 42 cells can

* Corresponding author.

E-mail addresses: anaïs.kirsch@inrs.fr (A. Kirsch), helene.dubois-pot-schneider@univ-lorraine.fr (H. Dubois-Pot-Schneider), caroline.fontana@inrs.fr (C. Fontana), herv.e.schohn@univ-lorraine.fr (H. Schohn), laurent.gate@inrs.fr (L. Gat e), yves.guichard@inrs.fr (Y. Guichard).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108900>

Received 18 July 2019; Received in revised form 25 October 2019; Accepted 12 November 2019

Available online 15 November 2019

0009-2797/  2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations

SAS	Synthetic amorphous silica nanoparticles	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate	PBS	Phosphate buffer saline
DE	Diatomaceous earth	RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
CTA	Cell transformation assay	SDS PAGE	Sodium dodecyl sulphate poly-acrylamide gel electrophoresis
OECD	Organization for economic cooperation and development	PVDF	Polyvinylidene difluoride
FBS	Fetal bovine serum	BSA	Bovine serum albumin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	HRP	Horseradish peroxidase
D21	Day 21	AUNIP	Aurora kinase A and Ninein interacting protein
DMSO	Dimethyl sulfoxide	LGALS7	Galectin-7
RINs	RNA integrity number	LUM	Lumican
FC	Fold change	IL1RL1	Interleukin1 receptor-like 1
GSEA	Gene set enrichment analysis	MCM10	Mini Chromosome Maintenance deficient 10
ES	Enrichment score	PRL2C	Proliferin
MSigDB	Molecular signatures database	TIMP4	Metallopeptidase inhibitor 4
ACTB	β -Actin	LOAEL	Lowest observed adverse effect level
TUBA	α -Tubulin	IPA	Igenuity pathway analysis
		ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

respond to a tumor-promoter without undergoing preliminary treatment with an initiator, in contrast with the two-stage Balb/c 3T3 CTA [13,14]. The Bhas 42 CTA was validated with a number of known carcinogens and non-carcinogens [15] and is now the subject of a guidance document produced by the Organization for Economic Cooperation and Development [16].

Cell transformation depends on a cascade of complex events that occur within a few hours or weeks [17]. To decipher these processes, the transcriptomic approach allows access to a global gene signature of cellular function after cell exposure to chemicals [18]. The aim of this study was thus to use transcriptomic analysis to identify an early gene signature for Bhas 42 cell transformation that is shared by an SAS, a crystalline silica and the tumor promoter 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Based on previous data [8], the transcriptomic procedure was carried out after Bhas 42 cell exposure to the SAS NM-203, which in the previous study induced the highest level of cell transformation. In addition, the crystalline silica Min-U-Sil 5[®] and the amorphous silica DE (diatomaceous earth) were used as transforming and non-transforming reference particles, respectively [19].

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Bhas 42 cells were obtained from Harlan Laboratories (Rosdorf, Germany). Cells were grown in Eagle's minimum essential medium (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France), supplemented with 1% (v/v) antibiotic (Streptomycin and Penicillin, Gibco™) and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Dutscher, Brumath, France) (M10F) in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C up to about 70% confluence. Cells were recovered using a 0.25% (v/v) Trypsin/EDTA solution (Invitrogen) and sub cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (Gibco™) supplemented with 1% (v/v) antibiotic and 5% (v/v) FBS (DF5F) at about 70% of the confluence to be used in the CTA.

2.2. Cell transformation and cell survival assays

The CTA in promotion condition, originally proposed by the OECD [16], was modified as described previously [8] (Supplementary Fig. A1). Cells were seeded at 1460 cells/cm² in a six-well plate on day 0 and the cells were treated once on day 4 (D4). The cells were then post-cultivated in fresh medium until day 21 (D21), receiving a medium change on days 7 (D7), 10 and 14. Cells were fixed with ethanol (Fisher, France) and stained with a 5% (v/v) Giemsa solution (Thermo Fisher

Scientific) on D21. The transformed foci were evaluated according to the morphological criteria recommended by the OECD (2016). For each experiment, the mean number of transformed foci per treatment group was determined from six replicate wells.

Cell cytotoxicity was assessed by cell survival assay on D7 performed as follows: cells were suspended by trypsination and stained with a mixture of acridine orange/propidium iodide (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), and then counted using a Cellometer® (Vision Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Cell survival was expressed as the percentage of living cells after cell exposure to the chemical per living cells counted in the untreated condition.

2.3. Particles and cells treatments

Silica nanoparticles (NM-200, NM-201, NM-202, and NM-203) were obtained from the Joint Research Centre nanomaterials repository (Ispra, Italy) (Supplementary Table A1). Min-U-Sil 5[®] was obtained from US Silica Co and DE was obtained from the European Coal and Steel Community (Paris, France). Thorough physical and chemical characterizations of SAS, Min-U-Sil 5[®] and DE batches have been described previously [8]. For cell treatment, vials containing particles suspended in sterile deionized water (19.2 mg/ml) were sonicated for 5 min at 10% amplitude in the cup horn of a 400 W Branson Sonifier S-450D (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, CT). Serial dilutions were prepared in water from the sonicated suspension. Each dilution was added to DF5F to give a final concentration of water of 2% (v/v). Final particle concentrations were expressed as mass per cell culture surface area and ranged from 1 μ g/cm² to 40 μ g/cm² depending on the assay. TPA (Sigma-Aldrich) was diluted at 0.05 μ g/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich) at a final concentration of 0.1% (v/v).

2.4. RNA extraction and quality control

For both transcriptomic analysis and RT-qPCR, RNA samples were obtained from four independent experiments. In both cases, total RNA was extracted from treated cells on D6 using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. RNA purity and integrity were evaluated with an Agilent Bioanalyser (Agilent Technologies). All RINs (RNA integrity numbers) were greater than 8.

2.5. Transcriptomic analysis

Transcriptomic analysis was carried out with total RNA extracted from cells exposed from D4 to D6 to NM-203 (1, 2 and 5 μ g/cm²), Min-

U-Sil 5[®] (20 µg/cm²), DE (5 µg/cm²), TPA (0.05 µg/mL) and their associated vehicle control: 2% (v/v) H₂O for NM-203, Min-U-Sil 5[®] and DE and 0.1% (v/v) DMSO for TPA. One hundred nanograms of total RNA were used to synthesize double-stranded cDNA and cyanine labeled cRNA using the one-color low-input QuickAmp labeling kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. cRNA were purified using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). cRNA were hybridized to an Agilent Sureprint G3 mouse gene expression v2 8 × 60 k pangenomic microarray. Gene expression data were extracted using Feature Extraction 11.0.1.1 and analysed using GeneSpring 14.9-GX-PA software (Agilent Technologies).

The microarray data obtained in this study were deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus and were accessible through GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE133279>).

To determine the dose effect of NM-203 (at 1, 2 and 5 µg/cm²), a one-way ANOVA, followed by a Tukey post-hoc test and a Benjamini-Hochberg multiple correction test, was performed with a p-value < 0.005 and a Fold Change (FC) > 4. To determine genes deregulated significantly between two conditions (treatment vs control (H₂O or DMSO)), an unpaired t-test (Benjamini-Hochberg correction) with a p-value < 0.05, FC > 2 or with a p-value < 0.005, FC > 4 was used.

2.6. Bioinformatic analysis

Microarray data were clustered with Gene Cluster 3.0 software and the tree was visualized using TreeView 1.6 software. An uncentred correlation was applied for the measure of similarity and gene clustering was based on complete linkage. Biological functions corresponding to the main clusters were evaluated using the FuncAssociate 2.0 web-based tool.

For treatment signature analyses, top canonical pathways were identified with ingenuity pathway analysis (IPA) software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) and signature enrichment analysis was conducted with Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software by using the Java-tool developed at the Broad Institute (Cambridge, MA, USA) on a normalized and filtered list of genes. Unsupervised GSEA was performed on the whole C2 collection of curated gene sets from the molecular signatures database (MSigDB). Enrichment score (ES) was determined after 1000 permutations.

2.7. Gene expression analysis by RT-qPCR

Total RNA was reverse-transcribed with the iScript™ cDNA synthesis Kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) following the manufacturer's protocol. Real-time PCR was performed with CFX96 Touch™ (BioRad)

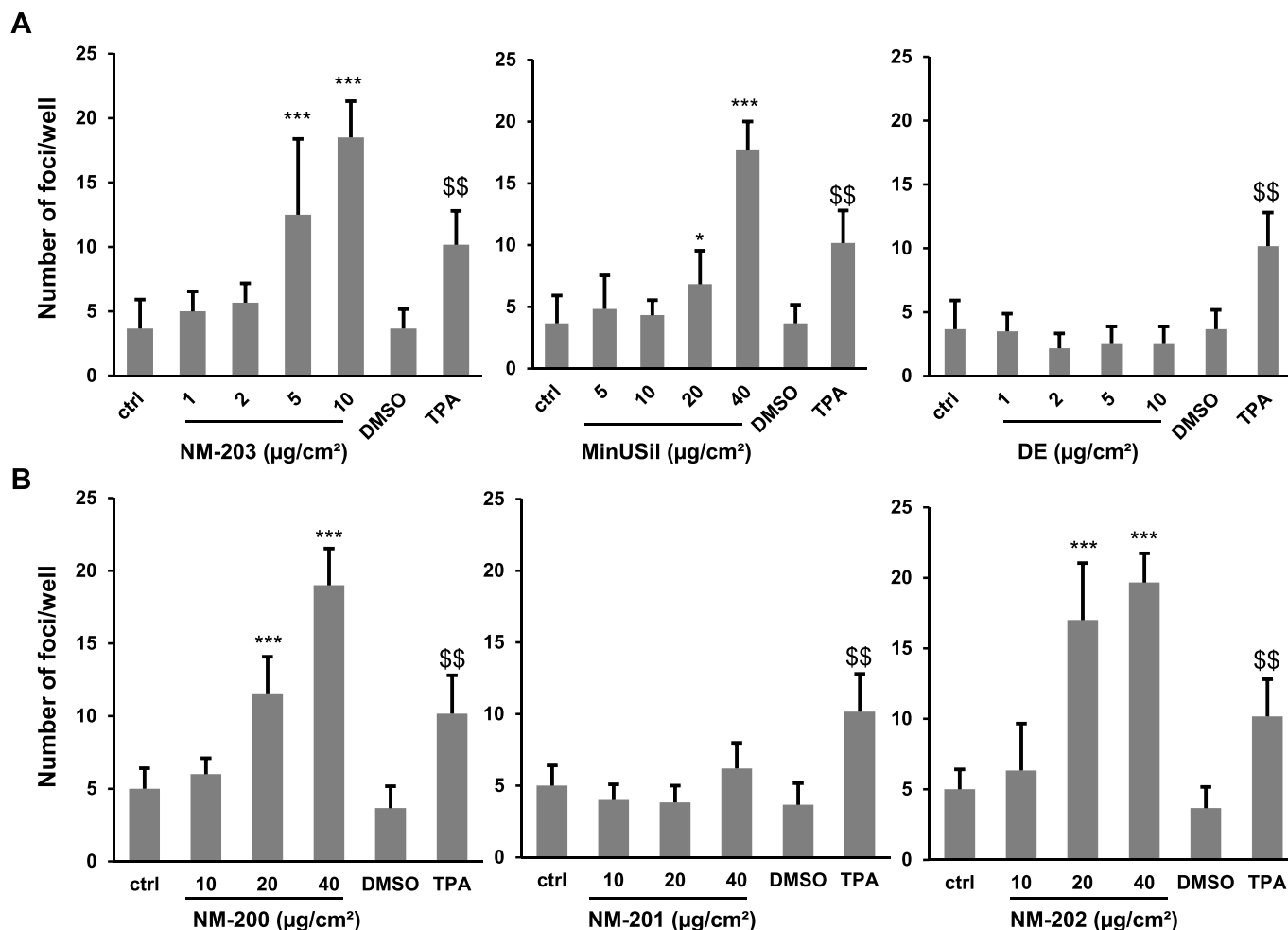


Fig. 1. Bhas 42 cell transformation assay.

