



**HAL**  
open science

# Influence de paramètres physiques de nanotubes de carbone multi-parois sur leurs propriétés toxicologiques dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques : rapprochement avec les effets pulmonaires chez le rat

Hélène Barthel

## ► To cite this version:

Hélène Barthel. Influence de paramètres physiques de nanotubes de carbone multi-parois sur leurs propriétés toxicologiques dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques : rapprochement avec les effets pulmonaires chez le rat. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0045 . tel-03796160

**HAL Id: tel-03796160**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03796160>**

Submitted on 4 Oct 2022

**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.



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## 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 bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## 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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

# École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

## Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE**

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

**par Hélène BARTHEL**

**Influence de paramètres physiques de nanotubes de carbone multi-parois sur leurs propriétés toxicologiques dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques. Rapprochement avec les effets pulmonaires chez le rat.**

Soutenue publiquement le 24 mars 2022

### Membres du jury

#### Rapporteurs :

Mme. Armelle BAEZA-SQUIBAN	Professeur, Université Paris-Diderot, Paris
Mr. Jérémie POURCHEZ	Professeur, MINES, Saint-Etienne

#### Examineurs :

Mme. Ghislaine LACROIX	Docteur, INERIS, Paris
Mr. Thierry OSTER	Professeur, Université de Lorraine, Metz
Mr. Athanase VISVIKIS	Professeur, Université de Lorraine, Nancy Directeur de Thèse
Mme. Carole SEIDEL	Docteur, INRS, Vandœuvre-lès-Nancy Co-Directrice de Thèse

#### Membres invités :

Mme. Stéphanie GRANDEMANGE	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
Mr. Håkan WALLIN	Professeur, NIOH, Copenhague

---

**UMR CNRS-UL 7365, Laboratoire Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), 9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy**

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



# Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui m'ont apportée leur aide et qui ont contribué à l'aboutissement de ces travaux.

Je tiens tout d'abord à remercier mes co-directeurs de thèse, le Pr. Athanase Visvikis et le Dr. Carole Seidel sans lesquels ces travaux de recherche n'auraient vu le jour. Je les remercie vivement pour la richesse de leur enseignement et leur investissement au quotidien. Leur bienveillance, leur soutien et leurs conseils éclairés m'ont permis d'apprendre à leur côté et d'évoluer, tant sur le plan professionnel que personnel. Je ne les remercierai jamais assez d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir appris à le faire moi-même. Pour ces raisons, je leur exprime mon admiration et ma reconnaissance la plus sincère.

Je tiens à remercier le Pr. Armelle Baeza-Squiban de l'Université de Paris et le Pr. Jérémie Pourchez de l'Ecole des Mines de Saint Etienne pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail de recherche et membres du jury.

J'associe à ces remerciements les autres membres du jury, le Dr. Ghislaine Lacroix de l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques de Paris et le Pr. Thierry Oster de l'Université de Lorraine qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être examinateurs de ce travail.

Je tiens à remercier vivement le Pr. Stéphanie Grandemange de l'Université de Lorraine et le Pr. Hakan Wallin de l'Institut National de la Santé au Travail de Norvège pour leur disponibilité ainsi que leurs conseils avisés lors des comités de suivi de thèse. Je les remercie de m'avoir partagé leur expertise et aiguillée dans mes travaux de recherche.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr. Pierre Campo, Chef du Département Toxicologie et Biométrie de l'Institut National de Santé et Sécurité pour m'avoir accueillie et permis de réaliser ces travaux au sein du département. Plus particulièrement, j'adresse mes remerciements au Dr. Laurent Gaté, Responsable du Laboratoire C.M.R. pour nos discussions enrichissantes, son aide et tous les moyens qu'il a mis en œuvre pour que je puisse réaliser ma thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie également le Dr. Bruno Charpentier, Responsable de l'Équipe 1 : RNA, RNP, Structure Fonction du Laboratoire IMoPA, pour avoir accepté de faire de son équipe mon laboratoire d'accueil.



Je tenais à remercier l'INRS, le Département TB et plus particulièrement les équipes des laboratoires CMR, TIPC et ASBA pour leur accueil chaleureux, les sourires au quotidien et leur soutien à tous les instants. Le plus long des discours ne suffirait pas à vous décrire toute ma gratitude et tout ce que vous m'avez apportée. C'est à travers un regard, un sourire, une blague, une main tendue, un bon café (ou un bon gâteau), un coup de téléphone, un petit mot, des petits coups de pouces au quotidien, que vous m'avez appris l'esprit de partage et l'esprit d'équipe. Merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse et votre bienveillance. J'ai pleins d'anecdotes en tête avec chacun d'entre vous, et j'espère qu'en lisant ce paragraphe, au moins une d'entre elles vous viendra à l'esprit. J'ai conscience d'avoir eu beaucoup de chance d'apprendre à connaître chacun d'entre vous pendant ces trois années. Merci d'avoir fait de cette thèse, au-delà d'une expérience professionnelle, une expérience humaine avant tout.

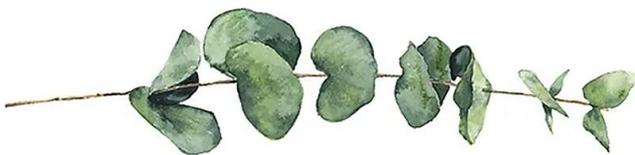
Je souhaite remercier sincèrement le Dr. Christian Darne pour ses précieux conseils, le partage de ses connaissances et l'intérêt qu'il a porté à mes travaux. Je remercie également le Dr. Frédéric Cosnier pour son aide et le partage de son expertise. Je remercie Mme. Sylvie Sebillaud pour avoir pris le temps de relire ce manuscrit avec attention et pour le temps qu'elle y a consacré.

Je remercie Mr. Olivier Rastoix et le Dr. Dominique Dumas pour m'avoir transmis leur passion pour l'infiniment petit.

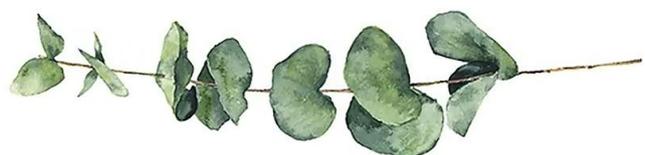
Je remercie chaleureusement tous ceux qui m'ont soutenue bien avant le début de cette thèse, et qui continuent de le faire aujourd'hui. Je pense à mes collègues de l'Institut de Cancérologie de Lorraine et ceux du Laboratoire IMoPA, ils se reconnaîtront.

Je remercie la personne qui partage ma vie au quotidien d'être d'un soutien sans faille et de me donner toute la force et l'énergie nécessaire à mon épanouissement professionnel. J'espère qu'elle lira ces travaux avec fierté.

Je termine par une profonde pensée à mes parents, ma famille et mes amis, à toutes les personnes rencontrées avant et pendant ce parcours, qui ont cru en moi et qui m'ont apporté, de près ou de loin, ce petit quelque chose qui veut dire beaucoup.



## Un Grand Merci





# Table des matières

Liste des abréviations .....	1
Liste des illustrations .....	3
Liste des tableaux .....	5
Liste des annexes .....	5
<b>I. Introduction</b> .....	<b>6</b>
1. Les Nanotubes de carbone, généralités et voies d'entrée .....	7
1.1. Définition .....	7
1.2. Voies de synthèse et contaminants métalliques .....	8
1.3. Applications en milieu industriel .....	9
1.4. Les nanotubes de carbone en chiffres .....	10
1.5. Règlementation et mesures de prévention .....	11
1.6. Voies d'exposition .....	13
1.7. Anatomie de l'appareil respiratoire chez l'Homme et chez le rat.....	14
1.8. Modèle de dépôt dans les voies respiratoires .....	16
1.9. Mécanismes d'élimination des nanotubes de carbone .....	18
2. Inflammation et génotoxicité induite par les nanotubes de carbone.....	20
2.1. La réponse inflammatoire aiguë.....	20
2.2. La génotoxicité.....	22
2.3. La biopersistance .....	28
2.4. L'inflammation chronique .....	29
3. La transition épithélio-mésenchymateuse.....	31
3.1. Processus physiologique .....	31
3.2. L'EMT, processus pathologique .....	34
3.2.1. L'EMT et le développement de fibrose pulmonaire.....	34
3.2.2. L'EMT et le développement de cancer.....	36
3.2.2.1. Cancer, généralités .....	36
3.2.2.2. Nanotubes de carbone et cancer.....	41
<b>II. Objectifs</b> .....	<b>43</b>
<b>III. Matériel et Méthodes</b> .....	<b>46</b>
1. Caractérisation et dispersion des nanotubes de carbone .....	47

1.1.	Caractérisation des nanotubes de carbone .....	47
1.2.	Dispersion des nanotubes de carbone .....	48
1.2.1.	Expériences réalisées <i>in vitro</i> .....	48
1.2.2.	Expériences réalisées <i>in vivo</i> .....	51
2.	Expériences menées <i>in vitro</i> .....	51
2.1.	Lignée et culture cellulaire.....	51
2.1.1.	La lignée cellulaire BEAS-2B .....	51
2.1.2.	Maintenance des cellules en culture .....	52
2.1.3.	Congélation et décongélation .....	53
2.2.	Cinétique de traitement des cellules BEAS-2B .....	53
2.3.	Test de prolifération cellulaire et de cytotoxicité.....	56
2.4.	Étude de la composition de la population cellulaire .....	57
2.4.1.	Observations de la morphologie cellulaire par microscopie optique.....	57
2.4.2.	Analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux .....	57
2.5.	Étude de l'atteinte du fuseau mitotique et génotoxicité cellulaire .....	57
2.5.1.	Analyse des fuseaux mitotiques par immunofluorescence .....	57
2.5.2.	Test des micronoyaux .....	58
2.6.	Analyse de l'expression génique par RT-qPCR .....	59
2.6.1.	Extraction des ARN.....	59
2.6.2.	Qualité des ARN.....	59
2.6.3.	Transcription inverse .....	60
2.6.4.	Amplification par PCR en temps réel.....	60
2.7.	Analyses transcriptomiques .....	62
2.7.1.	Hybridation sur puces .....	62
2.7.2.	Analyse des données de transcriptomique.....	66
2.8.	Analyses protéiques .....	67
2.8.1.	Analyse du marqueur épithélial E-cadhérine par cytométrie en flux .....	67
2.8.2.	Extraction des protéines totales .....	67
2.8.3.	Dosage des protéines par la méthode Bradford .....	68
2.8.4.	Western-Blot.....	68
2.9.	Analyses statistiques des données <i>in vitro</i> .....	69
3.	Expériences menées <i>in vivo</i> .....	69
3.1.	Choix du modèle .....	70
3.2.	Éthique animale, réglementation et hébergement .....	71
3.4.	Design expérimental .....	72

3.6.1.	Exposition par instillation intra-trachéale.....	73
3.6.2.	Exposition par gavage .....	74
3.7.	Suivi des animaux et bien-être animal .....	74
3.8.	Protocole d'anesthésie et de mise à mort des animaux.....	75
3.8.1.	Mise à mort.....	75
3.8.2.	Collecte des tissus.....	75
3.9.	Analyses du lavage broncho-alvéolaire .....	79
3.9.1.	Réalisation et traitement du lavage broncho-alvéolaire .....	79
3.9.2.	Cytologie du lavage broncho-alvéolaire.....	79
3.9.3.	Analyses biochimiques du lavage broncho-alvéolaire .....	80
3.10.	Traitement du sang .....	80
3.10.1.	Hématologie.....	80
3.10.2.	Biochimie du plasma.....	81
3.10.3.	Test des micronoyaux .....	81
3.11.	Analyses histologiques .....	82
3.12.	Analyses statistiques des données <i>in vivo</i> .....	82
	<b>IV. Résultats</b> .....	<b>83</b>
1.	Caractérisation des nanotubes de carbone .....	84
2.	Étude de la toxicité des MWCNT <i>in vitro</i> .....	85
2.1.	Effets antiprolifératifs et cytotoxiques.....	85
2.2.	Mitoses anormales et génotoxicité.....	88
2.3.	Altérations morphologiques.....	94
2.4.	Les MWCNT induisent la transition épithélio-mésenchymateuse .....	99
2.5.	Étude de la réversibilité des effets .....	103
2.6.	Analyses transcriptomiques .....	107
2.7.	Effet de la longueur et du diamètre sur l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse .....	113
3.	Étude de la toxicité des MWCNT <i>in vivo</i> .....	115
3.1.	Génotypage des animaux .....	116
3.2.	Transposition de la dose à une exposition réelle chez l'Homme.....	117
3.3.	Distribution des nanotubes de carbone dans les poumons.....	118
3.4.	Suivi des animaux et biométrie.....	120
3.5.	Analyses du lavage broncho-alvéolaire .....	123
3.5.1.	Analyse cytologique .....	123
3.5.2.	Analyses biochimiques .....	125

V. Discussion.....	133
1. Étude de la toxicité des MWCNT dans la lignée BEAS-2B.....	134
1.1. Choix du modèle <i>in vitro</i> et des conditions de traitement avec les MWCNT .....	134
1.2. Effets du traitement des cellules BEAS-2B avec les MWCNT.....	137
2. Étude de la toxicité pulmonaire des MWCNT chez le rat .....	141
2.1. Le choix du modèle d'exposition <i>in vivo</i> et des conditions d'exposition .....	141
2.2. Effets de l'exposition des rats WT et OGM aux MWCNT.....	144
3. Relations entre l'EMT induite <i>in vitro</i> et la toxicité pulmonaire induite <i>in vivo</i> par les MWCNT .....	147
VI. Conclusions et perspectives .....	150
Bibliographie .....	157
Annexes .....	175

# Liste des abréviations

## A

ADN : Acide désoxyribonucléique  
AKT : (PKB) protéine kinase B  
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation  
AO : Acridine orange  
AP-1 : Protéine activatrice 1  
ARN : Acide ribonucléique

## B

BAD : Agoniste associé à la protéine de mort cellulaire BCL2  
BET: Théorie Brunauer, Emmett et Teller  
BID : Agoniste de la mort du domaine d'interaction BH3  
BSA: Albumine de sérum bovin