(A). Bhas 42 cells were treated once with increasing concentrations of NM-203, Min-U-Sil 5[®] or DE cultivated over 21 days. Foci, resulting from cell transformation, were counted as described in the *materials and methods* section. (B). Similar experiments were performed with NM-200, NM-201 and NM-202. The values obtained after cell exposure to TPA (0.05 µg/ml) or DMSO (used as the vehicle for TPA), were added to each histogram. Results are expressed as the mean ± SD (n = 6). ***: p < 0.005, comparison of results obtained from cells exposed to nanoparticle versus cells treated with H₂O (ctrl). \$\$: p < 0.01, comparison of results obtained from cells exposed to TPA versus cells treated with DMSO after mixed linear regression modelling followed by a Bonferroni correction.

in the presence of iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad) and PrimePCR Assay (or 2.5 μM of each primer (Eurogentec, Anger, France) (Supplementary Table A2).

Amplification was performed following the manufacturer's protocol: the annealing temperature was 60 °C for all pairs of primers. PCR results were analysed using the SQ method. The results were expressed as relative to those of control cells treated with H₂O or DMSO, arbitrarily set to 1. *ACTB* (beta-Actin), *TUBA* (alpha-Tubulin), and *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were used as housekeeping genes whose values have been averaged (geometric mean).

2.8. Protein analysis

Bhas42 cells were treated as stated before. On D6, cell medium supernatants were harvested and stored at -80 °C. Cell layers were washed 3 times with cold PBS (1.44 mM Na₂HPO₄, 0,2 mM KH₂PO₄ containing 0.148 M NaCl, 2 mM KCl) and scraped with a rubber policeman with ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS and 1% (v/v) protease and phosphatase inhibitor mixture (Thermo Scientific). The homogenates obtained were placed under agitation for 30 min at 4 °C, then centrifuged at 16,000 g

for 20 min at 4 °C. Supernatants were collected and stored at -80 °C. Protein concentration was measured in each sample and corresponding cell medium supernatant, using bovine serum albumin as a standard (Protein quantification kit, Sigma-Aldrich).

Proteins (50 μg) of whole cell homogenates or 20 μl of corresponding cell medium supernatants were resolved in 4–20% SDS PAGE (Criterion™ Tris-Glycine eXtended Stain-Free Protein Gel, BioRad) and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (BioRad), using semi-dry transfert (BioRad). The saturation step was performed in PBS-T buffer (PBS supplemented with 0.1% (v/v) Tween 20) containing 5% (w/v) non-fat milk for 1 h at room temperature. Antibody solutions were prepared in PBS-T containing 5% (w/v) BSA) and membranes were incubated overnight at 4 °C with gentle agitation. Primary antibodies were directed against Aurora kinase A and Ninein interacting protein (AUNIP, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France; 1: 500), Galectin-7 (ab206435; Abcam, Paris, France; 1: 1000), Lumican (LUM, 7076P2, Cell Signaling Technology; 1: 250), Interleukin1 receptor-like 1 (IL1RL1, Cell Signaling Technology, 1: 1000), Mini Chromosome Maintenance deficient 10 (MCM10, Cell Signaling Technology, 1:500), Proliferin (AF1623; R&D System; 1: 1000), Metallopeptidase inhibitor 4 (TIMP4, Abcam; 1: 5000), and β-Actin (4970; Cell Signaling Technology; 1: 10,000). Membranes were

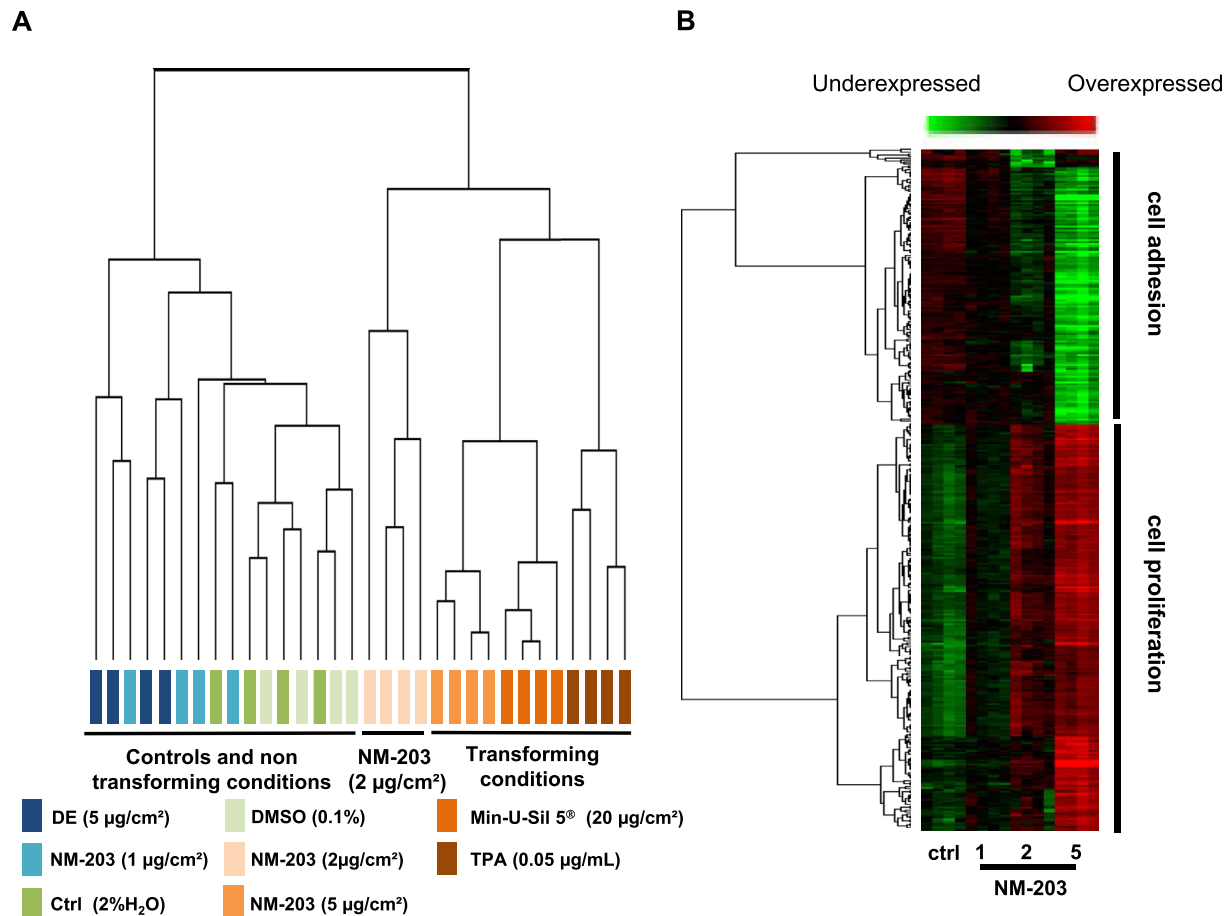


Fig. 2. Hierarchical clustering of Bhas 42 cells after treatments.

Cells were exposed to NM-203 (1, 2 or 5 μg/cm²), Min-U-Sil 5® (20 μg/cm²), DE (5 μg/cm²) and TPA (0.05 μg/mL). (A) A non supervised hierarchical cluster was obtained after filtering microarray data, using Gene Cluster 3.0 software on 19,569 probes. Gene clustering was visualized with Treeview. An uncentred correlation was used as a measure of similarity and complete linkage was used for the clustering method. (B) Dose effect of NM-203 (1–5 μg/cm²). Supervised hierarchical clustering was performed with Gene Cluster 3.0 software and visualized by Treeview on the 285 probes obtained after filtration and application of the ANOVA statistical test (p-value < 0.005 and FC > 4), by comparing NM-203 (1 μg/cm²), NM-203 (2 μg/cm²) and NM-203 (5 μg/cm²) and control H₂O, followed by a Tukey post-hoc test. An uncentred correlation was used as a measure of similarity and complete linkage was used for the clustering method. Green indicates lower expression; red indicates higher expression. Biological functions related to the main clusters were evaluated using the FuncAssociate 2.0 program. (Abbreviations: Ctrl, control (H₂O); TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; DE, diatomaceous earth; DMSO, dimethyl sulfoxide. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

washed 3 times with PBST, then incubated for 1 h at room temperature with either HRP-conjugated anti-goat IgG (1: 5000) or HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1: 2000) in PBST containing 5% (w/v) non-fat milk. Finally, membranes were washed 3 times with PBST before chemiluminescence detection (Clarity™ Western ECL Substrate, BioRad) using ChemiDoc™ (ChemiDoc™ System, BioRad).

Secreted periostin concentration was estimated using a Mouse Periostin/OSF-2 Duoset ELISA kit (R&D Systems, Lille, France). Sample concentration was expressed as ng of periostin/mg of protein.

2.9. Statistics

Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism software (Version 8.0.1; Graphpad, San Diego, CA). For CTA and cell survival assays logarithmic transformation was applied to the data. For multiple comparisons, the significance was evaluated by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparisons test.

An unpaired *t*-test was used for two by two comparison (treatments vs. control (H₂O or DMSO)).

Data are given as a mean ± standard deviation (mean ± SD).

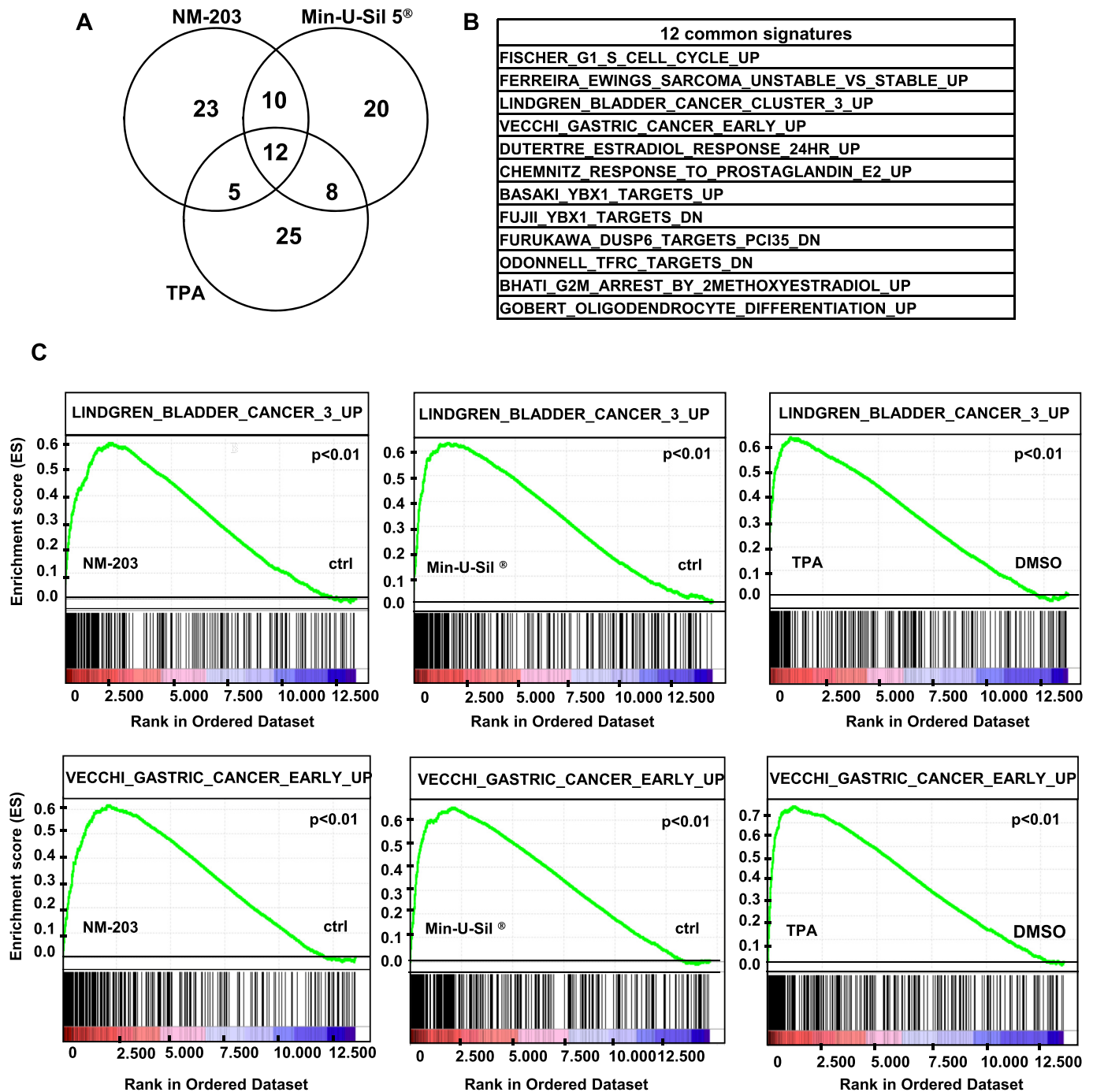


Fig. 3. Gene set enrichment analysis.