## C

CCL : C-C motif chimiokine ligand  
CDKN2A : Inhibiteur de kinase cycline-dépendant  
CELMEA : Comité Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale  
CIRC : Centre international de recherche sur le cancer  
CO<sup>2</sup> : Dioxyde de carbone  
Cq : Cycle de quantification  
CVD : Dépôt chimique en phase vapeur  
Cy3 : Cyanine 3  
CXC : C-X-C motif chimiokine ligand

## D

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole  
DDPP : Direction Départementale de la Protection des Populations  
DEG : Gènes différentiellement exprimés  
DLS : Diffusion dynamique de la lumière  
DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNase : Désoxyribonucléase  
dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate  
DTI : Inhibiteur de la trypsine  
DTT : Dithiothréitol

## E

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique  
EGF : Facteur de croissance épidermique  
EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse  
ENU : N-nitroso-N-éthylurée  
ERK : Kinases régulées par signal extracellulaire  
EtOH : Ethanol  
ECHA : Agence Européenne des Produits Chimiques

## F

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes  
FSC : Diffusion avant  
FISH : Hybridation de fluorescence *in situ*

## G

GOT : Glutamate oxyloAcétate transaminase  
GPT : Glutamate pyruvate transaminase  
GSK-3b : Glycogène synthase kinase 3 beta

## H

HARN : Nanoparticules à ratio d'aspect élevé  
HRP : Peroxydase de raifort  
H<sub>2</sub>O: Eau

## I

IL : Interleukine  
INRS : Institut National de Recherche en Santé et Sécurité  
IP : Iodure de propidium  
IRCP : Commission internationale de protection

radiologique

IT : Instillation

## **J**

J : jour

## **L**

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LDH : Lactate déshydrogénase

LOAEL : Dose minimale avec effet nocif observé

LT : Lymphocyte T

## **M**

M : Mois

MAPK : Protéines kinases activées par les mitogènes

MGG : May-Grünwald Giemsa

MMP : Métalloprotéases matricielles

MPPD : Dosimétrie des particules à voies multiples

MWCNT : Nanotubes de carbone à parois multiples

## **N**

NaCl : Chlorure de sodium

NAG : N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase

NF $\kappa$ B : Facteur nucléaire kappa B

NIOSH : Institut national de la sécurité et de la santé au travail

NLRP3 : Famille de récepteurs de type NOD, domaine pyrine contenant 3

NM : Nanomatériau

NOAEL : Dose sans effet indésirable observable

NP : Nanoparticule

NTC : Nanotube de carbone

## **O**

O<sub>2</sub> : Oxygène

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

OGM : Organisme génétiquement modifié

OMS : Organisation mondiale de la Santé

## **P**

PAL : Phosphatase alcaline

Pb : Paire de bases

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PNEC : Cellules neuroendocrines pulmonaires

PPARG : Récepteur gamma activé par proliférateur de peroxyosomes

## **R**

RIN : Numéro d'intégrité de l'ARN

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

## **S**

S : semaine

<sup>s</sup>BET : Surface spécifique

SEM : Erreur standard de la moyenne

SSC : Diffusion latérale

SR : Semaine de récupération

## **T**

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TBS : Sérum physiologique tamponné Tris

TEM : Microscope Electronique à Transmission

TGF $\beta$  : Facteur de croissance transformé beta

TGS : TRIS-glycine-SDS

TLR : Récepteur Toll-Like

TNF $\alpha$  : Facteur de mort cellulaire alpha

TrisHCl : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate)

## **U**

UE : Union Européenne

## **V**

V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : L'oxyde de vanadium

## **W**

WT : Sauvage

# Liste des illustrations

Figure 1 : Échelle de taille des nanomatériaux. ....	7
Figure 2 : Les formes allotropiques du carbone. ....	8
Figure 3 : Marché des nanotubes de carbone, croissance par région (2021-2026). ....	10
Figure 4 : L'appareil respiratoire, lieu d'échanges gazeux entre le milieu extérieur et l'organisme. ....	15
Figure 5 : Modélisation du dépôt des particules dans les voies respiratoires. ....	17
Figure 6 : Structure de l'épithélium des voies respiratoires. ....	19
Figure 7 : Réponse inflammatoire aiguë induite par les nanotubes de carbone. ....	21
Figure 8 : Le cycle cellulaire et la mitose. ....	24
Figure 9 : Les mitoses anormales et leur devenir. ....	26
Figure 10 : L'inflammation chronique induite par les nanotubes de carbone. ....	30
Figure 11 : La transition épithélio-mésenchymateuse. ....	33
Figure 12 : Le rôle de l'EMT dans le développement de fibrose. ....	35
Figure 13 : Les étapes de la cancérogenèse. ....	37
Figure 14 : Les marqueurs du cancer. ....	38
Figure 15 : Rôle de l'EMT dans le développement des métastases. ....	40
Figure 16 : Évaluation de la température délivrée par le sonificateur. ....	48
Figure 17 : Dispersion des MWCNT dans les solutions de traitement utilisées lors des expériences menées <i>in vitro</i> . ....	50
Figure 18 : Dispersion des MWCNT dans les solutions de traitement utilisées lors des expériences menées <i>in vivo</i> . ....	51
Figure 19 : Les cellules BEAS-2B et temps de doublement. ....	52
Figure 20 : Schéma expérimental du test de toxicité des MWCNT dans la lignée BEAS-2B. ....	56
Figure 21 : Principe de préparation et d'hybridation des ARN avant hybridation sur puce à ADN (Agilent Technologies). ....	64
Figure 22 : Protocole expérimental d'exposition des rats WT et OGM aux MWCNT. ....	72
Figure 23 : Ordre de collecte des tissus des animaux WT ou OGM après leur mise à mort. ..	76
Figure 24 : Prélèvement et traitement des lobes pulmonaires des animaux WT et OGM aux temps J3 et M8. ....	78
Figure 25 : Images des nanotubes de carbone en microscopie électronique à transmission. ....	84
Figure 26 : Effets antiprolifératif et cytotoxique des MWCNT. ....	87
Figure 27 : Les différentes phases de la mitose dans la lignée BEAS-2B. ....	89
Figure 28 : Les MWCNT induisent des mitoses anormales. ....	92
Figure 29 : Le Mitsui-7 et le NM-403 induisent l'augmentation de la fréquence d'apparition de micronoyaux. ....	93
Figure 30 : Modifications de la morphologie des cellules BEAS-2B traitées avec le Mitsui-7 et le NM-403. ....	96
Figure 31 : Le Mitsui-7 et le NM-403 ont induit la sélection d'une population cellulaire. ....	98
Figure 32 : Les MWCNT modifient l'expression de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. ....	101
Figure 33 : Les MWCNT ont induit une diminution du marqueur épithélial E-cadhérine et une augmentation du marqueur mésenchymateux Vimentine à l'échelle protéique. ....	103

Figure 34 : Les modifications de morphologie des cellules BEAS-2B étaient réversibles....	105
Figure 35 : La transition épithélio-mésenchymateuse induite par les MWCNT était réversible. .....	107
Figure 36 : Les MWCNT modulent le transcriptome des cellules BEAS-2B. ....	109
Figure 37 : Populations cellulaires dans les cellules traitées avec le NM-401 et NM-402....	114
Figure 38 : Quantité de marqueur extracellulaire E-cadhérine dans les cellules traitées avec les NM-401 et NM-402. ....	115
Figure 39 : Résultats du génotypage des animaux WT et OGM.....	117
Figure 40 : Observation macroscopique des poumons des rats WT et OGM exposés au Mitsui- 7 et au NM-403. ....	119
Figure 41 : Taux de survie et suivi du poids des animaux exposés aux MWCNT. ....	120
Figure 42 : Données biométriques des organes des rats exposés au Mitsui-7 et au NM-403.	122
Figure 43 : Cytologie du lavage broncho-alvéolaire des animaux exposés aux MWCNT. ...	124
Figure 44 : Analyses biochimiques du lavage broncho-alvéolaire des rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 et au NM-403. ....	126
Figure 45: Analyses biochimiques du plasma des rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 et au NM-403. ....	128
Figure 46 : Les MWCNT n'ont pas induit de micronoyaux chez les animaux WT et OGM.	129
Figure 47 : Analyses histologiques des rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 ou au NM-403. .....	131

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des nanotubes de carbone issues de leur caractérisation. La longueur, le diamètre, la surface spécifique, le pourcentage de pureté et les contaminants métalliques sont présentés ci-dessous pour chaque MWCNT. ....	47
Tableau 2 : Calcul de la puissance délivrée par le sonificateur. ....	49
Tableau 3 : Observations de la qualité de suspension des nanotubes de carbone. ....	50
Tableau 4 : Concentrations des nanotubes de carbone utilisées pour le traitement des cellules. ....	54
Tableau 5 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR en temps réel. ....	61
Tableau 6 : Conditions d'utilisation des anticorps pour Western Blot. ....	69
Tableau 7 : Nombre d'animaux par groupe et par temps d'exposition. ....	73
Tableau 8 : Liste des points limites et leurs scores correspondants. ....	74
Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques des nanotubes de carbone. ....	85
Tableau 10 : Gènes différentiellement exprimés dans les cellules BEAS-2B traitées avec des MWCNT. ....	108
Tableau 11 : Les voies de signalisations dérégulées par les MWCNT. ....	110
Tableau 12 : Liste des gènes identifiés dans les 5 premières voies de signalisation dérégulées par le traitement des cellules BEAS-2B avec des MWCNT. ....	111
Tableau 13 : Comparatif des techniques de RT-qPCR et transcriptomiques pour l'étude de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. ....	112

# Liste des annexes

Annexe 1 : Études menées <i>in vivo</i> chez le rat ayant permis de mettre en évidence une inflammation, une fibrose ou le potentiel cancérogène suite à une exposition aux MWCNT. Études menées <i>in vivo</i> chez le rat ayant permis de mettre en évidence une inflammation, une fibrose ou le potentiel cancérogène suite à une exposition aux MWCNT. ....	176
Annexe 2 : Études menées <i>in vivo</i> chez la souris ayant permis de mettre en évidence une inflammation, une fibrose ou le potentiel cancérogène suite à une exposition aux MWCNT. ....	180
Annexe 3 : Études menées <i>in vitro</i> ayant permis de mettre en évidence le potentiel toxique des MWCNT. ....	188
Annexe 4 : Détails du rapport de contrôle qualité extrait de Feature Extraction. ....	212
Annexe 5 : Fiche d'observation quotidienne des animaux. ....	215
Annexe 6 : Communications, Publication. ....	216

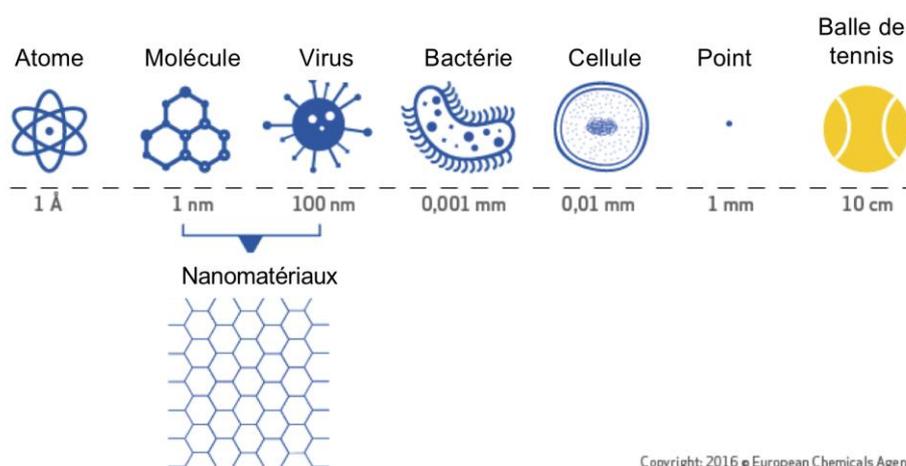


# I. Introduction

# 1. Les Nanotubes de carbone, généralités et voies d'entrée

## 1.1. Définition

Au cours des dernières décennies, les nanomatériaux (NM) sont passés de la recherche à une commercialisation dans de nombreux secteurs d'activité. En 2011, la Commission Européenne les a définis comme étant des matériaux naturels, formés accidentellement ou manufacturés contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. De plus, tout matériau est à considérer comme relevant de cette définition dès lors qu'il présente une surface spécifique en volume supérieure à  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  (2011/696/UE, Figure 1). Les NM ont été développés pour leurs propriétés innovantes liées à leurs caractéristiques physico-chimiques telles que leur taille, leur structure ou encore leur surface spécifique. Ces matériaux relèvent de nouveaux défis technologiques dans des domaines comme la santé, l'énergie, l'environnement, les transports et la communication. Ils apparaissent comme un enjeu économique majeur. Parmi les nombreux NM existants, les nanotubes de carbone (NTC) constituent une catégorie intéressante en raison de leur vaste potentiel d'action.

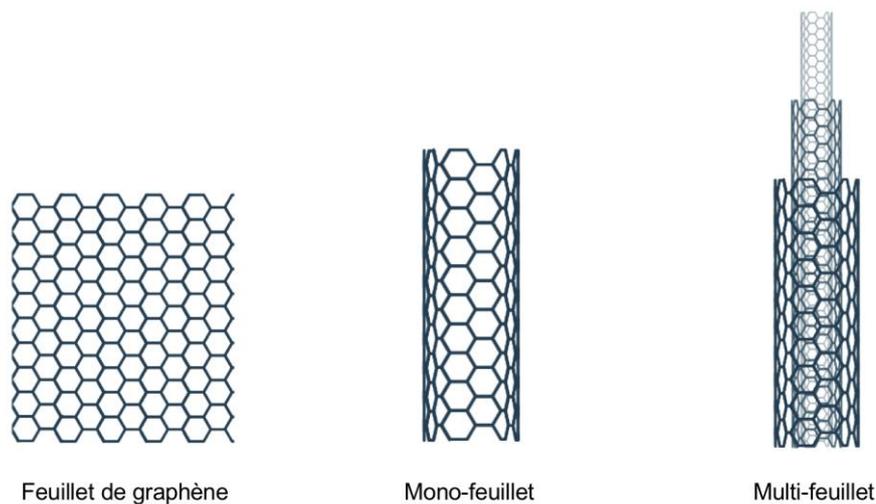


**Figure 1 : Échelle de taille des nanomatériaux.**

Les NM ont une ou plusieurs dimensions comprises entre 1 et 100 nm. Cela signifie que leur taille est comprise entre celle d'une molécule et celle d'un virus (2016<sup>©</sup> European Chemicals Agency).