(A) GSEA analysis using the filtered gene expression profiles of Bhas 42 cells 48 h after treatment with NM-203 (5 µg/cm²), Min-U-Sil 5® (20 µg/cm²) and TPA (0.05 µg/ml) over 48 h. Venn diagram of the top 50 signatures. (B) List of the 12 common signatures. (C) GSEA revealed an enrichment in gene signatures related to cell cycles and cancer that was common to the three conditions, for example the “Lindgren_bladder_cancer_3_up” signature (upper panels), and the “Vecchi_gastric_cancer_early_up” signature (lower panels).

3. Results

3.1. Cytotoxic and transforming effects of NM-203, Min-U-Sil 5[®], DE and TPA

CTAs in promotion condition were performed according to the OECD guidance document [16], except that instead of receiving three treatments during the assay, cells were treated once on Day 4. Cytotoxicity assays were performed on D7 applying the dose range of particles used in the previous study [8]. The cytotoxic effect of NM-203, Min-U-Sil 5[®] and DE was moderate; the decrease in cell survival was less than 30% (Supplementary data Table A.3). NM-203 and Min-U-Sil 5[®] induced a significant dose-response effect on cell transformation (Fig. 1A). The lowest observed adverse effect level (LOAEL) was observed at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NM-203 and Min-U-Sil 5[®], respectively. TPA at 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, used as a positive control, induced cell transformation. In contrast, DE did not show any transforming activity.

3.2. NM-203, Min-U-Sil 5[®] and TPA induce alteration of genes involved in cell proliferation and cell adhesion

After normalization and filtering of the raw transcriptomic data using the Genespring software, 19,569 probes were listed. Non supervised hierarchical clustering (Fig. 2A) of these 19,569 remaining probes, showed two main branches, dividing the samples into two groups with regards to the transforming potential: a first group with control conditions (ctrl = 2% (v/v) H₂O or 0.1% (v/v) DMSO) and non-transforming conditions (DE at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and NM-203 at 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and a second group including NM-203 at 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and transforming conditions (NM-203 at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Min-U-Sil[®] (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), TPA (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$)). The Min-U-Sil 5[®] (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) group was closer to the NM-203

(5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) group than to the TPA (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) group. The NM-203 (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) group, which was a transforming condition in the Bhas 42 CTA performed with three treatments but not with a single treatment [8], seems to induce gene expression modulation even with a single treatment. To study the dose-effect of NM-203, an ANOVA test was performed with a *p*-value lower than 0.005 selected. Genes that were expressed differently in at least one condition (vs. control) with a fold change (FC) greater than 4 were selected (supplementary Table A4). Hierarchical clustering of the 290 differentially expressed genes showed that increasing the concentration of NM-203 led to a higher increase or decrease response at the mRNA level (Fig. 2B). Treeview analysis highlighted co-regulated groups of genes. Interestingly, the upper part of the dendrogram grouped clusters of genes down-regulated after NM-203 treatment (124 genes) and involved in matrix remodeling and cell adhesion, and the lower part of the dendrogram highlighted genes up-regulated after NM-203 treatment (166 genes) and involved in cell proliferation.

Gene set enrichment analysis (GSEA) identified significant enrichments (*p* < 0.01) of signatures for each treatment (Supplementary Table A5). Comparison of the top 50 signatures highlighted for each treatment showed that 24% of signatures were common to the three conditions (Fig. 3A). These twelve common signatures are related mainly to proliferation and cancer features (Fig. 3B and C) [20,21]. To identify genes significantly deregulated by each treatment, an unpaired *t*-test (Bonferroni FWER correction) with a *p*-value < 0.05, FC > 2 was used. RNA levels of 1,620 genes were modified after cell treatment by NM203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Supplementary Table A.6), 1,080 genes with Min-U-Sil 5[®] (Supplementary Table A.7), and 392 genes by TPA (Supplementary Table A8). Interestingly, NM-203 at 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ induced significant changes in the expression of 512 genes (Supplementary Table A9). IPA analysis on a smaller set of genes (selected with an

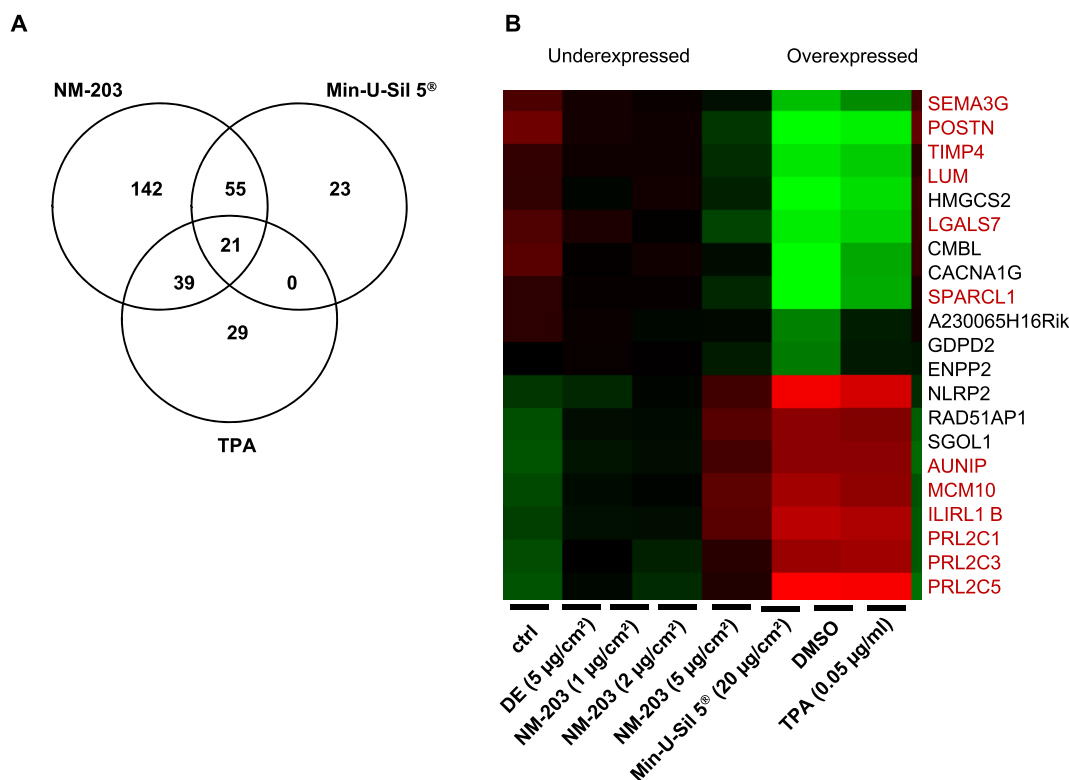


Fig. 4. Molecular signature comparison and selection of common genes.

(A): Venn diagram comparing the molecular signatures of NM-203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), Min-U-Sil 5[®] (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and TPA (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (*p* < 0.005 and FC > 4). (B): Heatmap of 21 common genes regulated by the three transforming compounds obtained with Gene Cluster 3.0 software and visualized with Treeview. An average of the expression of each gene was obtained for each condition. Green indicates the lower gene expression; red the higher gene expression. The writing in red corresponds to the selected genes of interest. (Abbreviations: ctrl, control H₂O, TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; DE, diatomaceous earth). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1
Characteristics of the selected genes.

Gene symbol	Gene title	Gene ontology	Protein localisation	Expression level	References
<i>AUNIP</i>	Aurora Kinase A And Ninein Interacting Protein	Aurk-A interaction during cell cycle	Nucleus	Up	[45]
<i>IL1RL1</i>	Interleukin-1 receptor-like 1	Immune response	Plasma membrane	Up	[22]
<i>LGALS7</i>	Galectin-7	Cell-cell and/or cell-matrix interactions	Extracellular space	Down	[57]
<i>LUM</i>	Lumican	Extracellular matrix organization	Extracellular space	Down	[58]
<i>MCM10</i>	Mini-chromosome Maintenance 10	DNA replication	Nucleus	Up	[59]
<i>POSTN</i>	Periostin	Cell adhesion	Extracellular space	Down	[60]
<i>PRL2C1</i>	Prolactin family 2, subfamily c, member 1	Positive regulation of cell proliferation	Extracellular space	Up	[23,24]
<i>PRL2C3</i>	Prolactin family 2, subfamily c, member 3	Positive regulation of cell proliferation	Extracellular space	Up	[23,24]
<i>PRL2C5</i>	Prolactin family 2, subfamily c, member 5	Positive regulation of cell proliferation	Extracellular space	Up	[23,24]
<i>SEMA3G</i>	Semaphorin-3G	Endothelial cell migration	Cytoplasm	Down	[61]
<i>SPARCL1</i>	Secreted protein acidic and rich in cysteine like protein 1	Cell adhesion	Extracellular space	Down	[62]
<i>TIMP4</i>	Metalloproteinase inhibitor 4	Inhibitor of metalloproteinase	Extracellular space	Down	[63]

Table 2
Fold change value^a and correlation between microarray data and RT-qPCR results.

Gene symbol		NM-203 (1 µg/cm ²)	NM-203 (2 µg/cm ²)	NM-203 (5 µg/cm ²)	Min-U-Sil 5* (20 µg/cm ²)	DE (5 µg/cm ²)	TPA (0.05 µg/ml)	r
<i>AUNIP</i>	Microarray	1.87	5.90	6.22	5.02	1.37	4.74	0.742
	RT-qPCR	1.10	1.70	7.06	2.94	1.38	4.23	
<i>IL1RL1B</i>	Microarray	1.64	3.74	4.60	5.06	1.66	4.39	0.844
	RT-qPCR	1.30	1.69	5.88	3.78	1.83	4.76	
<i>LGALS7</i>	Microarray	0.81	0.68	0.10	0.16	0.63	0.29	0.961
	RT-qPCR	0.69	0.42	0.02	0.06	0.75	0.09	
<i>LUM</i>	Microarray	0.64	0.70	0.11	0.23	0.55	0.28	0.928
	RT-qPCR	0.49	0.33	0.05	0.06	0.67	0.16	
<i>MCM10</i>	Microarray	1.64	5.26	7.29	6.27	1.25	4.74	0.846
	RT-qPCR	1.27	2.08	8.50	3.94	1.48	3.82	
<i>POSTN</i>	Microarray	0.53	0.35	0.09	0.10	0.47	0.08	0.969
	RT-qPCR	0.66	0.31	0.04	0.04	0.71	0.03	
<i>PRL2C1</i>	Microarray	1.49	3.94	18.95	17.46	1.60	13.12	0.962
	RT-qPCR	2.10	4.17	54.40	53.26	3.44	20.00	
<i>PRL2C3</i>	Microarray	1.63	5.42	22.82	22.73	1.61	20.26	0.954
	RT-qPCR	1.45	3.10	29.11	29.64	2.30	14.75	
<i>PRL2C5</i>	Microarray	1.64	4.81	17.51	17.35	1.61	13.22	0.880
	RT-qPCR	1.97	4.25	18.55	8.44	4.10	15.00	
<i>SEMA3G</i>	Microarray	0.60	0.50	0.14	0.27	0.46	0.21	0.889
	RT-qPCR	0.73	0.38	0.13	0.05	0.87	0.09	
<i>SPARCL1</i>	Microarray	0.61	0.65	0.04	0.10	0.44	0.27	0.929
	RT-qPCR	0.59	0.32	0.02	0.03	0.64	0.12	
<i>TIMP4</i>	Microarray	0.57	0.52	0.11	0.22	0.54	0.12	0.960
	RT-qPCR	0.67	0.45	0.02	0.06	0.79	0.03	

^a Fold change values were calculated from results obtained from either microarray or RT-qPCR. Results are expressed with respect to control cells, taken as 1.00. Control cells were treated with H₂O used as the vehicle for respective SAS, DE or Min-U-Sil 5*, and with DMSO as the vehicle for TPA.

unpaired *t*-test with a *p*-value < 0.005, FC > 4; [Supplementary Table A10-A13](#)) showed that the former three treatments regulated a number of common pathways involved mainly in cell proliferation ([Supplementary Table A14](#)).