Les NTC sont produits à partir du graphène, la forme allotropique cristalline du carbone. Ils peuvent être visualisés comme un ou plusieurs plans de réseaux hexagonaux d'atomes de carbone organisés en feuillets. Enroulés sur eux-mêmes, ces derniers prennent la forme d'un cylindre creux de plusieurs nanomètres de diamètre et d'une longueur allant du nanomètre au

micromètre. Dans notre environnement, la majorité des NTC sont produits en milieu industriel, une seconde partie, minime, est produite suite à la combustion de gaz naturels, de propane ou de méthane. Bien qu'ils semblent avoir été observés pour la première fois dans les années 1950, les NTC n'ont réellement été caractérisés qu'en 1991 par le physicien Sumio Iijima (Iijima, 1991). Ces cylindres creux démontrent des propriétés qui permettent de nombreuses applications. Cette thèse porte sur les NTC multi-feuillets, également appelés MWCNT (*Multi-walled carbon nanotubes*) de par la présence de plus de deux feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes (Figure 2). Ce sont les produits de nanotechnologie les plus en vogue et les NTC les plus commercialisés à ce jour (MordorIntelligence, 2020). Ils sont considérés comme des nano-fibres et répondent aux caractéristiques décrites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), c'est-à-dire un diamètre inférieur à 3  $\mu\text{m}$  et un rapport longueur/diamètre supérieur à 3.



**Figure 2 : Les formes allotropiques du carbone.**

Les NTC sont produits à partir de feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes. Lorsque le NTC est composé d'un seul feuillet on parle de NTC mono-feuillet. Lorsqu'il est composé de plus de deux feuillets de graphène il est appelé multi-feuillet (Réalisé avec © BioRender 2021).

## 1.2. Voies de synthèse et contaminants métalliques

Les NTC peuvent être produits par deux principales méthodes : la synthèse à haute température ou la synthèse à moyenne température. Dans la première voie de synthèse, une température élevée (1000-4000°C) est apportée par un arc électrique, une ablation laser ou un réacteur solaire sur du graphène fixé sur une électrode afin d'atteindre sa température de sublimation. Les atomes de carbone sont ensuite condensés sous forme de nanotubes (Maynard *et al.*, 2004). Ce processus fait intervenir un catalyseur métallique (cobalt, nickel, fer, etc.) et s'effectue en atmosphère inerte contenant un gaz noble tel que l'hélium ou l'argon. La seconde voie de synthèse s'effectue par CVD (*Carbon Vapor Deposition*), méthode la plus simple et la plus

utilisée par les industriels (Kumar and Ando, 2010). Cette technique fait intervenir la décomposition d'un gaz carboné (hydrocarbure, monoxyde de carbone, éthanol, etc.) à la surface d'un catalyseur métallique (cobalt, nickel, fer, etc.) dans un four à une température allant de 500°C à 1100°C à pression atmosphérique. Le carbone libéré par cette réaction aboutit à la formation de tubes de carbone cristallisés (WTEC, 2007, ENRHES, 2009, Singh *et al.*, 2009, Eatemadi *et al.*, 2014). Des traces des catalyseurs métalliques (cobalt, nickel, fer, etc.) impliqués dans ces procédés peuvent être présents dans la structure finale des NTC, elles sont considérées comme des impuretés catalytiques (Donaldson *et al.*, 2006, ENRHES, 2009). La réduction de ces impuretés nécessite l'utilisation de purifications chimiques ou des lavages répétés avec des solvants. Cependant, ces procédés ne sont pas réalisés de façon systématique par les industriels (ENRHES, 2009).

### 1.3. Applications en milieu industriel

La structure des NTC en fait un matériau convoité par les industriels. En effet, les NTC présentent d'intéressantes propriétés : électriques, ils constituent d'excellents conducteurs et ont une résistivité supérieure aux métaux classiques ; mécaniques, ils sont flexibles et déformants et sont plus résistants que l'acier ; thermiques, ils sont considérés comme les meilleurs conducteurs connus ; et chimiques de par leur capacité d'absorption élevée et leur stabilité à haute température sous atmosphère inerte. En raison de leurs propriétés physico-chimiques et de la diversité des fonctionnalisations possibles, les NTC sont présentés comme des matériaux révolutionnaires dans les secteurs tels que l'aérospatiale, l'électronique et la nanomédecine (Gulati and Gupta, 2012). De par leurs propriétés électriques et conductrices les NTC sont utilisés lors de la production d'écran plats, de matériel électronique et font partie de la composition des batteries lithium-ion utilisées dans les téléphones et les ordinateurs portables (Köhler AR *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2010). Leur résistance physique et thermique mais aussi leur légèreté sont mises à profit de la fabrication d'articles de sport, de pièces automobiles, et de nouveaux composites contenant des NTC (Köhler AR *et al.*, 2008, Lecce *et al.*, 2018, Chopra *et al.*, 2019, Diao *et al.*, 2020, Wei *et al.*, 2020). On observe une émergence de leur utilisation en milieu médical dans le cadre de la bio-imagerie, la fabrication de bio-senseurs, la vectorisation médicamenteuse et le développement de thérapies ciblées (Tan *et al.*, 2012, Rogers-Nieman and Dinu, 2014). L'implication de NTC dans de nombreux procédés en fait un matériau prometteur quel que soit le domaine.

#### 1.4. Les nanotubes de carbone en chiffres

L'exploitation des NTC se traduit par une production et une importation exponentielle au cours du temps. Au niveau national, la production et l'utilisation de NTC étaient comprises entre 1 et 10 tonnes en 2015 (R-Nano, 2016). À l'échelle mondiale, en 2006, la capacité de production des MWCNT était estimée à environ 270 tonnes par an (WTEC, 2007). Aujourd'hui, les MWCNT semblent avoir dominé le marché des NTC et devraient se développer à un rythme important en raison de leur application croissante dans différents domaines. La production mondiale de NTC devrait atteindre 4000 tonnes en 2023 selon des études statistiques (PlasticsToday). Les principaux producteurs de NTC sont situés en Amérique du Nord, en Europe et en Asie (Figure 3). L'Asie domine le marché mondial avec la plus grande consommation enregistrée pour la Chine et le Japon. L'abondance des matières premières et le faible coût de production ont soutenu la croissance de la production des MWCNT. L'augmentation du nombre d'études portant sur la recherche et le développement des MWCNT, qui était de 1554 pour la période 2000-2012 et de 4374 pour la période 2013-2021, ne cesse de croître et traduit leur production et leur utilisation exponentielle.



**Figure 3 : Marché des nanotubes de carbone, croissance par région (2021-2026).**

La Chine et le Japon dominent le marché mondial, viennent ensuite les États-Unis, le Canada et l'Europe. Enfin, leur utilisation et leur production, tout comme leur développement, est faible sur les continents d'Amérique du Sud et d'Afrique (Adapté de Mordor Intelligence, « *Carbon nanotubes market, growth, trends, COVID-19 impact and forecasts (2021-2026)* »).

## 1.5. Règlements et mesures de prévention

### *Règlementation*

Les NM constituent une famille de produits chimiques aux propriétés extrêmement diverses et c'est principalement cette diversité qui rend si difficile l'évaluation des risques suite à leur exposition. Au cours de la dernière décennie, beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'élaboration de normes, de guides de bonnes pratiques et de méthodologies pour l'évaluation et le contrôle de ces risques. Ces derniers sont indiqués pour les NM et s'appliquent aux NTC. De manière générale, et à l'échelle mondiale, les NM font l'objet d'une surveillance croissante. De ce fait, la réglementation et la création de documents relatifs à la production et manipulation ainsi qu'aux essais de toxicité des NM évoluent parallèlement à leur utilisation en milieu industriel. Les dispositifs de déclaration de production ou d'importation prennent place dans les travaux de l'Organisation pour la Coopération et le Développement Économique (OCDE) concernant la sécurité des NM manufacturés. Ils ont pour but d'élaborer des lignes directrices quant à leur manipulation. La France a été l'un des premiers pays à instaurer une déclaration obligatoire d'entrée et de production de substances à l'état particulaire, dont les NTC font partie. Depuis 2009, par la mise en place de la loi Grenelle, précisée en 2012 dans le décret n°2012-232, chaque industrie ou laboratoire se doit de déclarer les quantités et l'usage des NM qu'ils produisent ou importent dans le registre « R-Nano.fr ». Les NTC font également l'objet de déclarations annuelles obligatoires des NM en Belgique (Arrêté Royal, 2014) et au Danemark (Danish Environment Protection, 2014). En 2016, l'OCDE a décrit les approches traditionnelles de tests des produits chimiques comme étant appropriées pour l'évaluation de la sécurité des NM, cependant elles doivent être adaptées et tenir compte de leurs caractéristiques spécifiques (OCDE, 2016). Plus récemment, une monographie établie par l'OCDE récapitule l'état de l'art ainsi que la réglementation qui entoure l'utilisation et les essais incluant les NM (OCDE, 2016). Les NM étant considérés comme des produits chimiques, l'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA) participe également à l'évaluation de l'impact des NM sur la santé humaine et la réglementation qui entoure leur manipulation. La mise en place d'un dispositif « EpiNano » de surveillance épidémiologique de salariés potentiellement exposés aux NM, instauré en 2014 à l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), a permis à ce jour le recrutement d'une cohorte et a pour but d'évaluer leurs effets sur la santé à long terme. Plus spécifiquement aux NTC, en 2014, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) a classé les NTC comme substances dangereuses afin de mettre en place des méthodes de prévention des personnes exposées (Rapport

d'expertise collectif, Avril 2014, ANSES). En effet, les NTC représentent une classe particulière des NM du fait de leurs caractéristiques physiques. Ils sont considérés comme des NM dits de « rapport de forme élevé » (HARN : *High Aspect Ratio Nanoparticle*) car ils ont une longueur 3 fois supérieure à celle de leur largeur. Ainsi, leur surface de contact avec le milieu extérieur est plus importante que leur taille (ISO13794, 2019). Par ailleurs, l'hypothèse de l'effet fibre ou « Hypothèse de Santon » selon laquelle « toute fibre dont la longueur est supérieure à 8  $\mu\text{m}$  et dont le diamètre est inférieur à 0,025  $\mu\text{m}$  possède un haut potentiel cancérigène » avait été démontrée pour l'amiante (Dunnigan, 1984, Suzuki *et al.*, 2005). Même si tous les NTC ne sont pas considérés comme des fibres, le rapport longueur/diamètre extrêmement important des NTC combiné à leur biopersistance ont suscité des inquiétudes quant à leur capacité à déclencher des effets néfastes comparables aux fibres (Donaldson *et al.*, 2013). Au vu des résultats des études sur la toxicité des NTC, la monographie établie par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 2017 fait le bilan de l'impact des NTC sur la santé humaine et alerte sur leur potentiel cancérigène en classant le MWNT-7, également appelé Mitsui-7, dans la catégorie 2B, c'est-à-dire « cancérigène possible pour l'homme » (IARC, 2017). Les autres NTC ont été classés dans la catégorie 3, soit « agent inclassable quant à sa cancérigénicité pour l'homme », par manque d'études et d'informations à leur égard. En effet, au vu de la grande diversité des NTC produits, il semble difficile d'étendre le potentiel cancérigène d'un NTC à l'ensemble d'entre eux.

### *Mesures de prévention*

Au vu des effets potentiels des NTC sur la santé et par mesure préventive envers les salariés, le Haut Conseil de la Santé Publique préconise que la production ou l'utilisation des NTC doit s'effectuer en conditions de confinement strict (arrêté du 7 janvier 2009). En 2012, l'INRS préconise l'application de règles de sécurité générale de prévention du risque chimique définies par les articles R. 231-54 à R. 231-54-17 du code du travail lors de la manipulation des NTC. De par leur grande capacité de diffusion dans l'atmosphère, il est également conseillé que la production des NTC s'effectue en isolement complet dit en vase clos et que l'automatisation soit favorisée afin de minimiser le contact des salariés avec ces particules. En 2013, l'Institut National de Santé et Travail (NIOSH : *National Institute for Occupational Safety and Health*), homologue américain de l'INRS, a recommandé une valeur d'exposition limite de 1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de NTC pendant une durée maximale de 8h par jour (NIOSH, 2013). Afin d'évaluer le niveau d'exposition des salariés, des études ont été entreprises pour déterminer la concentration de

NTC lors des étapes de synthèse et de collecte. Alors que l'exposition lors de la production est restée faible lorsque celle-ci était effectuée dans un réacteur fermé, c'est à la fin de la synthèse et lors de la collecte des NTC que l'exposition était la plus importante. En effet, une concentration de  $286 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de particules-poussières a été mesurée lors de cette étape, et jusqu'à  $332 \mu\text{g}/\text{m}^3$  lors de la manipulation des NTC dans un endroit non ventilé (Han *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2010). La mise en place de moyens de protections collectives et individuelles est alors primordiale. L'INRS et le NIOSH ont publié des fiches de prévention et des recommandations pratiques concernant la manipulation des NM, applicables aux NTC, dans lesquelles sont décrites les moyens de protections collectives et individuelles afin de limiter les expositions des salariés. En ce qui concerne la protection collective, il est recommandé de travailler avec une ventilation par aspiration localisée, de mettre en place une filtration de l'air des locaux, une signalisation des zones de travail, restraints aux salariés concernés ainsi qu'un changement d'équipements avec nettoyage et décontamination sur le lieu de travail. L'évaluation de la quantité de NTC dans l'air ambiant est également conseillée. Des éléments de protection individuelle doivent être mis en place lorsque les dispositions collectives sont inapplicables ou insuffisantes. Il s'agit de protections respiratoires tels que les masques à ventilation et de protections cutanées telles que les combinaisons jetables étanches, le port de gants, de surchaussures et de lunettes, un lavage des mains et une décontamination avant de quitter le lieu de production. Les deux instituts, l'INRS et le NIOSH, ont également mis en place des formations dédiées aux personnels des industries produisant des NTC afin d'éviter une potentielle exposition et de prévenir des risques d'une telle exposition.

## 1.6. Voies d'exposition

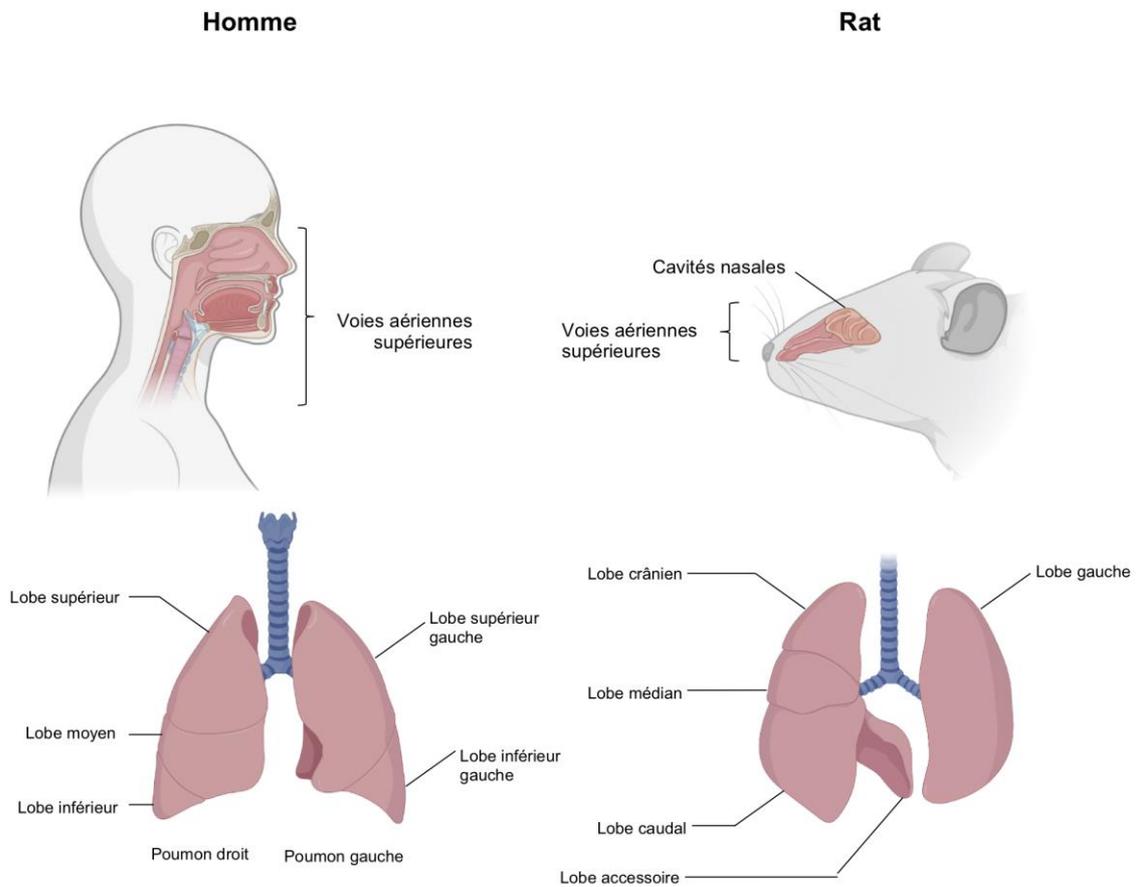
Les trois voies d'exposition potentielles aux NTC sont l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané. Les NTC n'étant pas utilisés dans l'industrie agroalimentaire, l'ingestion reste une voie minoritaire, sauf si elle est indirecte (ex : déjeuner sur le lieu de travail). La peau constitue également une porte d'entrée bien qu'elle ne soit pas considérée comme la principale. L'exposition du derme avec des NTC a été décrite comme pouvant induire des dermatites (allergie) ou une réponse inflammatoire (Tennstedt and Lachapelle, 2002, Murray *et al.*, 2009, Luanpitpong *et al.*, 2014). Lors de leur production, leur transport ou leur conditionnement, les NTC peuvent être présents dans l'atmosphère sous forme d'aérosols nano-structurés. L'inhalation par les salariés représente ainsi la voie majoritaire de pénétration des NTC dans

l'organisme et le système respiratoire constitue leur tissu cible. Une fois inhalés, les NTC peuvent être exhalés ou se déposer dans les différentes régions des voies respiratoires.

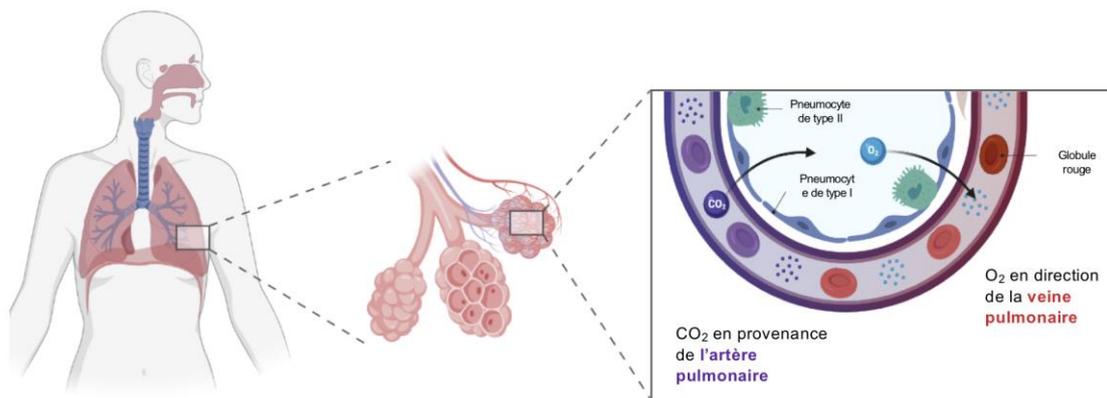
### 1.7. Anatomie de l'appareil respiratoire chez l'Homme et chez le rat

L'appareil respiratoire comprend l'ensemble des éléments permettant l'échange de l'oxygène (O<sub>2</sub>) et du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) entre notre organisme et l'environnement. L'appareil respiratoire est divisé en deux parties : les voies aériennes supérieures constituées du nez, de la bouche, du pharynx et du larynx, et les voies aériennes inférieures composées de la trachée, des bronches souches puis lobaires, des bronchioles et des alvéoles pulmonaires. Situés sous la cage thoracique au-dessus du diaphragme, les poumons sont entourés par la plèvre leur permettant d'augmenter de volume lors de la respiration. Les voies aériennes ont de multiples fonctions : la respiration ou ventilation, l'humidification de la muqueuse, la défense contre les éléments toxiques mais également des fonctions non respiratoires telles que la phonation, la déglutition, l'odorat et le goût. L'Homme possède deux poumons, le poumon droit qui est lui-même constitué de trois lobes (supérieur, moyen et inférieur) séparés par des cloisons inter-lobaires et le poumon gauche qui est constitué de deux lobes (supérieur et inférieur, Figure 4A). Contrairement à l'Homme qui respire à la fois par la bouche et le nez, le rongeur ne respire que par le museau. Ce dernier est composé de cavités nasales riches en cornets nasaux. Ces structures très vascularisées permettent d'augmenter la surface de contact de la muqueuse nasale avec le milieu extérieur. Les poumons des rongeurs ont également une anatomie différente. Le poumon droit est plus volumineux et est constitué de 4 lobes (lobe crânial, médian, caudal et accessoire), le poumon gauche est composé d'un seul lobe (Figure 4A). L'air inspiré pénètre par les fosses nasales, le pharynx, la trachée, puis arrive dans l'arbre bronchique où il est distribué dans les bronches primaires, secondaires et tertiaires puis dans les bronchioles au bout desquelles se situent les alvéoles pulmonaires. Ces dernières constituent un lieu d'échange entre l'O<sub>2</sub> du milieu extérieur et le CO<sub>2</sub> présent dans le sang veineux (Figure 4B). Les artères pulmonaires acheminent le sang pauvre en O<sub>2</sub> depuis le ventricule droit du cœur vers les alvéoles pulmonaires qui sont entourées de capillaires sanguins. Les échanges gazeux se réalisent à travers la membrane alvéolo-capillaire selon le gradient de pression des gaz (Moinard *et al.*, 2004). On compte près de 300 millions d'alvéoles pulmonaires chez l'Homme, c'est pourquoi les voies respiratoires représentent la plus grande surface épithéliale d'échange de l'organisme (140 m<sup>2</sup>) au contact avec le milieu extérieur.

A



B



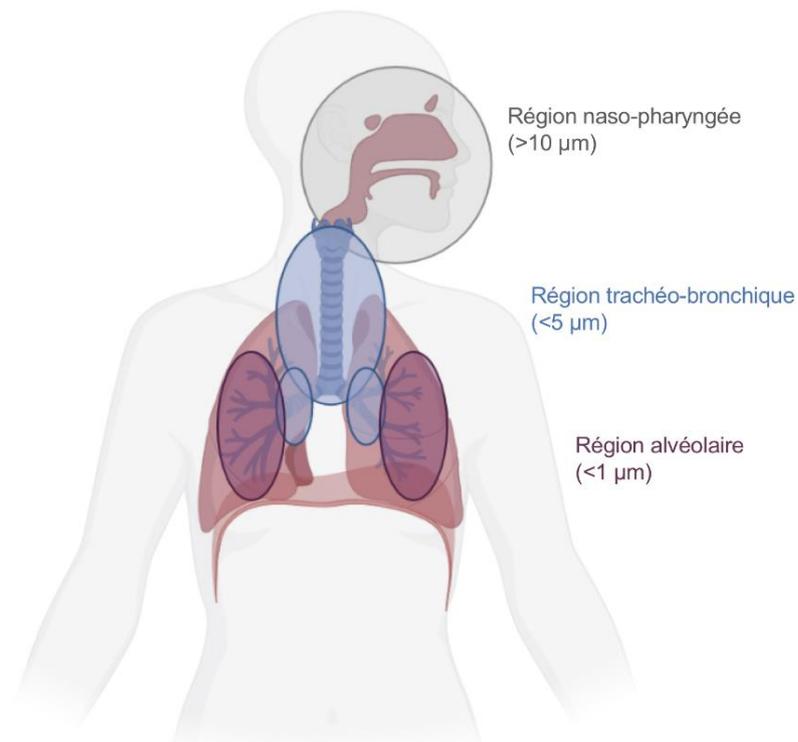
**Figure 4 : L'appareil respiratoire, lieu d'échanges gazeux entre le milieu extérieur et l'organisme.** (A) L'appareil respiratoire du rat diffère de celui de l'Homme de par la structure des voies aériennes supérieures. Le rat n'est capable de respirer que par le museau et est doté de cavités nasales qui permettent d'augmenter la surface de contact avec le milieu extérieur. L'architecture du poumon diffère également entre les deux espèces. (B) Le schéma représente les échanges gazeux entre l'alvéole pulmonaire et la circulation sanguine. L'air inspiré, lorsqu'il arrive dans les alvéoles va permettre la ré-oxygénation du sang. Au même moment, le dioxyde de carbone est rejeté dans les alvéoles afin d'être éliminé de l'organisme lors de l'expiration (Réalisé avec © BioRender 2021).

## 1.8. Modèle de dépôt dans les voies respiratoires

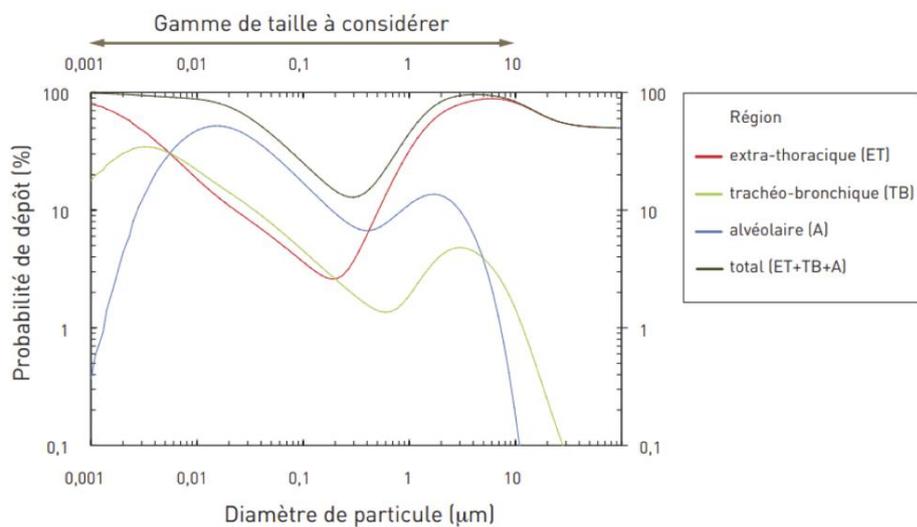
Le dépôt des NP et leur rétention après inhalation peut être estimé à partir de modélisation mathématique prenant en compte le diamètre et le facteur d'inhabitabilité des NP. De manière générale, il est possible de distinguer trois voies de dépôt des particules qui dépendent fortement de leur taille : l'impaction, la sédimentation et la diffusion. Seule la voie de diffusion s'applique aux NP. Basé sur un modèle mathématique prédictif de la localisation des NP dans les voies respiratoires après inhalation, il est possible d'anticiper leur dépôt en fonction de leur taille (ICRP, *International Commission on Radiological Protection*, (ICRP, 1994)). Les particules de plus de 5  $\mu\text{m}$  se déposent principalement dans la région naso-pharyngienne et sont susceptibles d'être expectorées (Figure 5A). Les particules de 1 à 5  $\mu\text{m}$  diffusent plus profondément dans les poumons au niveau des bronchioles et de la région trachéo-bronchique et les particules de moins de 1  $\mu\text{m}$  se déposent principalement dans les régions alvéolaires. Aujourd'hui, la dose déposée dans les poumons après inhalation peut également être estimée à l'aide d'outils informatiques de modélisation prenant en compte plusieurs données. Le plus courant est le modèle MPPD (*Multiple-Path Particle Dosimetry Model*, ARA, Albuquerque). Ce modèle de prédiction permet de calculer le dépôt d'aérosols de NP dont la taille est comprise entre 0,01 et 20  $\mu\text{m}$  tout en tenant compte de l'espèce, du diamètre des particules et de leur élimination. Les interprétations sont similaires à celles précédemment décrites : les objets dont le diamètre est compris entre 10 et 100 nm se déposent plus facilement au niveau des alvéoles pulmonaires que les objets micrométriques (Figure 5B). Il permet également de transposer les doses d'exposition utilisées *in vivo* à l'Homme. Les modèles de Oberdörster et al. et Schmid & Cassee mettent en avant la méthode de calcul pour transposer une dose d'exposition aux NP chez le rat à une dose d'exposition chez l'homme le temps d'une carrière professionnelle (Oberdorster *et al.*, 2015, Schmid and Cassee, 2017).