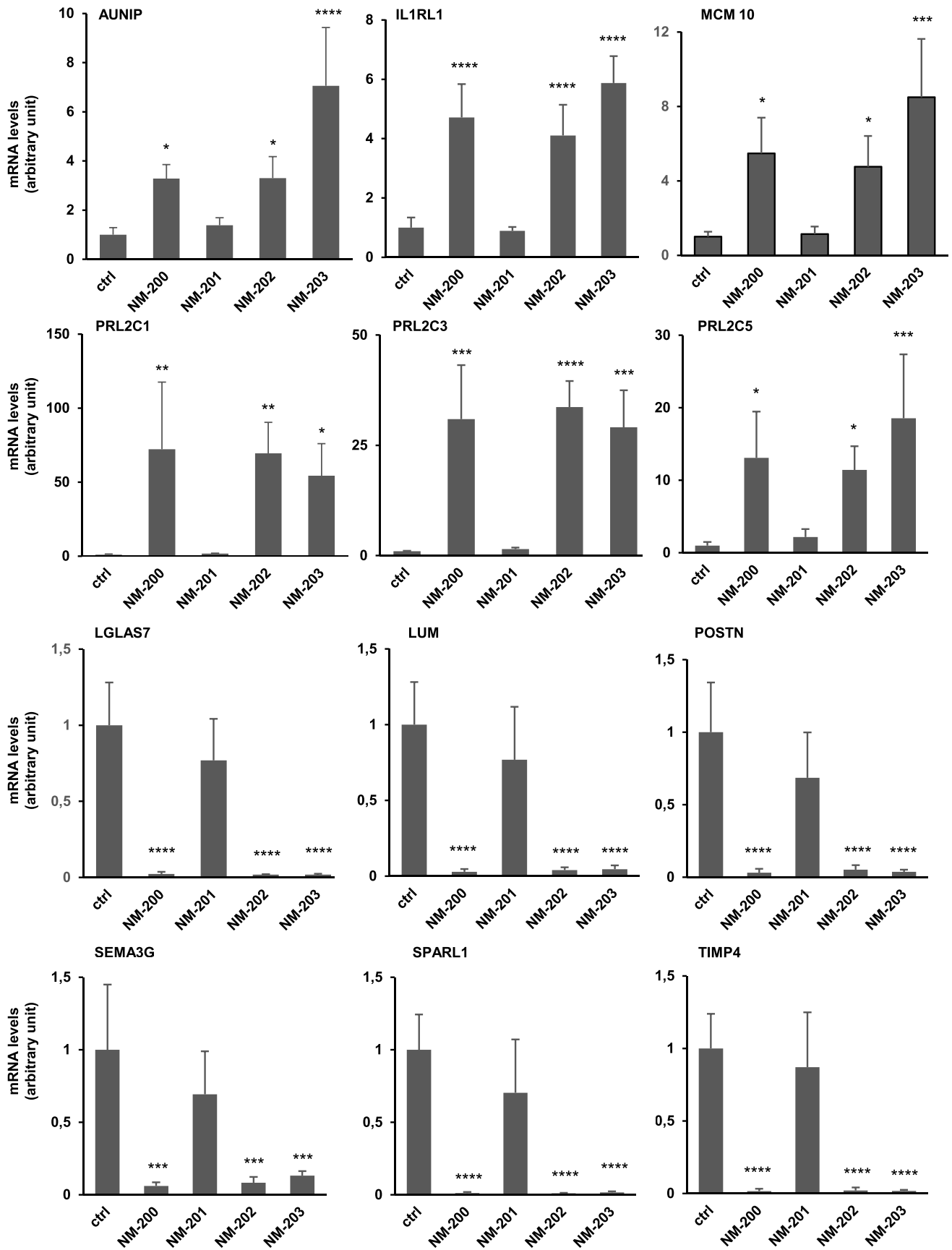
3.3. Comparison of early molecular signature and selection of common genes

Genes significantly highly regulated by NM-203 (5 µg/cm²), Min-U-Sil 5* and TPA were compared (*p* < 0.005 and FC > 4) ([Fig. 4A](#)). Of the 309 genes altered by treatments, a large majority (83%) were affected by NM-203. Among these, 142 (46%) were affected solely by NM-203 treatment and 23 (7%) and 29 genes (9%) were deregulated by Min-U-Sil 5* and TPA, respectively. Interestingly, 21 common genes were regulated significantly by NM-203 (5 µg/cm²), Min-U-Sil 5* and TPA (*p* < 0.005, FC > 4). Twelve genes, *CACNA1G*, *CMBL*, *ENPP2*, *GDPD2*, *HMGCS2*, *LGALS7*, *LUM*, *POSTN*, *SEMA3G*, *SPARCL1*, *TIMP4*, and *A230065H16Rik*, were underexpressed whereas 9 genes, *RAD51AP1*, *NLRP2*, *SGOL1*, *IL1RL1*, *PRL2C3*, *PRL2C5*, *PRL2C1*, *AUNIP* and *MCM10* were overexpressed ([Fig. 4B](#)). We selected 6 genes known to be involved in cell proliferation (*AUNIP*, *IL1RL1*, *MCM10*, *PRL2C1*, *PRL2C3* and *PRL2C5*) and 6 genes involved in cell-cell adhesion

(*LGALS7*, *LUM*, *POSTN*, *SEMA3G*, *SPARCL1*, and *TIMP4*) ([Table 1](#)). For all these genes, RT-qPCR results were broadly in line with transcriptomic results and confirmed the dose-effect produced by NM-203 ([Table 2](#)).

3.4. Transforming silica nanoparticles NM-200 and NM-202 induce similar changes at the RNA level of the selected genes

We then assessed whether Bhas 42 cell exposure to other SAS, namely NM-200, NM 201 and NM202, led to cell transformation and involved any changes at the RNA level of the selected genes. NM-200 were slightly cytotoxic at the highest concentration (40 µg/cm²) while NM-202 decreased cell survival by approximately 50% at 40 µg/cm². NM-201 treatment had no cytotoxic or transforming effect ([Fig. 1B](#) and [supplementary Table A3](#)). Bhas 42 cell exposure to NM-200 (20 µg/cm²) or NM-202 (20 µg/cm²) led to similar expression patterns as those obtained when cells were treated with NM203 (5 µg/cm²), *i.e.* an increase in RNA levels of *AUNIP*, *IL1RL1*, *MCM10*, *PRL2C1*, *PRL2C3* and *PRL2C5*, and a decrease for *LGALS7*, *LUM*, *POSTN*, *SEMA3G*, *SPARCL1*, and *TIMP4*. In contrast, cells exposed to NM-201 showed no change in each gene expression ([Fig. 5](#)).



(caption on next page)

Fig. 5. Expression changes induced by silica nanoparticles NM-200, NM-201 and NM-202.

Relative expression of the 12 selected genes (*AUNIP*, *IL1RL1* (Isoform B), *MCM10*, *PRL2C1*, *PRL2C3*, *PRL2C5*, *LGLAS7*, *LUM*, *POSTN*, *SEMA3G*, *SPAR1* and *TIMP4*) after 48 h-treatment of Bhas 42 cells with NM-200 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), NM-201 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), NM-202 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and NM203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). The results are presented with respect to those of control cells taken as 1.00. The results are expressed as the mean of four independent experiments. * indicates $p < 0.05$, ** indicates $p < 0.01$, *** indicates $p < 0.005$, **** indicates $p < 0.001$ versus control cells after a one-way ANOVA test followed by a Dunnett's multiple comparisons test. (Abbreviations: Ctrl, control (H_2O)).

3.5. Changes at the protein level

We assessed whether the increase at the mRNA level of selected genes was related to corresponding changes at the protein level. We performed Western blotting procedure or ELISA with available commercial antibodies (Fig. 6). Among the antibodies tested, we could not estimate the respective protein expression levels of *AUNIP*, *LUM*, *TIMP4*, due to a lack of a specific antibody (presence of a non-specific band) or due to low immune signals.

Among the list of genes with increased expression after Bhas42 cell treatment, *IL1RL1*, as the receptor of *IL33*, was detected with an estimated band at 37 kDa, in all conditions tested, with slight changes between control and treated cell homogenates. Moreover, glycosylated *IL1R1* could be secreted as a response to reduce receptor signaling by *IL33* [22]. Glycosylated *IL1R1* appears as a broad band around 50 kDa, but slight changes in the secreted receptor levels were observed. Proliferin, as a growth hormone/prolactin related secreted glycoprotein [23,24], encoded by *PRL2C1*, *PRL2C3*, *PRL2C5* genes, was detected in whole cell homogenate and in cell medium supernatant as a single band at 60 kDa. As shown in Fig. 6, the protein was secreted in all conditions tested, but we failed to detect it in homogenates prepared from cells treated with H_2O , DMSO, NM-201, low concentrations of NM-203 (1 and 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), and DE, supporting the concept that proliferin is continuously secreted. In contrast, the protein was detected in cell homogenates prepared from cells exposed to NM-200, NM-202, NM-203 (2 and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), Min-U-Sil 5 $^\circ$, and TPA, suggesting that the synthesis rate of the protein is enhanced under these experimental conditions.

Among the genes showing decreased expression after cell exposure to SAS, periostin, involved in cell matrix adhesion and epithelial mesenchymal transition [25], was measured by ELISA in cell medium supernatants. Protein levels were lowered when Bhas 42 cells were treated with 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of NM-200, NM-202 and Min-U-Sil 5 $^\circ$, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ NM-203 and 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TPA, in agreement with the observed decrease in mRNA levels. However, protein levels were also low when cells were exposed to NM-201 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) or NM-203 (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), whereas no change was found when cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ NM-203 or 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ DE (Fig. 6). *MCM10*, involved in DNA recombination and elongation [26] was also detected in whole cell homogenate as a band estimated at 100 kDa. We did not observe any significant changes at the protein level whatever the treatment tested. These results could be related to the experimental design of the CTA, since, from the beginning of cell treatment on D4, Bhas 42 cells continue to undergo cell division until D6, maintaining a high level of *MCM10*, a protein necessary for DNA synthesis [26]. Finally, galectin 7, involved in cell-cell or cell-matrix interaction [27], was detected in whole cell homogenates with a band estimated at 37 kDa (Fig. 6). Galectin 7 levels were lowered when cells were treated with NM-200, NM-202, NM-203 (2 and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), and Min-U-Sil 5 $^\circ$ (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), whereas no change was found in the other conditions tested.