Les limites de ces modèles mathématiques résident dans la nature et les caractéristiques des particules. En effet, une première limite s'applique à l'échelle des NP car il est difficile de déterminer précisément la densité effective de l'aérosol lorsque les NP sont sous forme de fibres. Plus particulièrement, pour les NTC, leur capacité à former des agrégats ou agglomérats de taille et de forme hétérogène ne permet pas de déterminer précisément un facteur de forme (*aspect ratio*) représentatif de l'échantillon. De plus, le dépôt des NTC dans les voies respiratoires varie selon les propriétés physico-chimiques (longueur, diamètre, etc.), l'état d'agrégation ou d'agglomération.

A



B



**Figure 5 : Modélisation du dépôt des particules dans les voies respiratoires.**

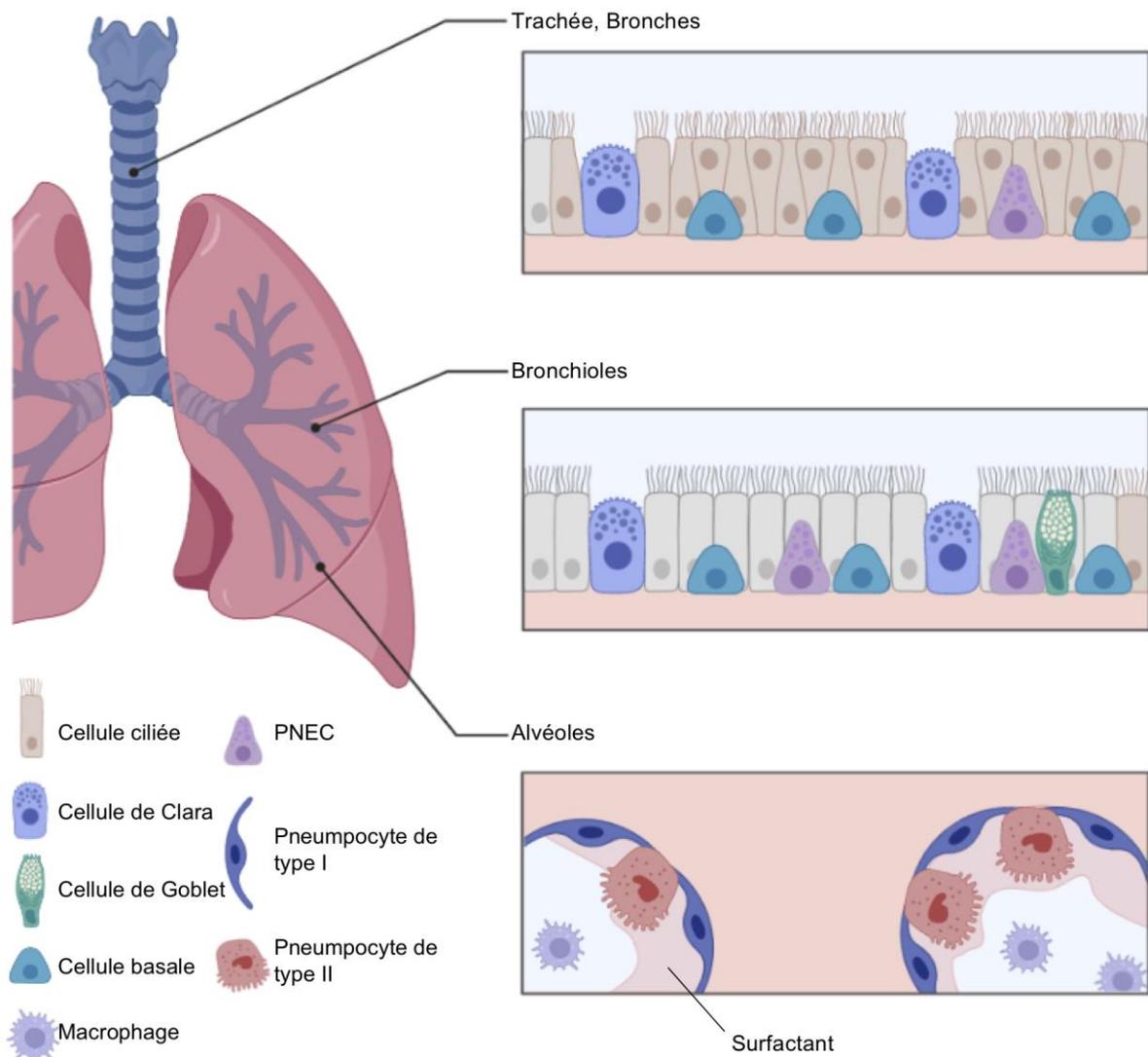
(A) Le schéma représente le dépôt théorique et régional des NP inhalées chez l'Homme, en fonction du diamètre (modèle de la Commission internationale de protection radiobiologique, CIPR). Les particules d'une taille allant de 1 à 5  $\mu\text{m}$  pénètrent dans les voies respiratoires supérieures, les particules inférieures à 1  $\mu\text{m}$  se déposent dans les voies respiratoires profondes au niveau des alvéoles pulmonaires. (B) Le graphique représente la probabilité de dépôt (%) des NP dans les différentes régions des voies respiratoires en fonction de leur diamètre (Adapté de Oberdörster *et al.*, 2005 et INRS, ND 2355-226-12, réalisé avec © BioRender 2021). NP : nanoparticules.

Toutefois, même si l'application directe des calculs d'inhabilité n'est pas possible pour les NTC, ces modélisations peuvent fournir quelques éléments d'informations quant à leur dépôt dans les voies respiratoires.

### 1.9. Mécanismes d'élimination des nanotubes de carbone

L'architecture de l'arbre bronchique ainsi que les systèmes de défense des voies respiratoires permettent de maintenir une intégrité tissulaire et fonctionnelle. Les cellules présentes dans l'appareil respiratoire possèdent toutes une fonction qui leur est propre. Le tractus respiratoire est responsable du fonctionnement des voies respiratoires, de l'humidification de la muqueuse, de la sécrétion de mucus, de la clairance muco-ciliaire et de la défense antibactérienne (Kurbatova *et al.*, 2015). L'épithélium bronchique présent de la trachée aux bronchioles est composé de quatre types cellulaires majoritaires (Figure 6). Les cellules ciliées sont les plus abondantes, elles possèdent des cils au niveau de leur pôle apical qui battent à une fréquence régulière et produisent un mouvement ciliaire. Les cellules de Clara participent à la production d'antiprotéases et de mucus, elles interviennent dans les mécanismes de détoxification. Les cellules de Goblet participent à la sécrétion et à la formation du mucus, substance antibactérienne permettant également de piéger les impuretés de l'air inspiré. Les cellules basales sont localisées en profondeur de l'épithélium et permettent le renouvellement cellulaire. Les cellules neuro-endocrines pulmonaires (PNEC) sont sensibles aux produits chimiques et aux polluants. Lorsqu'elles sont stimulées, ces cellules libèrent plusieurs hormones qui induisent la constriction des voies respiratoires. L'épithélium est recouvert d'un mucus d'environ 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Il s'agit d'un liquide hypotonique composé de 95% d'eau, 1% de sels et 1-2% de protéines et de mucines. La sécrétion de mucus associée aux mouvements ciliaires entraîne l'épuration pulmonaire par le processus de clairance muco-ciliaire, aboutissant à l'expectoration et à la déglutition des particules. Ce mécanisme d'ordre mécanique prend place dans la trachée, les bronches et les bronchioles et constitue une première barrière de défense contre l'inhalation d'éléments exogènes (Invernizzi *et al.*, 2020).

L'épithélium alvéolaire est composé de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I qui constituent 95% de la surface épithéliale et jouent le rôle de maintien et de barrière lors des échanges gazeux ; les pneumocytes de type II qui constituent 5% de la surface alvéolaire mais représentent les 2/3 du nombre de cellules totales.



### Figure 6 : Structure de l'épithélium des voies respiratoires.

L'épithélium respiratoire est composé de différentes cellules en fonction des régions. Dans la trachée et les bronches, l'épithélium est majoritairement composé de cellules ciliées, de cellules de Clara, de cellules basales et de cellules endocrines (PNEC : *Pulmonary neuroendocrine cells*). Dans des bronchioles, l'épithélium comprend, en plus des types cellulaires précédents, des cellules de Goblet. L'épithélium alvéolaire est uniquement constitué de pneumocytes de type I et de type II. L'espace alvéolaire comprend également des macrophages ainsi qu'un surfactant à la surface de l'épithélium (Réalisé avec © BioRender 2021).

Ces dernières sont de petites cellules qui assurent 4 fonctions majoritaires : la participation au métabolisme du surfactant, la prolifération, la réparation cellulaire et le transport d'électrolytes. Outre le mécanisme de clairance muco-ciliaire, la phagocytose des particules par les macrophages alvéolaires joue un rôle majeur dans la protection des voies respiratoires profondes et l'élimination des particules (Leiva-Juaárez *et al.*, 2016). Les macrophages

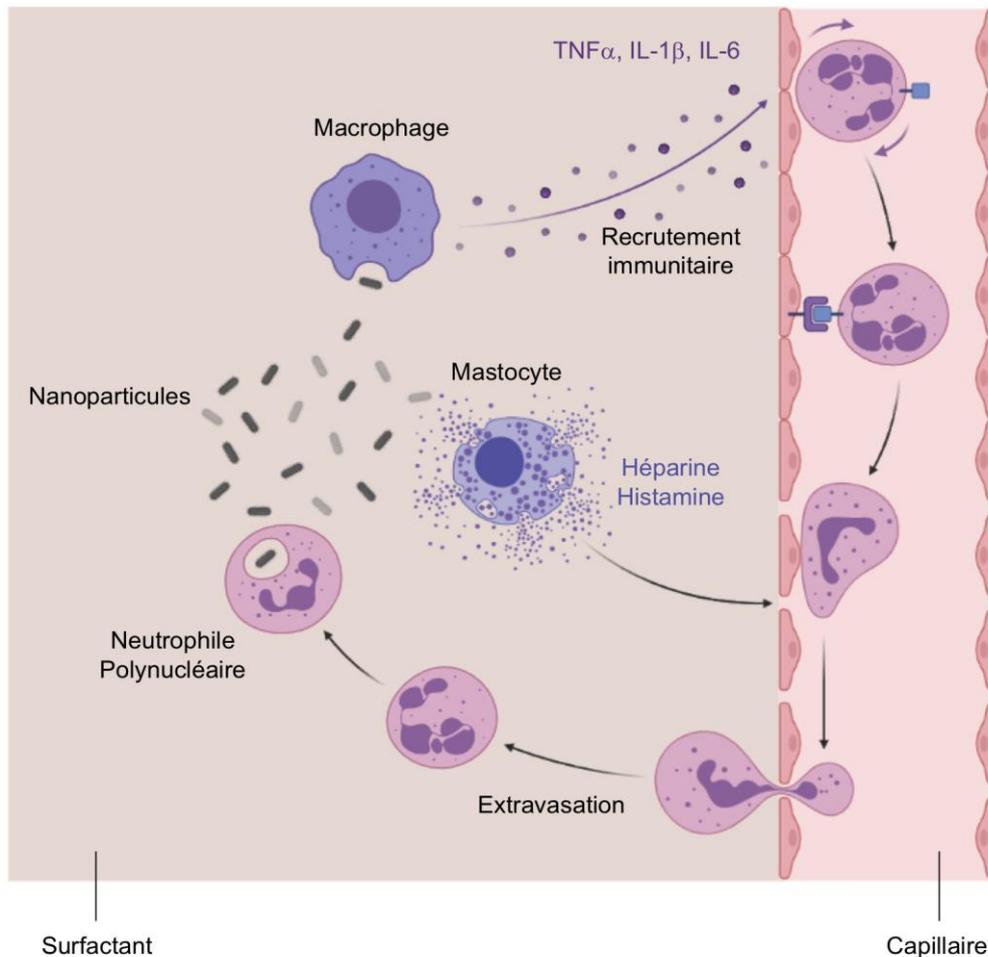
phagocytent les particules exogènes puis migrent vers les voies respiratoires supérieures et sont éliminés par expectoration et déglutition. D'autre part, ils peuvent être transportés dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons afin d'y présenter l'antigène.