4. Discussion

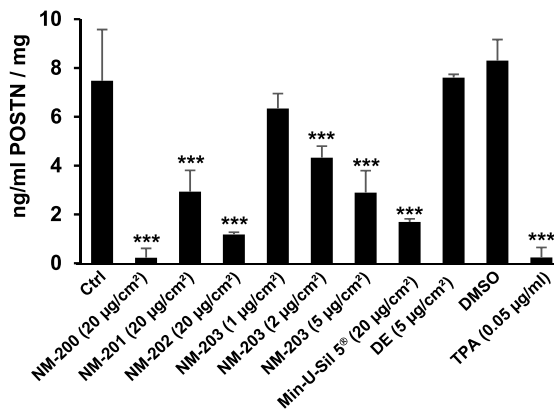
4.1. Selection of genes as possible markers of SAS-induced Bhas42 cell transformation

Although SAS are extensively produced and used, few studies have focused on their transforming or carcinogenic potential [1,3]. In a previous study, the transforming properties of the NM-200, NM-201,

NM-202 and NM-203 SAS were revealed in the Bhas 42 CTA using the promotion assay. In order to decipher the molecular changes during the Bhas 42 CTA, an unsupervised transcriptomic analysis was performed following exposure of cells to SAS and control chemicals for 48 h. In this treatment time, NM-203 and Min-U-Sil 5 $^\circ$ have been shown to induce epigenetic effects in Bhas 42 cells in the promotion assay [28]. We therefore hypothesized that this treatment time could highlight earlier gene changes involved in Bhas 42 cell transformation. The lowest concentrations of chemicals able to induce cell transformation without inducing cytotoxicity were selected in transcriptomic and RT-qPCR assays. The expression of 21 genes was altered by the three treatments, NM-203, Min-U-Sil 5 $^\circ$ and TPA. Among them, twelve genes, whose involvement in cell proliferation and adhesion has been proven (Table 1), were selected as putative markers of the transforming properties of SAS nanomaterials. To confirm this hypothesis, we tested the NM-200, NM201 and NM-202 SAS (Figs. 1B and 5). Similar changes in the RNA levels of each selected gene were obtained with NM-200 and NM-202, supporting the hypothesis that the genes in this set are potential markers of SAS-induced cell transformation. However, NM-201 treatment induced no change in the expression of these 12 genes (Fig. 5). This could be explained by the fact that, unlike the three repeated treatments of NM-201 [8]), a single treatment did not cause Bhas 42 cell transformation. One reason for this could be that NM-201 has a lower BET-SSA than the other SAS (140 vs \approx 200 g/cm^2) (Table A1). Indeed, the toxicity of nanomaterials is often associated with their high specific surface area, which results in a high reactivity with the biological environment. In addition, we demonstrated concomitant changes in the mRNA and protein levels of several genes, such as galectin 7, periostin or proliferin. However, a concordance between mRNA and protein levels was not systematically found. It is possible that regulation mechanisms of protein synthesis and processing may occur.

Interestingly, the increase in *PRL2Ci* mRNA levels, encoding proliferin, was observed in CTA performed with BALB c/3T3 cells [13,14] and C3H/10T1/2 cells [29,30] treated with various chemicals including amorphous silica particles (silica gel of 5 μm). Proliferin expression was considered as a predictive biomarker of cell transformation [13,14]. However, even though the expression of three members of the proliferin gene family, *PRCL2C2,3,5*, was upregulated, proliferin was revealed as a single band by western blotting. On the other hand, c-myc upregulation was also linked to C3H/10T1/2 [29] and Bhas 42 cell transformation [28]. In the latter, *C-MYC* mRNA and protein levels increased after cell treatment with NM-203 and Min-U-Sil 5 $^\circ$ over 2 days. Similar changes in mRNA level were also found in the present study with $p < 0.005$ and $\text{FC} > 4$ (Supplementary Tables A10-A11). Accordingly, Bhas 42 cell transformation is associated with early increased *C-MYC* expression, but not in the late phase of SAS-induced cell transformation as shown previously [28]. These results, among others [14,31], confirm that markers of transformation must be identified in the early steps of the processes. Finally, epigenetic modifications have also been related to cell transformation as recently reviewed [32]: it has been shown that cadmium chloride, methyl carbamate and lithocholic acid (three transforming compounds) can induce genome-wide DNA methylation changes in Bhas 42 cells [33]. Moreover, Seidel et al. proposed that the transforming activity of the crystalline silica Min-U-Sil 5 $^\circ$ in Bhas 42 cells was related to early epigenetic DNA methylation [28].

A



B

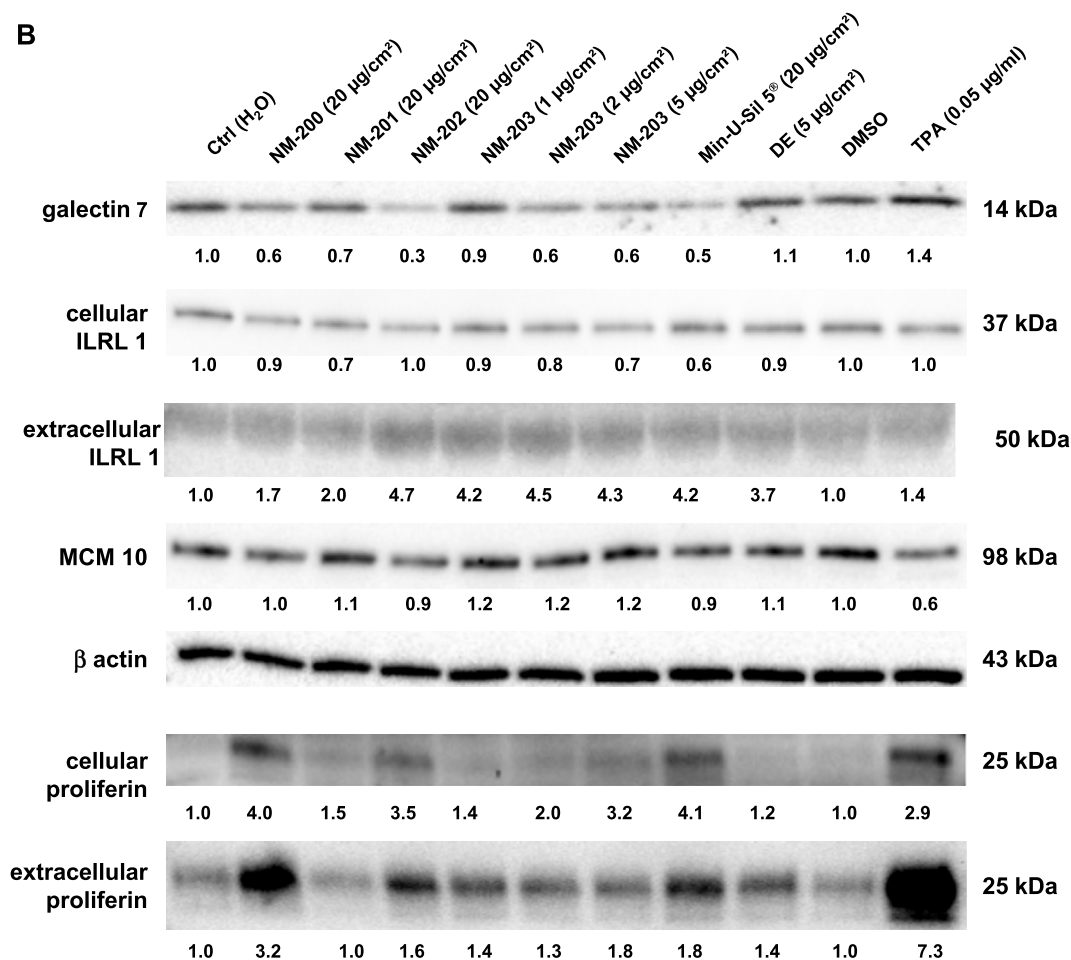


Fig. 6. Protein analysis.

A) Periostin secretion (POSTN) was determined by ELISA in supernatants from cell layers exposed to each nanoparticle over 48 h ^{***}, $p < 0.005$ ($n = 3$) with respect to the control (ctrl = H₂O) or DMSO (used as the vehicle for the particles or TPA, respectively), following a mixed linear regression model followed by a Bonferroni multiple comparison test. Results are expressed as ng of POSTN/ml of supernatant harvested normalized to mg of protein in the respective cell homogenate. **(B)** Protein levels were analysed by Western blotting using cell homogenates. Proliferin and ILR1 were also detected in the cell culture supernatant from treated cells. Results are representative of one out of three independent experiments. β-actin was used as a loading control in each blot, with the exception of extracellular proliferin or ILR1 detection in cell supernatant.

4.2. Gene expression changes after SAS exposure

The transcriptomic analyses showed that NM-203, Min-U-Sil 5[®] and TPA are related to increases in the expression of genes involved in cell cycle progression, to DNA recombination, to decreased matrix and

remodeling functions, and to cell-cell adhesion. This is in accordance with different transcriptomic studies that have used the BALB c/3T3 cell line in the context of CTA [14,31]. Moreover, *ILIRL1*, *LGALS7*, *LUM*, *MCM10*, *POSTN* and *SPARCL1* have all been associated with SAS toxicity. For example, *ILIRL1* has been found to be involved in

inflammasome activation induced by crystalline silica in human lung epithelial cells (BEAS2B) and in primary human bronchial epithelial cells (NHBE) [34,35]. An increase in the expression of *LUM*, *MCM10*, *POSTN*, *SPARCL1* and *IL1RL1* has been observed in RAW 264, 7 cells (murine macrophages cells) treated with SAS (10 or 300 nm) [34]. Pisani et al. showed overexpression of *LUM*, *LGALS7* and *MCM10* in FE1 cells treated with AEROSIL 200® (NM-203) [36]. In addition, variations in gene expression related to the cell cycle or cell adhesion were found after treatment of the lung epithelial cell line FE1 exposed for 24 h to 12, 15 and 20 nm SAS [37]. Furthermore, pathway analysis has revealed that protein contents in the adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell line A549 treated with Min-U-Sil 5® for 24 h are associated with cell proliferation [38].

4.3. Gene expression changes related to cancer progression

All of the genes selected are known to be involved in cancer progression. Six of the genes were overexpressed by the three treatments. In previous studies, for example, overexpression of *IL1RL1*, has been observed in tumor cells from human colon cancer [39], the respective expression of the *PRL2C* gene family was increased in fallopian tube epithelium derived ovarian cancer cells [40], *MCM10* was increased in medulloblastoma, urothelial carcinomas, prostate cancer and breast cancer [41–44] and finally, *AUNIP* was overexpressed in various brain tumors [45]. Conversely, respective expression of the 6 selected genes was downregulated by the three treatments in this study. In previous studies, expression of *LUM*, *POSTN*, *SPARCL1*, *LGALS7*, and *TIMP4*, all involved in cell-cell adhesion, was found to be lowered in various cancers: *LGALS7* expression was decreased in cervical cancer, colon cancer, gastric cancer and in malignant melanoma [27,46–48]; *LUM* was downregulated in various human cancer cell lines [48–50], *POSTN* expression was likewise downregulated in bladder and lung cancer [49]; low expression of *SPARCL1* has been shown to be associated with tumor progression in human gastric, breast and prostate cancers [50–52], and expression of *TIMP4* has been found to be low in malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1 [53]. Moreover, some gene expression changes observed in this study are related to cancer progression. For example, *SEMA3G* expression decreased under our experimental conditions. In contrast, overexpression of *SEMA3G* limits the progression of breast cancer or melanoma cells or the migration and invasion of glioma cells [54,55]. GSEA analysis also revealed an overall enrichment of gene signatures in response to treatment with NM-203, Min-U-Sil 5® and TPA. Among the signatures found, SAS exposure was related to the response to estradiol and prostaglandin and to G2/M arrest by methoxyestradiol and oligodendrocyte differentiation. Estrogen is an important causal factor in breast cancer [56].

5. Conclusion

Using an unsupervised transcriptomic approach, we have identified 12 genes of Bhas 42 cells that are potentially involved in the transforming effect of SAS. The selected genes were mainly related to positive regulation of cell proliferation and negative regulation of cell adhesion. For the first time, this set of genes can be proposed as an *in vitro* RT-qPCR screening assay for assessment of the early stages of SAS-induced Bhas 42 cell transformation. Our analysis will be extended to other nanomaterials and chemicals in order to strengthen the predictivity of this early gene signature.

Declaration of competing interest

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

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Aurélie Remy for performing the statistical analysis of our results, Hami Musaoglu for his technical help, Dr O. Joubert for the use of his transcriptomics facility, and Prof. S.N. Thornton and Dr. Alice Williams for proof-reading the English in the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108900>.

References

- [1] D. Napierska, L.C. Thomassen, D. Lison, J.A. Martens, P.H. Hoet, The nanosilica hazard: another variable entity, *Part. Fibre Toxicol.* 7 (2010) 39, <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-39>.
- [2] ECETOC, ECETOC JACC REPORT, N°51 Synthetic Amorphous Silica, (2006), pp. 1–237 (Cas 7631-86-9).
- [3] S. Murugadoss, D. Lison, L. Godderis, S. Van Den Brule, J. Mast, F. Brassinne, N. Sebahi, P.H. Hoet, Toxicology of silica nanoparticles: an update, *Arch. Toxicol.* 91 (2017) 2967–3010, <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1993-y>.
- [4] Y. Guichard, M.A. Maire, S. Sebillaud, C. Fontana, C. Langlais, J.C. Micillino, C. Darne, J. Roszak, M. Stepnik, V. Fessard, S. Binet, L. Gate, Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 2: intratracheal instillation and intravenous injection, *Environ. Mol. Mutagen.* 56 (2015) 228–244, <https://doi.org/10.1002/em.21928>.
- [5] IARC, Silica, some silicates, coal dust and para-Aramid fibrils, IARC (Int. Agency Res. Cancer) Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 68 (1997) 1–506.
- [6] F. Pott, M. Roller, Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats, *Eur. J. Oncol.* 10 (2005) 249–281, <https://doi.org/10.1016/j.etp.2006.06.001>.
- [7] A. Kolling, H. Ernst, S. Rittinghausen, U. Heinrich, Relationship of pulmonary toxicity and carcinogenicity of fine and ultrafine granular dusts in a rat bioassay, *Inhal. Toxicol.* 23 (2011) 544–554, <https://doi.org/10.3109/08958378.2011.594458>.
- [8] C. Fontana, A. Kirsch, C. Seidel, L. Marpeaux, C. Darne, L. Gaté, A. Remy, Y. Guichard, In vitro cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 823 (2017) 22–27, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.002>.
- [9] S. Creton, M.J. Aardema, P.L. Carmichael, J.S. Harvey, F.L. Martin, R.F. Newbold, M.R. O'Donovan, K. Pant, A. Poth, A. Sakai, K. Sasaki, A.D. Scott, L.M. Schechtman, R.R. Shen, N. Tanaka, H. Yasaei, Cell transformation assays for prediction of carcinogenic potential: state of the science and future research needs, *Mutagenesis* 27 (2012) 93–101, <https://doi.org/10.1093/mutage/ger053>.
- [10] C. Lasne, A. Gentil, I. Chouroulinkov, Two-stage malignant transformation of rat fibroblasts in tissue culture, *Nature* 247 (1974) 490–491, <https://doi.org/10.1038/247490a0>.
- [11] K. Ohmori, M. Umeda, N. Tanaka, H. Takagi, I. Yoshimura, K. Sasaki, S. Asada, A. Sakai, H. Araki, M. Asakura, H. Baba, Y. Fushiaki, S. Hamada, N. Kitou, T. Nakamura, Y. Nakamura, H. Oishi, S. Sasaki, S. Shimada, T. Tsuchiya, Y. Uno, M. Washizuka, S. Yajima, Y. Yamamoto, E. Yamamura, T. Yatsushiro, An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, *Alternatives to Lab Animals* 33 (2005) 619–639, <https://doi.org/10.3390/cancers10090282>.
- [12] K. Sasaki, H. Mizusawa, M. Ishidate, Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, *Jpn. J. Cancer Res.* 79 (1988) 921–930, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1988.tb00056.x>.
- [13] H. Maeshima, K. Ohno, S. Nakano, T. Yamada, Validation of an in vitro screening test for predicting the tumor promoting potential of chemicals based on gene expression, *Toxicol. In Vitro* 24 (2010) 995–1001, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.013>.
- [14] H. Maeshima, K. Ohno, Y. Tanaka-Azuma, S. Nakano, T. Yamada, Identification of tumor promotion marker genes for predicting tumor promoting potential of chemicals in BALB/c 3T3 cells, *Toxicol. In Vitro* 23 (2009) 148–157, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.10.005>.
- [15] A. Sakai, K. Sasaki, D. Muramatsu, S. Arai, N. Endou, S. Kuroda, K. Hayashi, Y.M. Lim, S. Yamazaki, M. Umeda, N. Tanaka, A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 702 (2010) 100–122, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.07.007>.
- [16] OECD, Guidance Document on the in Vitro Bhas 42 Cell Transformation Assay Series on Testing & Assessment No. 231, ENV/JM/MONO(2016)1, OECD Publishing, Paris, 2016.
- [17] L.A. Loeb, C.C. Harris, Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective, *Cancer Res.* 68 (2008) 6863–6872, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2852>.
- [18] S.J. Sturla, A.R. Boobis, R.E. FitzGerald, J. Hoeng, R.J. Kavlock, K. Schirmer, M. Whelan, M.F. Wilks, M.C. Peitsch, Systems toxicology: from basic research to risk assessment, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 314–329, <https://doi.org/10.1021/tx400410s>.
- [19] Z. Elias, O. Poirot, M.C. Daniere, F. Terzetti, A.M. Marande, S. Dzwigaj, H. Pezerat, I. Fenoglio, B. Fubini, Cytotoxic and transforming effects of silica particles with

- different surface properties in Syrian hamster embryo (SHE) cells, *Toxicol. In Vitro* 14 (2000) 409–422, [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(00\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(00)00039-4).
- [20] D. Lindgren, F. Liedberg, A. Andersson, G. Chebil, S. Gudjonsson, Å. Borg, W. Månsson, T. Fioretos, M. Höglund, Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q, *Oncogene* 25 (2006) 2685–2696, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209249>.
- [21] M. Vecchi, P. Nuciforo, S. Romagnoli, S. Confalonieri, C. Pellegrini, G. Serio, M. Quarto, M. Capra, G.C. Roviaro, E. Contessini Avesani, C. Corsi, G. Coggi, P.P. Di Fiore, S. Bosari, Gene expression analysis of early and advanced gastric cancers, *Oncogene* 26 (2007) 4284–4294, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210208>.
- [22] A. Lingel, T.M. Weiss, M. Niebuhr, B. Pan, B.A. Appleton, C. Wiesmann, J.F. Bazan, W.J. Fairbrother, Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors—insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes, *Structure* 17 (2009) 1398–1410, <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.009>.
- [23] J.-W. Wang, Y.-N. Jiang, C.-Y. Huang, P.-Y. Huang, M.-C. Huang, W.T.-K. Cheng, C.-K.J. Shen, Y.-T. Ju, Proliferin enhances microvilli formation and cell growth of neuroblastoma cells, *Neurosci. Res.* 56 (2006) 80–90, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.05.011>.
- [24] J.T. Fassett, M. Nilsen-Hamilton, Mrp3, a mitogen-regulated protein/proliferin gene expressed in wound healing and in hair follicles*, *Endocrinology* 142 (2001) 2129–2137, <https://doi.org/10.1210/endo.142.5.8132>.
- [25] M.-O. Riener, F.R. Fritzsche, C. Soll, B.C. Pestalozzi, N. Probst-Hensch, P.-A. Clavien, W. Jochum, A. Soltermann, H. Moch, G. Kristiansen, Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas, *Histopathology* 56 (2010) 600–606, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03527.x>.
- [26] E.M. Warren, H. Huang, E. Fanning, W.J. Chazin, B.F. Eichman, Physical interactions between Mcm10, DNA, and DNA polymerase α , *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 24662–24672, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.020438>.
- [27] J.C. Higareda-Almaraz, J.S. Ruiz-Moreno, J. Klimentova, D. Barbieri, R. Salvador-Gallego, R. Ly, I.A. Valtierra-Gutiérrez, C. Dinsart, G.A. Rabinovich, J. Stulik, F. Rösl, B. Rincon-Orozco, Systems-level effects of ectopic galectin-7 reconstitution in cervical cancer and its microenvironment, *BMC Canc.* 16 (2016) 680, <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2700-8>.
- [28] C. Seidel, A. Kirsch, C. Fontana, A. Visvikis, A. Remy, L. Gaté, C. Darne, Y. Guichard, Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation, *Nanotoxicology* 11 (2017) 923–935, <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1382599>.
- [29] C.L.J. Parfett, T. Marquardt, R. Pilon, Promotion of morphological transformation by di-n-butyltin dichloride in C3H/10T1/2 cells: prediction by prior expression of tumour promoter-responsive genes, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 339–349, [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00157-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00157-X).
- [30] C.L.J. Parfett, R. Pilon, A.A. Caldeira, Asbestos promotes morphological transformation and elevates expression of a gene family invariably induced by tumor promoters in C3H/10T1/2 cells, *Carcinogenesis* 17 (1996) 2719–2726, <https://doi.org/10.1093/carcin/17.12.2719>.
- [31] A. Rohrbeck, G. Salinas-Riester, K. Maaser, J. Linge, S. Salovaara, R. Corvi, J. Brolak, Toxicogenomics applied to in vitro carcinogenicity testing with Balb/c 3T3 cells revealed a gene signature predictive of chemical carcinogens, *Toxicol. Sci.* 118 (2010) 31–41, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq246>.
- [32] C.L. Parfett, D. Desaulniers, A Tox 21 approach to altered epigenetic landscapes: assessing epigenetic toxicity pathways leading to altered gene expression and oncogenic transformation in vitro, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1179, <https://doi.org/10.3390/ijms18061179>.
- [33] S.-H. Hwang, H. Yeom, S.Y. Eom, Y.-M. Lee, M. Lee, Genome-wide DNA methylation changes in transformed foci induced by nongenotoxic carcinogens, *Environ. Mol. Mutagen.* 0 (2019), <https://doi.org/10.1002/em.22285>.
- [34] P.M. Peeters, T.N. Perkins, E.F.M. Wouters, B.T. Mossman, N.L. Reynaert, Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells, *Part. Fibre Toxicol.* 10 (2013) 3, <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-3>.
- [35] T.N. Perkins, P.M. Peeters, A. Shukla, I. Arijs, J. Dragon, E.F.M. Wouters, N.L. Reynaert, B.T. Mossman, Indications for distinct pathogenic mechanisms of asbestos and silica through gene expression profiling of the response of lung epithelial cells, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) 1374–1389, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu551>.
- [36] C. Pisani, J.-C. Gaillard, V. Nouvel, M. Odorico, J. Armengaud, O. Prat, 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 (2015) 315, <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1521-5>.
- [37] N. Decan, D. Wu, A. Williams, S. Bernatchez, M. Johnston, M. Hill, S. Halappanavar, Characterization of in vitro genotoxic, cytotoxic and transcriptomic responses following exposures to amorphous silica of different sizes, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 796 (2016) 8–22, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.011>.
- [38] N.Q. Vuong, P. Goegan, F. De Rose, D. Breznan, E.M. Thomson, J.S. O'Brien, S. Karthikeyan, A. Williams, R. Vincent, P. Kumarathasan, Responses of A549 human lung epithelial cells to cristobalite and α -quartz exposures assessed by toxicoproteomics and gene expression analysis, *J. Appl. Toxicol.* 37 (2017) 721–731, <https://doi.org/10.1002/jat.3420>.
- [39] M. Fang, Y. Li, K. Huang, S. Qi, J. Zhang, W. Zgodzinski, M. Majewski, G. Wallner, S. Gozdz, P. Macek, A. Kowalik, M. Pasiarski, E. Grywalska, L. Vatan, N. Nagarsheth, W. Li, L. Zhao, I. Kryczek, G. Wang, Z. Wang, W. Zou, L. Wang, IL33 promotes colon cancer cell stemness via JNK activation and macrophage recruitment, *Cancer Res.* 77 (2017) 2735–2745, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-16-1602>.
- [40] S. Karthikeyan, A. Russo, M. Dean, D.D. Lantvit, M. Endsley, J.E. Burdette, Prolactin signaling drives tumorigenesis in human high grade serous ovarian cancer cells and in a spontaneous fallopian tube derived model, *Cancer Lett.* 433 (2018) 221–231, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.07.003>.
- [41] D. Senfter, E.P. Erkan, E. Özer, G. Jungwirth, S. Madlener, M. Kool, T. Ströbel, N. Saydam, O. Saydam, Overexpression of minichromosome maintenance protein 10 in medulloblastoma and its clinical implications, *Pediatr. Blood Cancer* 64 (2017) e26670, <https://doi.org/10.1002/pbc.26670>.
- [42] W.M. Li, C.N. Huang, H.L. Ke, C.C. Li, Y.C. Wei, H.C. Yeh, L.L. Chang, C.H. Huang, P.I. Liang, B.W. Yeh, T.C. Chan, C.F. Li, W.J. Wu, MCM10 overexpression implicates adverse prognosis in urothelial carcinoma, *Oncotarget* 7 (2016) 77777–77792, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12795>.
- [43] F. Cui, J. Hu, S. Ning, J. Tan, H. Tang, Overexpression of MCM10 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in prostate cancer, *The Prostate* 78 (2018) 1299–1310, <https://doi.org/10.1002/pros.23703>.
- [44] R. Mahadevappa, H. Neves, S.M. Yuen, M. Jameel, Y. Bai, H.-F. Yuen, S.-D. Zhang, Y. Zhu, Y. Lin, H.F. Kwok, DNA replication licensing protein MCM10 promotes tumor progression and is a novel prognostic biomarker and potential therapeutic target in breast cancer, *Cancers* 10 (2018) 282, <https://doi.org/10.3390/cancers10090282>.
- [45] A.S. Lieu, T.S. Cheng, C.H. Chou, C.H. Wu, C.Y. Hsu, C.Y. Huang, L.K. Chang, J.K. Loh, C.S. Chang, C.M. Hsu, S.L. Howng, Y.R. Hong, Functional characterization of AIBp, a novel Aurora-A binding protein in centrosome structure and spindle formation, *Int. J. Oncol.* 37 (2010) 429–436, <https://doi.org/10.3892/ijo.00000691>.
- [46] S. Ueda, I. Kuwabara, F.T. Liu, Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer, *Cancer Res.* 64 (2004) 5672–5676, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0985>.
- [47] S.J. Kim, J.A. Hwang, J.Y. Ro, Y.S. Lee, K.H. Chun, Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer, *Oncotarget* 4 (2013) 1461–1471, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1219>.
- [48] K. Biron-Pain, A.-A. Grosset, F. Poirier, L. Gaboury, Y. St-Pierre, Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas, *PLoS One* 8 (2013) e63307, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063307>.
- [49] C.J. Kim, N. Yoshioka, Y. Tambe, R. Kushima, Y. Okada, H. Inoue, Periostin is down-regulated in high grade human bladder cancers and suppresses in vitro cell invasiveness and in vivo metastasis of cancer cells, *Int. J. Cancer* 117 (2005) 51–58, <https://doi.org/10.1002/ijc.21120>.
- [50] P. Li, J. Qian, G. Yu, Y. Chen, K. Liu, J. Li, J. Wang, Down-regulated SPARCL1 is associated with clinical significance in human gastric cancer, *J. Surg. Oncol.* 105 (2012) 31–37, <https://doi.org/10.1002/jso.22025>.
- [51] F. Cao, K. Wang, R. Zhu, Y.W. Hu, W.Z. Fang, H.Z. Ding, Clinicopathological significance of reduced SPARCL1 expression in human breast cancer, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 14 (2013) 195–200, <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.1.195>.
- [52] P.J. Hurley, L. Marchionni, B.W. Simons, A.E. Ross, S.B. Peskoe, R.M. Miller, N. Erho, I.A. Vergara, M. Ghadessi, Z. Huang, B. Gurel, B.H. Park, E. Davicioni, R.B. Jenkins, E.A. Platz, D.M. Berman, E.M. Schaeffer, Secreted protein, acidic and rich in cysteine-like 1 (SPARCL1) is down regulated in aggressive prostate cancers and is prognostic for poor clinical outcome, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 14977–14982, <https://doi.org/10.1073/pnas.1203525109>.
- [53] P. Lévy, D. Vidaud, K. Leroy, I. Laurendeau, J. Wechsler, G. Bolasco, B. Parfait, P. Wolkstein, M. Vidaud, I. Bièche, Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR, *Mol. Cancer* 3 (2004) 20, <https://doi.org/10.1186/1476-4598-3-20>.
- [54] B. Kigel, A. Varshavsky, O. Kessler, G. Neufeld, Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells, *PLoS One* 3 (2008) e3287, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003287>.
- [55] X. Zhou, L. Ma, J. Li, J. Gu, Q. Shi, R. Yu, Effects of SEMA3G on migration and invasion of glioma cells, *Oncol. Rep.* 28 (2012) 269–275, <https://doi.org/10.3892/or.2012.1796>.
- [56] M. Durtet, L. Grataudou, E. Dardenne, S. Germann, S. Samaan, R. Lidereau, K. Driouch, P. de la Grange, D. Auboeuf, Estrogen regulation and physiopathologic significance of alternative promoters in breast cancer, *Cancer Res.* 70 (2010) 3760–3770, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-09-3988>.
- [57] I. Kuwabara, Y. Kuwabara, R.Y. Yang, M. Schuler, D.R. Green, B.L. Zuraw, D.K. Hsu, F.T. Liu, Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome cRelease, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3487–3497, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109360200>.
- [58] P.J. Neame*, C.J. Kay, D.J. McQuillan, M.P. Beales, J.R. Hassell, Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57 (2000) 859–863, <https://doi.org/10.1007/s000180050048>.
- [59] S. Chattopadhyay, A.-K. Bielinsky, Human Mcm10 regulates the catalytic subunit of DNA polymerase- α and prevents DNA damage during replication, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 4085–4095, <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-12-1148>.
- [60] L. Gillan, D. Matei, D.A. Fishman, C.S. Gerbin, B.Y. Karlan, D.D. Chang, Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrins and promotes cell motility, *Cancer Res.* 62 (2002) 5358–5364.
- [61] X. Liu, S. Li, F. Yi, Trop 2 gene: a novel target for cervical cancer treatment, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140 (2014) 1331–1341, <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1696-1>.
- [62] M.M. Sullivan, T.H. Barker, S.E. Funk, A. Karchin, N.S. Seo, M. Höök, J. Sanders, B. Starcher, T.N. Wight, P. Puolakkainen, E.H. Sage, Matricellular hevin regulates decorin production and collagen assembly, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 27621–27632, <https://doi.org/10.1074/jbc.M510507200>.
- [63] L. Huang, Y. Xu, G. Cai, Z. Guan, S. Cai, Downregulation of S100A4 expression by RNA interference suppresses cell growth and invasion in human colorectal cancer cells, *Oncol. Rep.* 27 (2012) 917–922, <https://doi.org/10.3892/or.2011.1598>.