## 2. Inflammation et génotoxicité induite par les nanotubes de carbone

### 2.1. La réponse inflammatoire aiguë

La réponse inflammatoire aiguë est un mécanisme physiologique de défense de l'organisme permettant l'élimination d'un agent exogène. Les agents exogènes inhalés vont être reconnus par les récepteurs Toll-Like (TLR) présents à la surface des cellules et conduire à l'induction d'une signalisation cellulaire. L'inflammation est initiée par les mastocytes présents dans les tissus connectifs ou les membranes des muqueuses. Ces cellules sont responsables de la dilatation des vaisseaux sanguins et initient l'inflammation par la sécrétion d'héparine et d'histamine, messagers chimiques induisant le recrutement de macrophages et de neutrophiles polynucléaires au point d'inflammation (Figure 7). Les macrophages participent à la défense pulmonaire, ils sont capables de neutraliser une particule par phagocytose et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor*), l'IL-1 $\beta$  (IL : Interleukine), l'IL-6 et l'IL-8 mais également des chimiokines telles que des CX-Chimiokine (CXC, ex : CXCL-2, CXCL-16) et des CC Chimiokine ligand (CCL, ex : CCL-2, CCL-5) qui vont stimuler le recrutement des neutrophiles polynucléaires et des autres cellules de la réponse inflammatoire (macrophages, lymphocytes, monocytes). L'inflammation se traduit ainsi par un influx, une infiltration et une accumulation de cellules inflammatoires dans les régions interstitielles et péribronchiques des poumons. Par ailleurs, les macrophages initient également l'immunité adaptative suite à leur migration dans la circulation lymphatique afin d'y présenter l'antigène provenant de l'agent exogène. Cela permet l'activation des lymphocytes T et la production de lymphocytes B mémoire afin d'amplifier la réponse immunitaire (Coussens and Werb, 2002, Germolec *et al.*, 2018, Aghasafari *et al.*, 2019).

Une littérature abondante a mis en évidence le potentiel inflammatoire des MWCNT. La réponse tissulaire suite au dépôt de MWCNT dans les poumons ou dans la cavité pleurale ou abdominale ressemble à celle induite par un corps étranger introduit dans l'organisme, en induisant dans un premier temps une réponse inflammatoire aiguë.



### Figure 7 : Réponse inflammatoire aiguë induite par les nanotubes de carbone.

Lors de l'entrée des MWCNT dans les alvéoles pulmonaires, ces derniers déclenchent l'activation de mécanismes de défense et d'élimination. Ainsi, une réponse inflammatoire aiguë se met en place. La reconnaissance de la particule induit dans un premier temps la sécrétion d'héparine et d'histamine de la part des monocytes. Ces molécules induisent la dilatation des vaisseaux sanguins et stimulent le recrutement des neutrophiles polynucléaires et des macrophages au site d'infection. Ces deux types cellulaires permettent l'élimination des particules mais sécrètent également des chimiokines et cytokines responsables du recrutement immunitaire de davantage de cellules au site de reconnaissance. La réaction en chaîne produit initialement une inflammation aiguë en réponse à l'inhalation de MWCNT (Adapté de Thompson *et al.*, 2011, réalisé avec © BioRender 2021).

Différents modèles d'étude ont été développés, *in vivo*, l'utilisation de rongeurs permet d'étudier l'effet des MWCNT dans un organisme entier, et *in vitro*, avec des modèles cellulaires des voies respiratoires, notamment des cellules épithéliales bronchiques (SAEC et BEAS-2B), des macrophages (NR8383, THP-1, RAW264.7) ou des lignées pulmonaires cancéreuses (A549). La collecte et la cytologie du lavage broncho-alvéolaire (LBA), réalisées chez les animaux exposés aux MWCNT ont permis d'échantillonner l'espace alvéolaire et d'évaluer la mise en place de cette inflammation aiguë. Une augmentation drastique du nombre de

neutrophiles polynucléaires et de macrophages a été constatée chez les animaux exposés aux MWCNT (Ma-Hock *et al.*, 2009, Aiso *et al.*, 2010, Porter *et al.*, 2010, El-Gazzar *et al.*, 2018, Knudsen *et al.*, 2018, Thompson *et al.*, 2018, Knudsen *et al.*, 2019), ainsi que la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires susceptibles de persister après l'exposition (Porter *et al.*, 2010, Dong *et al.*, 2015). Par exemple, l'exposition de souris C57BL/6J au Mitsui-7 par aspiration pharyngée (5-40 µg/souris) a été responsable de l'induction d'une réponse inflammatoire aiguë se traduisant par un influx de neutrophiles et de macrophages dans le LBA ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Cette étude a également mis en évidence la formation de foci fibrotiques de façon dépendante du temps et de la concentration (Dong *et al.*, 2015). L'Annexe 1 et Annexe 2 référencent les études menées *in vivo* ayant recherché le potentiel inflammatoire et toxique des MWCNT, respectivement, chez le rat et chez la souris.

De nombreuses études *in vitro* rapportent la production de cytokines pro-inflammatoires suite à un traitement des cellules avec des MWCNT (Hamilton *et al.*, 2012, Horie *et al.*, 2019, Long *et al.*, 2019, Huang *et al.*, 2020). Il a été montré que le traitement des BEAS-2B, NR8383 ou THP-1 différenciés avec des MWCNT a été responsable de l'induction de la voie NF-κB et de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-8 (Hirano *et al.*, 2010, He *et al.*, 2011, Nahle *et al.*, 2019, Westphal *et al.*, 2019, Huang *et al.*, 2020). L'activation de l'inflammasome NLRP3 a également été mis en évidence suite au traitement de cellules épithéliales bronchiques humaines ou de macrophages avec des MWCNT (Hamilton *et al.*, 2012, Hussain *et al.*, 2014, Jessop *et al.*, 2017, Kodali *et al.*, 2017, Fan *et al.*, 2020). Plus généralement, le traitement de cellules bronchiques avec des MWCNT a été responsable de l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Snyder-Talkington *et al.*, 2019). Depuis 2005, près de 80 études menées *in vitro* utilisant des modèles de cellules pulmonaires ont permis de mettre en évidence le potentiel inflammatoire et toxique des MWCNT à court ou à long terme. Une inflammation pulmonaire, aiguë, transitoire et/ou persistante a été observée dans la plupart d'entre elles. L'Annexe 3 réfère des études menées *in vitro*, sur des cellules pulmonaires, ayant recherché le potentiel toxique des MWCNT.

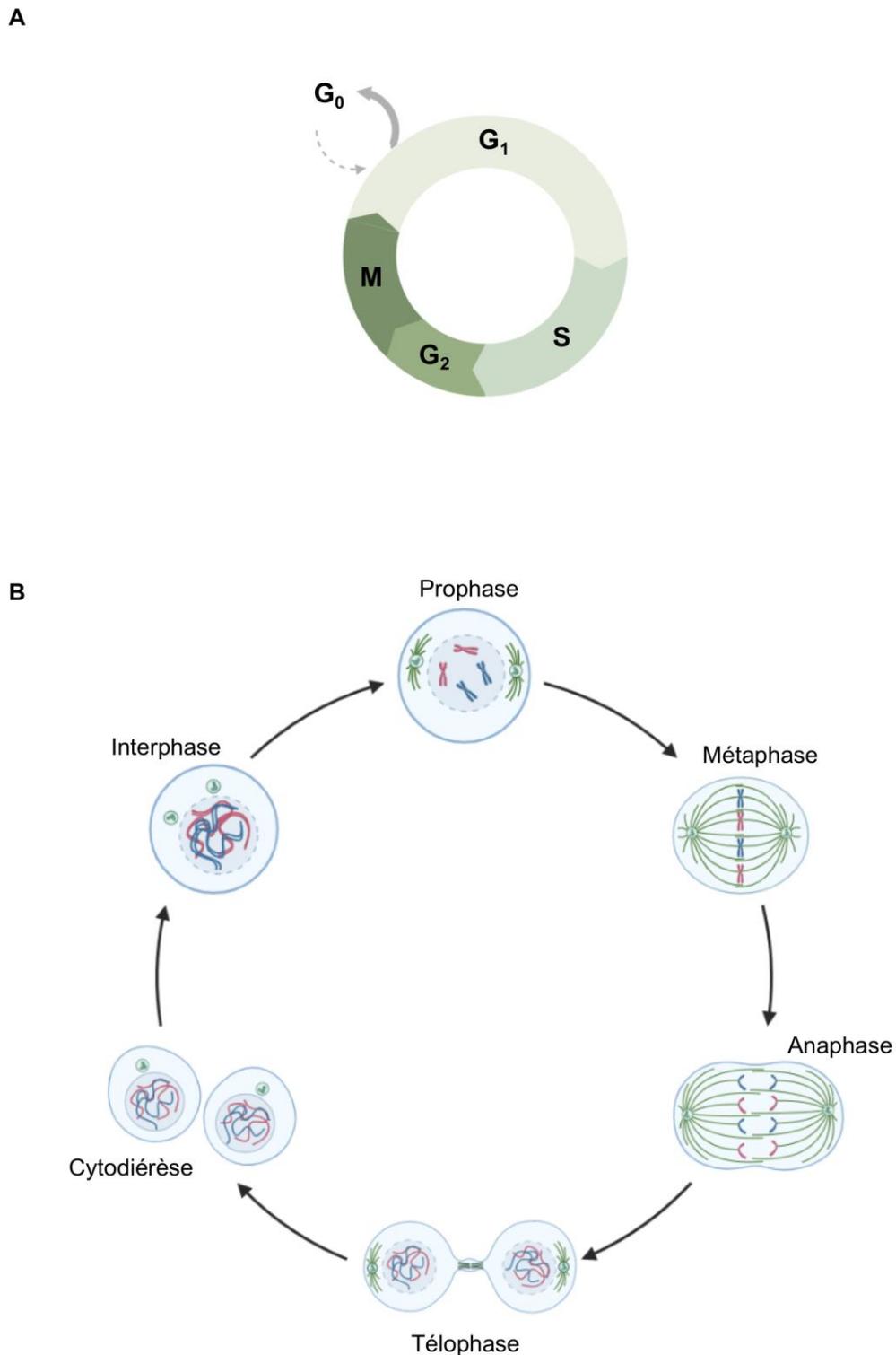
## 2.2. La génotoxicité

Que l'action des MWCNT soit directe ou non, l'environnement inflammatoire favorise davantage la toxicité cellulaire. Les dommages à l'ADN tels que les micronoyaux, les cassures

de l'ADN et les mitoses anormales sont autant d'évènements susceptibles d'induire un potentiel toxique à court ou à plus long terme.

Le cycle cellulaire est un processus complexe qui aboutit à la production de deux cellules filles identiques. Les deux phases d'intervalle  $G_1$  et  $G_2$  (« Gap ») séparent deux évènements fondamentaux : l'interphase lors de laquelle a lieu la synthèse de l'ADN (phase S) et la mitose (phase M) pendant laquelle a lieu la division cellulaire (Figure 8A). La mitose débute par la prophase au cours de laquelle les chromosomes se condensent suite au recrutement de condensines. Le réseau de microtubules s'organise autour du noyau, son assemblage dépend de la polymérisation et dépolymérisation des microtubules (Figure 8B, (Walczak *et al.*, 2010, Petry, 2016). En fin de prophase, la dégradation de l'enveloppe nucléaire constitue une étape essentielle pour l'assemblage du fuseau mitotique. Elle conduit au mélange des deux compartiments cellulaires, permettant aux microtubules d'accéder aux chromosomes (McIntosh, 2016). La pro-métaphase est une étape dynamique au cours de laquelle les microtubules s'assemblent et se désassemblent rapidement en recherchant des sites d'attachement au niveau des kinétochores des chromosomes. La métaphase débute lorsque les centromères de chaque chromosome sont alignés sur le plan équatorial, situé à équidistance des deux pôles du fuseau mitotique. La progression des cellules de la métaphase à l'anaphase est marquée par la séparation des chromatides sœurs. Au cours de l'anaphase les chromosomes se déplacent vers les pôles du fuseau. La mitose se termine par la télophase à la fin de laquelle les chromosomes atteignent les pôles. En fin de mitose, le réseau existant de microtubules est désassemblé, le réseau du fuseau mitotique suivant sera généré *de novo*. La membrane nucléaire se reforme et les chromosomes se décondensent. La télophase est suivie de la cytotélophase pendant laquelle le matériel cytoplasmique est divisé en deux et est réparti entre les cellules filles. Les cellules issues de la division cellulaire ont une composition génétique identique.

La bipolarité du fuseau mitotique est essentielle pour une ségrégation fidèle des chromosomes lors de la division cellulaire. Une anomalie des centrosomes peut être à l'origine de l'apparition de mitoses anormales. En effet, l'augmentation du nombre de centrosomes peut conduire à la formation d'un fuseau mitotique multipolaire qui, s'il n'est pas corrigé avant l'anaphase, entraîne la répartition des chromosomes en plus de deux cellules filles. Les mitoses anormales peuvent avoir d'autres origines : l'inactivation des points de contrôle du cycle cellulaire, la surduplication des centrosomes ou leur fragmentation.