Supplementary Table A.1: Physical characteristics of SAS particle

Silica	Origin	Main phase	Primary particle size ^a	Impurities (wt%) ^b	BET SSA (m ² /g) ^c	Z-average in water (nm)	Polydispersity index
NM-200	precipitated	amorphous	18.3 ± 4.5 nm	Al (0.87); Na (0.88); S (0.46)	189	ND ^e	ND
NM-201	precipitated	amorphous	18.0 ± 1.0 nm	Al (0.74); Na (0.44); S (0.46)	140	252.9 ± 11.3	0.583 ± 0.019
NM-202	pyrogenic	amorphous	17.7 ± 2.5 nm	Al (0.45); Ca (0.18)	204	232.8 ± 7.3	0.441 ± 0.012
NM-203	pyrogenic	amorphous	24.7 ± 17.7 nm	Al (0.43); S (0.04)	204	318.7 ± 4.9	0.423 ± 0.026
Min-U-Sil 5 [®]	natural	crystalline	1.33 ± 0.85 μm	Al (0.16); Fe (0.05); Ca (0.04); Mg (0.01)	5	1385.7 ± 377.0	0.318 ± 0.130
DE	natural	amorphous	1.35 ± 1.48 μm	Al (1.4); Fe (1.3); Ca (2.2); Ti (0.3); Mg (0.2)	20	ND	ND

^a, primary size was determined by transmission electron microscopy.

^b, impurities were determined by energy dispersive spectrometry for SAS and by inductively coupled plasma spectrometry for Min-U-Sil 5[®] and DE.

^c, the BET (Brunauer-Emmet-Teller) specific surface area (SSA) was determined by nitrogen adsorption.

^d, dynamic light scattering (DLS) was performed using a Nanozetasizer (Malvern). Samples were dispersed in water as described in the Materials and Methods section. Values represent the mean ± standard deviation of three DLS analyses.

^e, not determined, data obtained by DLS analysis did not meet the quality criteria.

Supplementary Table A.2: References and nucleotide sequences of primers

Gene	Nucleotide sequences or ID	Accession number
<i>ACTB</i>	Forward : GGCCAACCGTGAAAAGATGA Reverse : TACGACCAGAGGCATACAGG	NM_007393.5
<i>TUBA</i>	Forward : CACTACACCATTGGCAAGGA Reverse: GCTGTGGAAAACCAAGAAGC	NM_011653.2
<i>GAPDH</i>	Forward : CTGCACCACCAACTGCTTAG Reverse: GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	NM_001289726.1
<i>IL1RL1 Isoform B</i>	Forward: TGTGTCTCTGCCTGAAGTGG Reverse: CTGGCCACCTAGGAATCAA	NM_010743.3
<i>PRL2C1</i>	Forward : CTGCCACTCTTGCAATCTGA Reverse : AACGCACTTCAGGACGTTG	NM_001361045.1
<i>PRL2C3</i>	Forward : GGCTTCCAACCTCCAGTAAAG Reverse : CAGTATCCGGGAGCATGGTT	NM_011118.2
<i>PRL2C5</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Prl2c5, Mouse qMmuCID0041010	MGI:1858413
<i>LGALS7</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Lgals7, Mouse qMmuCED0040994	MGI:1316742
<i>POSTN</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Postn, Mouse qMmuCID0026147	MGI:1926321
<i>TIMP4</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Timp4, Mouse Tissue inhibitor of metalloproteinase 4 qMmuCID0027280	MGI:109125
<i>LUM</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Lum, Mouse qMmuCID0018636	MGI:109347
<i>SPARCL1</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Sparcl1, Mouse qMmuCID0013589	MGI:108110
<i>MCM10</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Mcm10, Mouse qMmuCED0039695	MGI:1917274
<i>SEMA3G</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Sema3g, Mouse qMmuCID0024300	MGI:3041242
<i>AUNIP</i>	PrimePCR™ SYBR® Green Assay: 2610002D18Rik, Mouse qMmuCID0019311	MGI:1917135

Supplementary Table A.3: Cell viability after Bhas42 cell exposure to SAS.

Treatment	Cell viability (%)
Control (H ₂ O)	100.0 ± 1.4
SAS NM- 200	
10 µg/cm ²	105.2 ± 1.9
20 µg/cm ²	101.9 ± 14.1
40 µg/cm ²	80.8 ± 4.0*
SAS NM-201	
10 µg/cm ²	88.8 ± 2.0
20 µg/cm ²	93.0 ± 18.4
40 µg/cm ²	84.0 ± 6.1
SAS NM-202	
10 µg/cm ²	71.6 ± 6.8**
20 µg/cm ²	80.9 ± 5.1
40 µg/cm ²	53.7 ± 8.5***
Control (H ₂ O)	100.0 ± 1.2
SAS NM-203	
1 µg/cm ²	103.4 ± 5.8
2 µg/cm ²	96.5 ± 5.4
5 µg/cm ²	85.4 ± 3.6**
10 µg/cm ²	67.1 ± 3.1***
Min-U-Sil 5 [®]	
5 µg/cm ²	101.9 ± 6.9
10 µg/cm ²	100.3 ± 6.8
20 µg/cm ²	81.9 ± 1.7**
40 µg/cm ²	81.7 ± 4.0**
Diatomaceous earth	
1 µg/cm ²	98.5 ± 1.9
2 µg/cm ²	93.3 ± 3.0*
5 µg/cm ²	82.1 ± 2.5***
10 µg/cm ²	78.2 ± 0.4***
Control (DMSO)	100.0 ± 2.0
TPA (0.05 µg/mL)	115.8 ± 16.8

Results are expressed as the mean ± SD (n= 3) with respect to control cells treated with H₂O as the vehicle for SAS, DE or Min-U-Sil 5[®], and with DMSO as the vehicle for TPA. A logarithmic transformation was applied to the data. For multiple comparisons, the significance was evaluated by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparisons test. * indicates p < 0.05, ** indicates p < 0.005, *** indicates p < 0.005 versus control. An unpaired t-test was used for two by two comparison (TPA vs. control (DMSO)).

Supplementary Table A.4 (Excel table): List of significantly regulated genes after increasing concentrations (1, 2 and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of NM-203. A one-way ANOVA, followed by a Tukey post-hoc test was performed with $p < 0.005$, $\text{FC} > 4$. FC: Fold Change.

Supplementary Table A.5 (Excel table): List of the first 50 signatures up-regulated from the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Supplementary Table A.6 (Excel table): List of significantly regulated genes after NM-203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treatment (unpaired T-test with $p < 0.05$, $\text{FC} > 2$). FC: Fold Change.

Supplementary Table A.7 (Excel table): List of significantly regulated genes after Min-U-Sil 5[®] (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treatment (unpaired T-test with $p < 0.05$, $\text{FC} > 2$). FC: Fold Change.

Supplementary Table A.8 (Excel table): List of significantly regulated genes after TPA (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment (unpaired T-test with $p < 0.05$, $\text{FC} > 2$). FC: Fold Change.

Supplementary Table A.9 (Excel table): List of significantly regulated genes after NM-203 (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treatment (unpaired T-test with $p < 0.05$, $\text{FC} > 2$). FC: Fold Change.

Supplementary Table A.10 (Excel table): List of significantly regulated genes after NM-203 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treatment (unpaired T-test with $p < 0.005$, $\text{FC} > 4$). FC: Fold Change.

Supplementary Table A.11 (Excel table): List of significantly regulated genes after Min-U-Sil 5[®] (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treatment (unpaired T-test with $p < 0.005$, $\text{FC} > 4$). FC: Fold Change.

Supplementary Table A.12 (Excel table): List of significantly regulated genes after TPA (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment (unpaired T-test with $p < 0.005$, $\text{FC} > 4$). FC: Fold Change.

Supplementary Table A.13 (Excel table): List of significantly regulated genes after NM-203 (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treatment (unpaired T-test with $p < 0.005$, $\text{FC} > 4$). FC: Fold Change.

Supplementary Table A.14: Number of genes significantly deregulated in treated cells with respect to untreated cells.

Number of differentially expressed genes

	p < 0.05	p < 0.005			
	FC > 2	FC > 4			
	Gene	Gene	Up	Down	Common signaling pathways
	number	number	regulated	regulated	
Ctrl vs. DE (5 µg/cm²)	0	0			
Ctrl vs. NM-203 (1 µg/cm²)	0	0			-Cell Cycle Control of Chromosomal Replication
Ctrl vs. NM-203 (2 µg/cm²)	512	2	0	2	- Cell Cycle: G2/M DNA Damage
Ctrl vs. NM-203 (5 µg/cm²)	1620	257	160	97	Checkpoint Regulation
Ctrl vs. Min-U-Sil 5[®] (20 µg/cm²)	1080	99	43	56	- Role of CHK Proteins in Cell Cycle
DMSO vs. TPA (0.05 µg/ml)	392	89	76	13	Checkpoint Control

Number of genes significantly deregulated between two conditions ($p < 0.05$, $FC > 2$ or $p < 0.005$, $FC > 4$). The top common canonical pathways are highlighted by IPA. Ctrl: H₂O; TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; DE: Diatomaceous earth; DMSO: Dimethyl sulfoxide; FC: Fold Change.

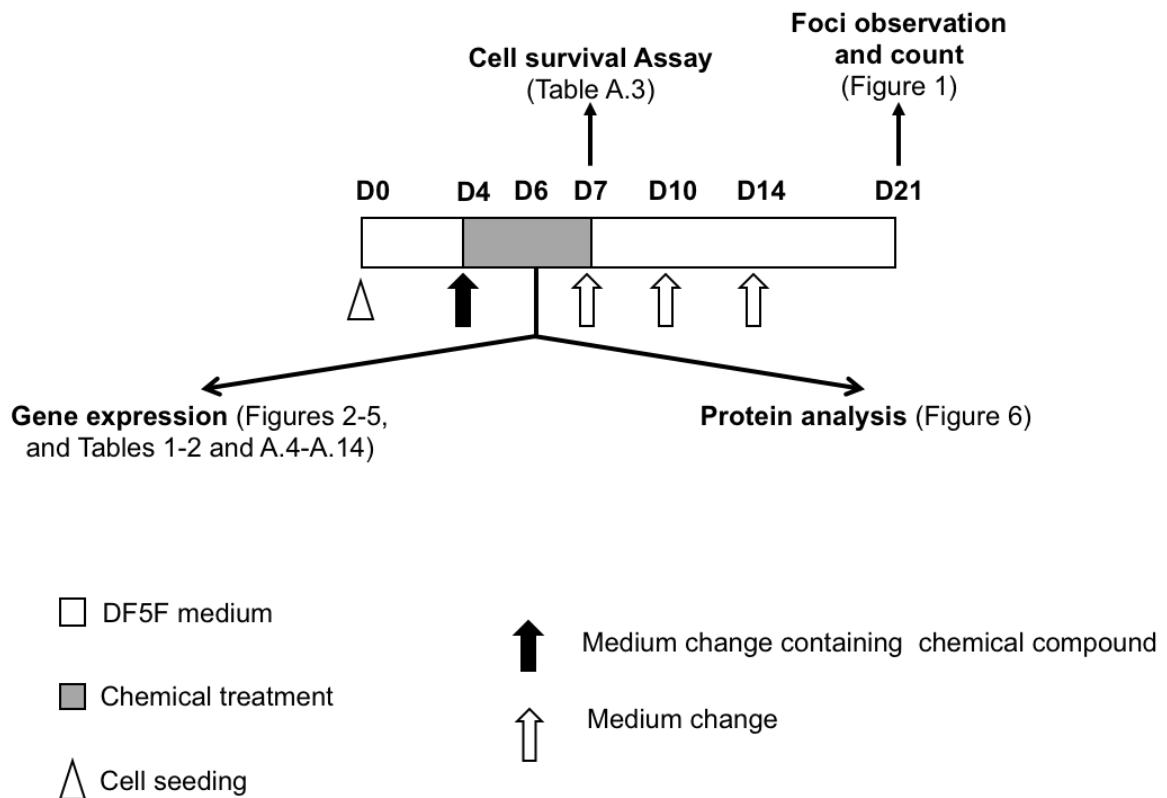


Figure A.1: Study design

Bhas 42 cells were seeded on Day 0 (D0) and treated with compound once on Day 4 (D4). Gene expression analysis and protein analysis were carried out after a 48h-treatment with the most active SAS NM-203 (1, 2 and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), Min-U-Sil 5[®] (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), DE (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and the tumor promoter TPA (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cytotoxic effects were assessed by a cell survival assay performed on day 7 (D7). On day 21 (D21), cells were fixed with ethanol and stained with Giemsa solution, and transformed foci were analyzed and counted under a binocular microscope. (Abbreviation: DF5F, Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 supplemented with 1 % (v/v) antibiotic and 5 % (v/v) fetal calf serum).

Résumé :

Les nanoparticules de silice amorphe synthétique (SAS) sont utilisées dans de nombreuses applications industrielles. De par leur structure amorphe, les SAS ne sont pas considérées comme cancérogènes chez l'Homme, contrairement aux silices de structures cristallines. Pourtant, des études *in vivo* et *in vitro* ont proposé que certaines SAS pourraient potentiellement être cancérogènes. Le test de transformation des cellules Bhas 42 a été développé afin d'évaluer les effets transformant des agents chimiques, en discriminant les agents initiateurs des agents promoteurs de tumeurs. Une étude menée à l'INRS a mis en évidence la capacité des SAS précipitées NM-200 et NM-201 et des SAS pyrogénées NM-202 et NM-203 à induire la transformation cellulaire en condition de promotion. Afin d'étudier les effets moléculaires induits par les SAS qui conduisent à la transformation des cellules Bhas 42, nous avons effectué une analyse transcriptomique non supervisée, après exposition des cellules Bhas 42 à la SAS NM-203, et à des agents chimiques de référence, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] utilisée comme témoin positif particulaire, la terre à diatomée (DE), une microparticule de silice amorphe utilisée comme témoin négatif particulaire et le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), un agent promoteur de tumeur. Les résultats montrent un lien entre la transformation des cellules Bhas 42 induite par la SAS pyrogénée NM-203, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA et la modification de l'expression de gènes et de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'adhésion cellulaire, la réparation de l'ADN et l'inflammation. De plus, nous avons identifié une signature commune de 21 gènes impliqués dans les stades précoces de la transformation cellulaire induite par les trois agents chimiques. Les gènes composant la signature commune sont impliqués dans la prolifération et l'adhésion cellulaires. Parmi eux, 12 gènes ont été sélectionnés en fonction de leur niveau d'expression (surexprimés ou sous-exprimés) 48 heures après le traitement avec les agents chimiques. Les essais de RT-qPCR et de Western blot confirment les données d'analyse transcriptomique. Des altérations géniques similaires ont également été obtenues lorsque des cellules Bhas 42 sont traitées avec les SAS précipitées NM-200 et pyrogénées NM-202.

En conclusion, ce travail met en évidence un lien entre la formation de foyers de transformation induits par le traitement des cellules Bhas 42 avec les SAS, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA et des modifications des profils d'expression de gènes et de voies de signalisation. La mise en évidence de la signature des 12 gènes représente une liste de "bio-marqueurs" potentiels et communs de la transformation cellulaire induite par les SAS, la silice cristalline Min-U-Sil 5[®] et le TPA. La mesure du niveau d'expression de ce set de gènes par RT-qPCR dans les cellules Bhas 42 pourrait être proposé comme test *in vitro* prédictif du potentiel transformant des SAS, mais également d'autres nanomatériaux et agents chimiques en général.

Mots clés : Nanomatériaux, transformation cellulaire, transcriptomique, Bhas 42, silice.

Abstract:

Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS) are used in many industrial applications. Due to their amorphous structure, SAS are not considered carcinogenic in humans, unlike silica with crystalline structures. However, *in vivo* and *in vitro* studies have proposed that certain SAS could potentially be carcinogenic. The Bhas 42 cell transformation test was developed to assess the transforming effects of chemical agents, by discriminating between initiating agents and tumor promoters. A study carried out at the INRS highlighted the capacity of the precipitated SAS NM-200 and NM-201 and the pyrogenic SAS NM-202 and NM-203 to induce cell transformation under promotion conditions. In order to study the molecular effects induced by SAS which lead to the transformation of Bhas 42 cells, we performed an unsupervised transcriptomic analysis, after exposure of Bhas 42 cells to SAS NM-203, and to reference chemical agents, crystalline silica Min-U-Sil 5[®] used as a positive particulate control, diatomaceous earth (DE), an amorphous silica microparticle used as a negative particulate control and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), a tumor promoter. The results show a link between the transformation of Bhas 42 cells induced by pyrogenic SAS NM-203, crystalline silica Min-U-Sil 5[®] and TPA and the modification of the expression of genes and signaling pathways involved in proliferation, cell adhesion, DNA repair and inflammation. In addition, we have identified a common signature of 21 genes involved in the early stages of cell transformation induced by the three chemical agents. The genes composing the common signature are involved in cell proliferation and adhesion. Among them, 12 genes were selected according to their expression level (over-expressed or under-expressed) 48 hours after treatment with chemical agents. RT-qPCR and Western blot tests confirm the transcriptomic analysis data. Similar gene alterations have also been obtained when Bhas 42 cells are treated with NM-200 precipitated SAS and NM-202 pyrogenic.

In conclusion, this work highlights a link between the formation of transformation foci induced by the treatment of Bhas 42 cells with SAS, crystalline silica Min-U-Sil 5[®] and TPA and changes in expression profiles of genes and signaling pathways. The signature of the 12 genes represents a list of potential and common "biomarkers" of cell transformation induced by SAS, crystalline silica Min-U-Sil 5[®] and TPA. Measuring the level of expression of this set of genes by RT-qPCR in Bhas 42 cells could be proposed as an *in vitro* test predictive of the transforming potential of SAS, but also of other nanomaterials and chemical agents in general.

Key words : Nanomaterials, cell transformation, transcriptomic, Bhas 42, silica.