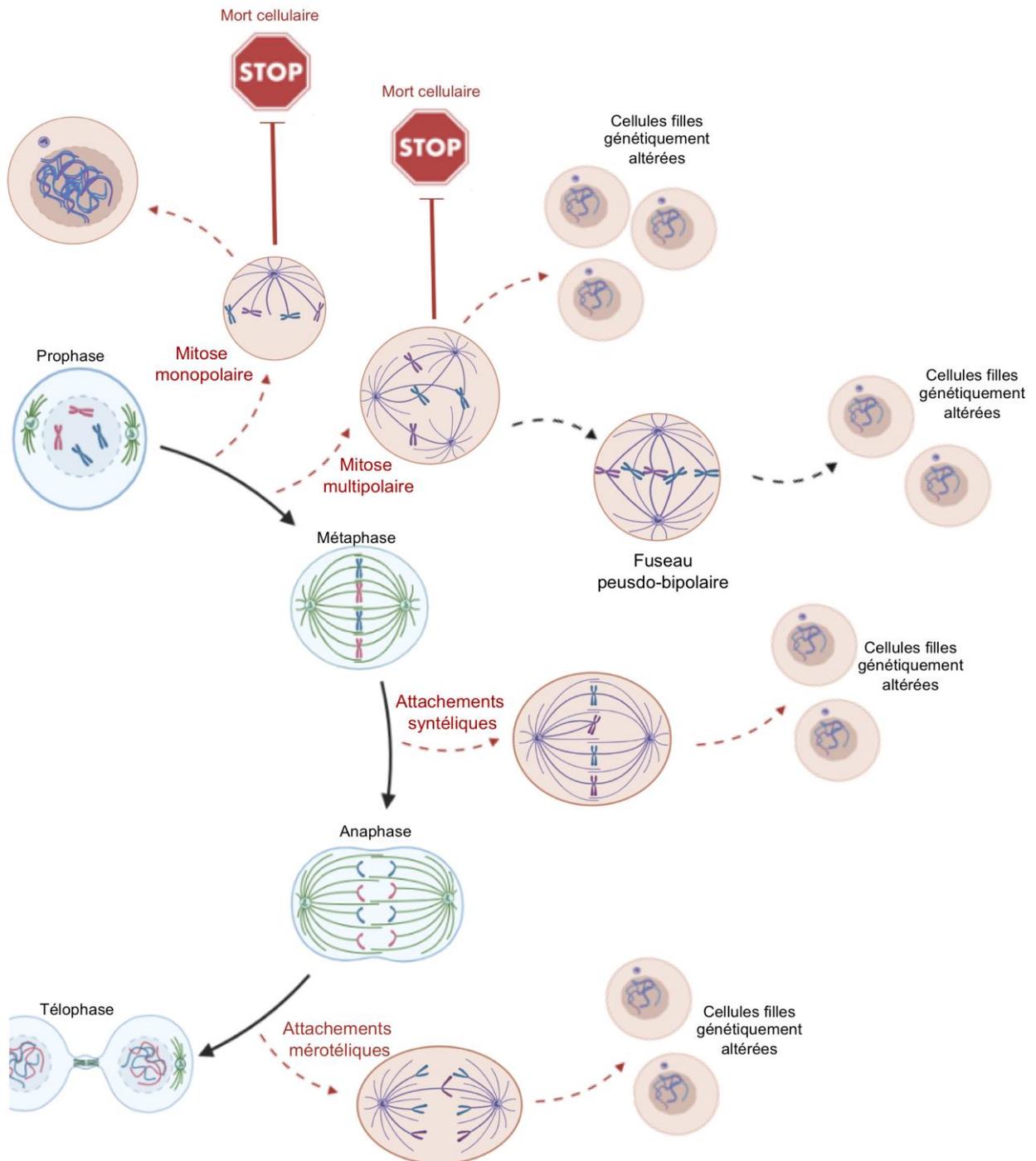


**Figure 8 : Le cycle cellulaire et la mitose.**

(A) Le cycle cellulaire comprend les phases successives  $G_1$ , S,  $G_2$ , M ainsi qu'une phase  $G_0$  dite de « quiescence ». (B) La mitose se déroule suivant différentes phases successives permettant la mise en place du fuseau mitotique (prophase), l'alignement des chromosomes sur un même plan (métaphase), la séparation de chaque chromatide vers un pôle de la cellule (anaphase) et la décondensation et la reformation de l'enveloppe nucléaire (télaphase) puis la séparation des deux cellules filles (cytodiérèse) (Adapté de Helder Maiato & Elsa Logarinho 2010, réalisé avec © BioRender 2021).

Les mitoses multipolaires peuvent également se former indépendamment de ces mécanismes, par exemple, suite à une perte d'intégrité du pôle du fuseau mitotique (Maiato and Logarinho, 2014). Un désagrément prématuré des centrioles accompagné d'une fragmentation du matériel péricentriolaire peut également conduire à des mitoses multipolaires (Krauss *et al.*, 2008, Oshimori *et al.*, 2009, Kimura *et al.*, 2013). Afin de corriger la structure du fuseau mitotique, les centrosomes peuvent se regrouper afin de former un fuseau mitotique pseudo-bipolaire susceptible d'entraîner une augmentation du taux d'attachements synthéliques ou mérotéliques : un même kinétochore peut être attaché à deux microtubules émergeant des mêmes pôles ou des pôles opposés du fuseau mitotique (Figure 9). Une partie des chromosomes présentant ces attachements conduit à une ségrégation retardée. Ils peuvent ensuite être mal répartis et produire des cellules filles aneuploïdes (Cimini *et al.*, 2001, Cimini *et al.*, 2003). Plus souvent, les chromosomes retardés sont séparés correctement mais ne parviennent pas à atteindre la masse chromosomique principale avant le réassemblage de l'enveloppe nucléaire et sont partitionnés en micronoyaux (Thompson and Compton, 2011). L'ADN piégé dans ces micronoyaux subit d'importants dommages qui peuvent également être responsables de réarrangements chromosomiques (Fukasawa, 2005).

Une partie des mitoses tripolaires franchissent l'étape de la cytodierèse et produisent des cellules filles viables mais aneuploïdes. Au contraire, les cellules ayant une mitose multipolaire contenant plus de 3 pôles n'aboutissent pas à la cytodierèse et deviennent de grandes cellules avec un génome doublé ou meurent suite à l'induction de la catastrophe mitotique (Figure 9). Ce mécanisme a été défini comme étant onco-suppressif et engendre la mort des cellules issues des mitoses multipolaires, il permet d'éviter l'instabilité génomique (Vitale *et al.*, 2011). Les cellules anormales qui échappent à la mort cellulaire posséderont des erreurs de ségrégations chromosomiques et seront susceptibles de les transmettre aux générations suivantes. L'apparition de mitoses monopolaires ou multipolaires peut conduire à des altérations du nombre de chromosomes, des altérations de leur structure, notamment des délétions, des amplifications ou des translocations de domaines chromosomiques. Ces événements favorisent l'instabilité chromosomique qui consiste à l'acquisition d'altérations génomiques tels que le gain ou la perte de chromosomes (Castedo *et al.*, 2004, Fukasawa, 2005). Un mécanisme largement accepté suggère que les erreurs de mitose faciliteraient le développement tumoral suite à la perte d'un chromosome contenant un gène suppresseur de tumeur (Hardy and Zacharias, 2005, van Jaarsveld and Kops, 2016).



**Figure 9 : Les mitoses anormales et leur devenir.**

Les mitoses sont considérées comme étant anormales lorsqu'elles présentent des anomalies du fuseau mitotique. Des mitoses monopolaires, composées d'un seul pôle, peuvent être produites lors de la prophase. Ces cellules connaissent deux issues : la mort cellulaire ou la formation d'une grande cellule dont le matériel génétique est doublé, elle contient fréquemment un micronoyau. De la même manière, la perturbation du fuseau mitotique peut donner lieu à la formation de mitoses multipolaires. Ces cellules connaissent trois issues : la mort cellulaire, la formation d'un fuseau pseudo-bipolaire ou une division en cellules filles génétiquement altérées. Des attachements syntéliques peuvent avoir lieu entre la métaphase et l'anaphase, les attachements mérotéliques sont susceptibles de survenir entre l'anaphase et la télophase, ils sont la cause de cellules filles génétiquement altérées ainsi que de la formation de micronoyaux. (Adapté de Vitale *et al.*, 2011, réalisé avec © BioRender 2021).

La perturbation du fuseau mitotique par les MWCNT a été étudiée par Siegrist *et al.* en 2014. Cette étude a montré que le traitement des cellules BEAS-2B avec des MWCNT conduit à une altération de la structure du fuseau mitotique notamment au niveau du nombre de centrosomes. Ce phénomène s'est traduit par l'apparition de mitoses anormales monopolaires et multipolaires (Siegrist *et al.*, 2014a). Par ailleurs, une augmentation du nombre des cellules binucléées ou multi-nucléées en lien avec un blocage fréquent de l'étape de la cytotélerèse a également été constaté dans des cellules pulmonaires traitées avec des MWCNT (Asakura *et al.*, 2010, Yasui *et al.*, 2015). L'analyse du nombre de chromosomes par hybridation *in situ* (FISH : *Fluorescence in situ hybridization*) a montré des erreurs dans les cellules exposées aux MWCNT (Siegrist *et al.*, 2014a). De même, des cassures et translocations de chromosomes et une aneuploïdie ont été observées dans les macrophages RAW264.7 après un traitement avec des MWCNT (Di Giorgio *et al.*, 2011). Des aberrations du nombre de chromosomes ont également été mises en évidence dans d'autres lignées de cellules pulmonaires (Asakura *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2012). Plusieurs études ont mis en avant l'apparition de micronoyaux suite au traitement de cellules avec des MWCNT accompagnées ou non de cassures de l'ADN simple ou double-brin (Cveticanin *et al.*, 2010, Migliore *et al.*, 2010, Kato *et al.*, 2013, Lindberg *et al.*, 2013, Tavares *et al.*, 2014, Visalli *et al.*, 2015, Louro *et al.*, 2016, Vales *et al.*, 2016). Il a été constaté que le Mitsui-7 provoquait une multiplication par 10 des cassures des brins d'ADN dans des macrophages (Aldieri *et al.*, 2013). Kisin *et al.* ont comparé en 2011 la génotoxicité des MWCNT et de l'amiante en utilisant la lignée cellulaire de macrophages RAW264.7 (Kisin *et al.*, 2011). Les résultats de cette étude ont permis d'établir que les MWCNT peuvent causer des dommages à l'ADN de deux manières : suite à la production de ROS ou *via* une interaction avec l'ADN lors de la division cellulaire (Kisin *et al.*, 2011). Or, une reconstruction tridimensionnelle a mis en évidence l'interaction des MWCNT avec les microtubules, l'ADN et les centrosomes (Siegrist *et al.*, 2014a). De plus, le traitement de petites cellules épithéliales bronchiques (SAEC) avec du Mitsui-7 a permis de mettre en évidence une interaction directe des MWCNT avec les cellules par internalisation et interactions avec la périphérie cellulaire (Snyder-Talkington *et al.*, 2013b). En 2015, Dong *et al.* appuient cette hypothèse et suggèrent une interaction des MWCNT avec les filaments du cytosquelette, tels que l'actine et la tubuline, ou avec l'ADN des cellules BEAS-2B (Dong and Ma, 2015). La mesure de la génotoxicité s'effectue également par la quantification des produits de bases de l'ADN endommagées par oxydation (8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine). Ces modifications ont été observées dans des cellules épithéliales bronchiques (Lindberg *et al.*, 2013) et des lignées de macrophages suite au traitement avec des MWCNT (Migliore *et al.*, 2010, Di Giorgio *et al.*, 2011). Les bases de

l'ADN oxydées peuvent être réparées mais peuvent aussi participer à l'instabilité génomique. Alors que des études ont montré la présence de micronoyaux et/ou de cassures de l'ADN, d'autres n'ont pas montré de tels dommages à l'ADN suite au traitement avec des MWCNT (Ponti *et al.*, 2013, Ju *et al.*, 2014, Catalan *et al.*, 2016). L'hétérogénéité des résultats peut être expliquée par le type de MWCNT, leur préparation, leur solubilité, la durée ou la concentration de traitement ainsi que le type cellulaire utilisé. La majorité des études menées *in vitro* mettent en évidence la capacité des MWCNT à augmenter la fréquence d'apparition des dommages chromosomiques, favorisant l'aneuploïdie.

*In vivo*, l'exposition de souris C57BL/6 par aspiration pharyngée de MWCNT a montré une augmentation dépendante de la dose des cassures de l'ADN dans les cellules pulmonaires et celles du LBA mesurées par le test des comètes (Catalan *et al.*, 2016). Des dommages à l'ADN ont été mis en évidence dans le foie et dans le sperme de souris exposées par gavage aux MWCNT (Fang *et al.*, 2018). L'exposition pulmonaire de souris aux MWCNT a montré une augmentation du nombre des cassures de l'ADN (Knudsen *et al.*, 2019). De plus, l'exposition de souris C57BL/6J par instillation intra-trachéale à des MWCNT a mis en évidence leur génotoxicité (Hadrup *et al.*, 2021). L'ensemble des résultats suggère un potentiel génotoxique *in vitro* et *in vivo* des MWCNT.

### 2.3. La biopersistance

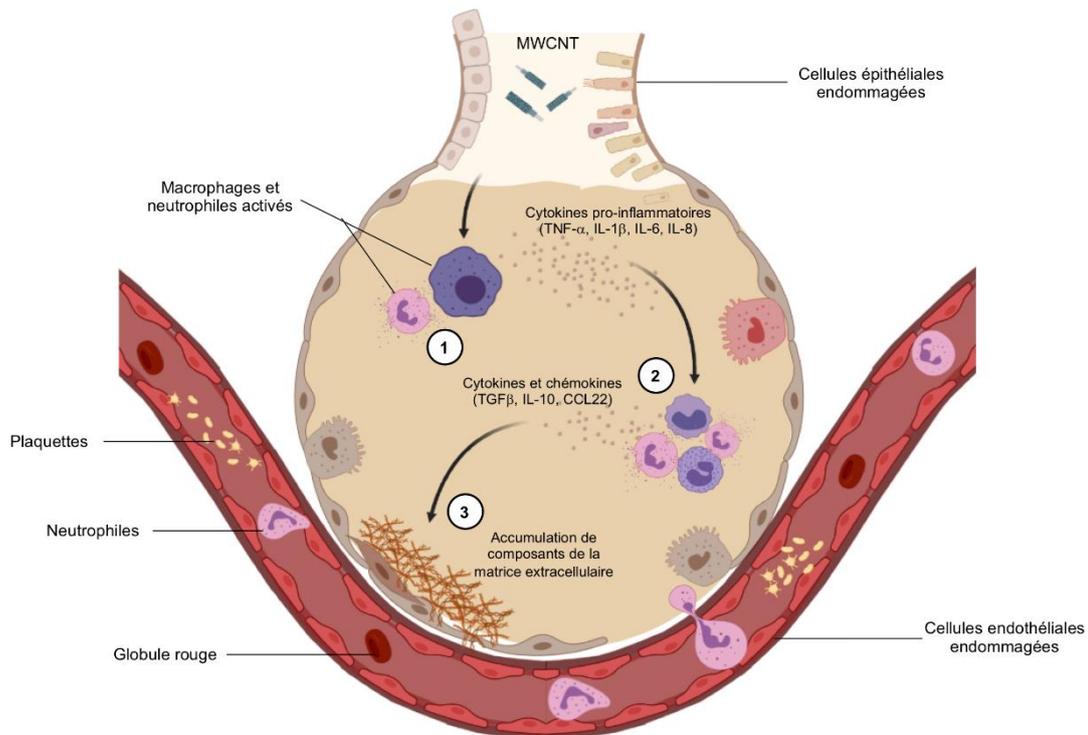
Les premiers mécanismes de défense tels que la clairance muco-ciliaire et l'inflammation aiguë permettent l'élimination d'une partie des MWCNT. Cependant, il est maintenant connu que les MWCNT ont une très longue durée de vie pulmonaire pouvant aller de quelques mois à plus d'une année (Shinohara *et al.*, 2016, Gate *et al.*, 2019). Mercer *et al.* ont réalisé en 2013 une étude portant sur la distribution des MWCNT après exposition par inhalation en corps entier de souris C57BL/6 au Mitsui-7 (Mercer *et al.*, 2013b). Le transport extra-pulmonaire des MWCNT a été mis en évidence par microscopie électronique. Bien que la majeure partie de la quantité des MWCNT déposée demeure dans les poumons, des MWCNT ont été retrouvés dans d'autres organes, majoritairement dans les ganglions lymphatiques (1-7% de la dose déposée), les muscles respiratoires, le foie et les reins (0,004-0,027%) et de manière moins fréquente dans le cœur et le cerveau sous forme de NTC isolés. Une fois entrés dans l'organisme, les MWCNT persistent, pour la plupart, dans les alvéoles pulmonaires et la plèvre. Dans ce sens, d'autres études ont montré la présence de MWCNT dans les macrophages alvéolaires et dans la plèvre

après exposition (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009, Donaldson *et al.*, 2013). Alors que les macrophages phagocytent les NTC pour les éliminer, ils migrent également *via* la circulation lymphatique vers les ganglions. De nombreuses études mettent en évidence la présence de macrophages alvéolaires ayant phagocyté des MWCNT à court et à plus long terme attestant de leur biopersistance (McPeck *et al.*, 2018, Knudsen *et al.*, 2019). D'autres MWCNT sont susceptibles de traverser la paroi alvéolaire et d'atteindre les organes distaux grâce à la circulation sanguine. Certaines études menées chez le rat et la souris ont montré une clairance réduite des MWCNT après exposition à des doses faibles (Pauluhn, 2010, Mercer *et al.*, 2013a). Une telle réduction du taux de clairance pulmonaire est importante car elle entraînerait une augmentation du taux de rétention pulmonaire et de la charge pulmonaire. Par exemple, la rétention des MWCNT a été estimée à 84-105 jours chez des rats exposés à 0,4 mg/m<sup>3</sup> de MWCNT. Dans cette même étude, le degré de dispersion des MWCNT a été corrélé au taux de clairance pulmonaire (Pauluhn, 2010). L'élimination des MWCNT serait plus rapide pour les mieux dispersés car ils seraient éliminés *via* le système lymphatique (Pauluhn and Rosenbruch, 2015). Une étude a également montré une rétention pulmonaire jusqu'à 364 jours après instillation de rats avec des MWCNT (Shinohara *et al.*, 2016). Par ailleurs, la rétention de MWCNT peut être due à une surcharge des macrophages ou à l'altération du mécanisme de phagocytose. En effet, il a été montré que des MWCNT très longs et rigides conduisent à la phagocytose frustrée, favorisant leur biopersistance. Ce mécanisme participe également à l'amplification de la réponse pro-inflammatoire induite par les MWCNT (Murphy *et al.*, 2012, Sweeney *et al.*, 2015). Du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques et de leur biopersistance, des recherches toxicologiques ont montré que l'hypothèse du paradigme des fibres qui énonce que « toute fibre dont la longueur est supérieure à 8 µm et dont le diamètre est inférieur à 0,025 µm a un potentiel cancérigène élevé » peut être appliquée aux MWCNT (Stanton *et al.*, 1981).

#### 2.4. L'inflammation chronique

La biopersistance des MWCNT dans l'organisme aurait pour conséquence la mise en place d'une réponse inflammatoire chronique. Cette dernière se traduit par l'activation des systèmes de reconnaissance et de défense immunitaire plus importants. L'activation de lymphocytes Th2 et la libération de cytokines de type 2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 stimulent l'activation et la polarisation des macrophages M2 qui sécrètent des cytokines, des chimiokines et des médiateurs de type 2, comme le TGF-β1, l'IL-10, la CCL17, la CCL18 et la CCL22. Ces

événements permettent d'initier des cascades de voies de signalisation afin de réguler la réponse inflammatoire. Les cellules effectrices orchestrent et coordonnent la réponse immunitaire innée et adaptative afin de résorber l'inflammation et promouvoir la réparation tissulaire (Figure 10).



**Figure 10 : L'inflammation chronique induite par les nanotubes de carbone.**

(1) La réponse de l'organisme lors de l'intrusion de NTC dans les alvéoles pulmonaires se traduit tout d'abord par la mise en place d'une réponse inflammatoire aiguë. Elle comprend un influx de neutrophiles et de macrophages, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de l'inflammasome NLRP3. (2) La biopersistance des NTC favorise la mise en place d'une réponse inflammatoire chronique. Elle se traduit par la sécrétion de cytokines et chimiokines ainsi que des lésions épithéliales. (3) Ces événements ont pour conséquence une accumulation d'éléments de la matrice extracellulaire, la promotion de la réparation tissulaire et le développement de granulomes (Réalisé avec © BioRender 2021).

L'exposition d'animaux à la dose de  $0,1 \text{ mg/m}^3$  et  $0,25 \text{ mg/m}^3$ , correspondant, respectivement, à la dose la plus basse sans effet nocif (LOAEL) et à la dose sans effet nocif (NOEL), a montré que les MWCNT sont responsables de l'induction d'une inflammation chronique à de faibles doses (Shvedova *et al.*, 2008, Ma-Hock *et al.*, 2009, Pauluhn, 2010, Kasai *et al.*, 2015). Les analyses histopathologiques des poumons des animaux exposés aux MWCNT révèlent de façon récurrente le développement de granulomes, signe de défense immunitaire (Muller *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2010, Pacheco *et al.*, 2018, Thompson *et al.*, 2018, Knudsen *et al.*, 2019). Ces structures résultent d'une accumulation de macrophages et de lymphocytes. Elles apparaissent à plus long terme et sont la conséquence d'une inflammation chronique. De façon générale, l'exposition d'animaux par inhalation, instillation intra-trachéale, aspiration pharyngée ou

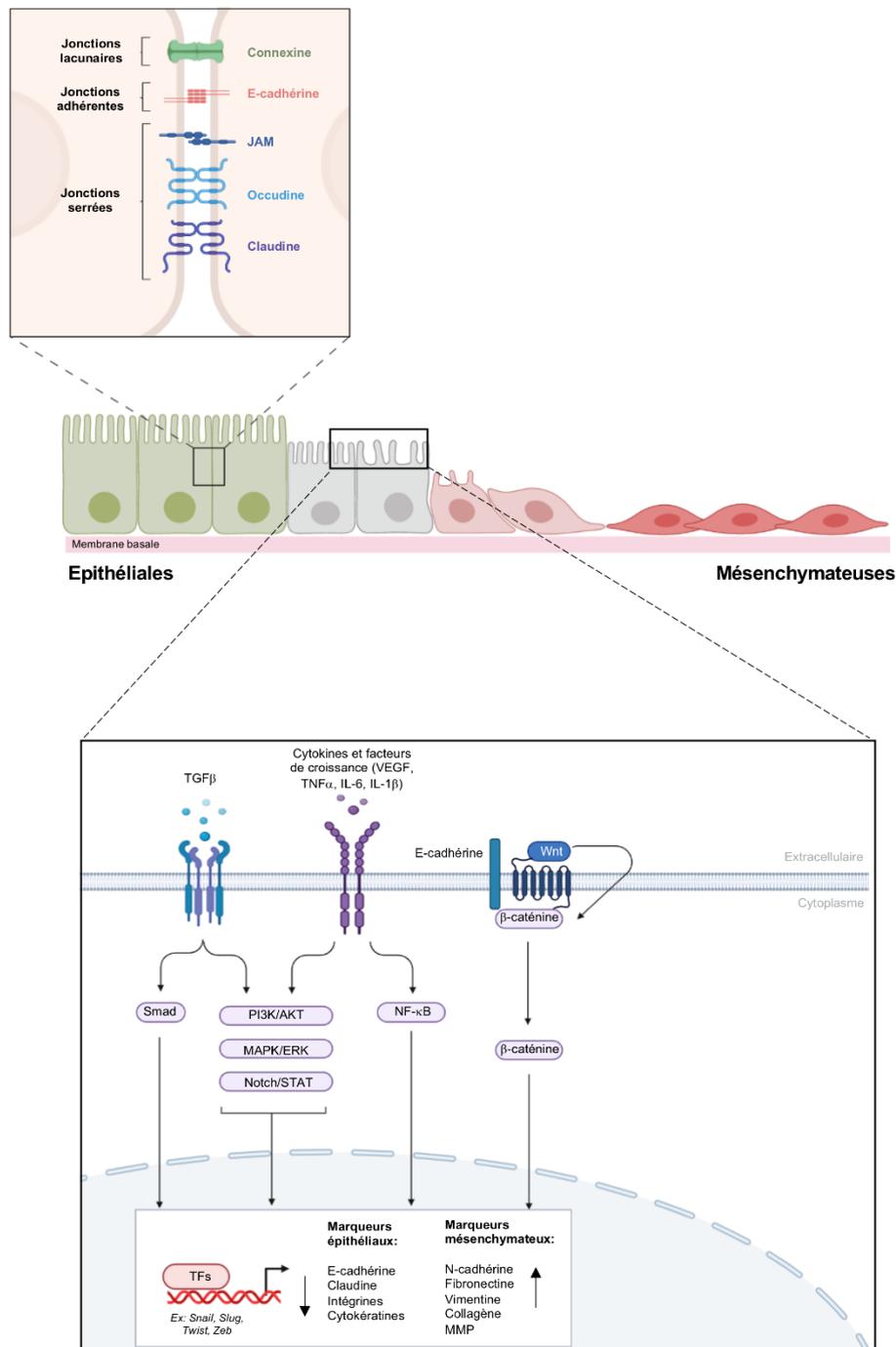
injection intra-péritonéale est responsable de l'induction d'une réponse inflammatoire, d'hypertrophie bronchiale et alvéolaire et de la formation de granulomes (Porter *et al.*, 2010, Poulsen *et al.*, 2015, Poulsen *et al.*, 2016, Thompson *et al.*, 2018, Gate *et al.*, 2019, Knudsen *et al.*, 2019). La phagocytose frustrée participe également à l'amplification de la réponse pro-inflammatoire chronique (Murphy *et al.*, 2012, Sweeney *et al.*, 2014). En effet, l'incapacité des macrophages à phagocyter entièrement les particules conduit à leur mort et au relargage de signaux pro-inflammatoires dans l'alvéole et une boucle d'amplification se met en place (Murphy *et al.*, 2012, Halappanavar *et al.*, 2020). Il est important de noter qu'une inflammation à court terme est souvent observée après l'inhalation de particules. Cependant, si l'inflammation persiste et devient chronique, elle peut conduire au développement de pathologies comme la fibrose ou le développement de tumeurs (Song *et al.*, 2016).

### 3. La transition épithélio-mésenchymateuse

#### 3.1. Processus physiologique

Les cellules épithéliales forment une mono-couche de cellules adjacentes dont la structure comprend des jonctions serrées, adhérentes, des desmosomes ainsi que des jonctions lacunaires. De plus, la polarisation du cytosquelette, la distribution de protéines d'adhésion telles que les cadhérines et les intégrines, les jonctions intercellulaires et la présence d'une lame basale confèrent aux cellules épithéliales une polarité apico-basale et une mobilité réduite (Kalluri and Weinberg, 2009, Thiery *et al.*, 2009). Les cellules de phénotype mésenchymateux, quant à elles, ne forment pas de couche cellulaire organisée. Elles présentent peu de jonctions avec les cellules voisines, n'ont pas de lame basale ni de polarité cellulaire, ce qui leur permet d'être plus mobiles (Thiery *et al.*, 2009). Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses ont une morphologie fibroblastique (Thiery *et al.*, 2009). La transition épithélio-mésenchymateuse (*epithelial-mesenchymal transition* EMT) est un processus dynamique et progressif au cours duquel les cellules épithéliales perdent leur phénotype et acquièrent de nouvelles propriétés caractéristiques des cellules mésenchymateuses. Il s'agit d'un mécanisme indispensable lors de l'embryogenèse et la morphogénèse. La plasticité cellulaire permet l'organisation et le développement de l'embryon. En effet, l'EMT intervient aux étapes de gastrulation, lors de la formation de la crête neurale et participe à la formation des différents organes tels que le pancréas et le cœur. Chez l'adulte, l'EMT est également activée en tant que réponse physiologique à une blessure, les cellules prolifèrent et migrent

jusqu'à la blessure afin de participer à la reconstruction tissulaire (Kalluri and Weinberg, 2009, Thiery *et al.*, 2009). À l'échelle moléculaire, l'induction de l'EMT implique des modifications d'expression de gènes permettant une conversion progressive du phénotype épithélial. Les cellules épithéliales expriment des protéines telles que la E-cadhérine, la Claudine-1 et des intégrines, garantes de leur phénotype. Cependant, la présence de cytokines pro-inflammatoires ou de facteurs de croissance dans l'environnement cellulaire est responsable de l'induction des cascades de signalisation induisant l'EMT (Figure 11). La partie cytoplasmique de la E-cadhérine contient un site de séquestration de la  $\beta$ -caténine, qui, lorsqu'elle est séquestrée, permet le maintien du phénotype épithélial. Au contraire, lorsque la  $\beta$ -caténine n'est pas séquestrée, elle se re-localise dans le noyau et participe à l'activation de l'EMT (Kim *et al.*, 2002). Il a été montré que les facteurs de croissance PDGF, EGF et TGF $\beta$  peuvent conduire à la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine, suite à l'activation de la voie Wnt ou à l'endocytose de la E-cadhérine (Lu *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2006). Les facteurs de croissance peuvent aussi activer les voies de signalisation ERK, NF- $\kappa$ B, SMAD2/3, PI3K/AKT, Notch et la voie des MAPK (Yang *et al.*, 2006, Gonzalez and Medici, 2014). Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 sont susceptibles d'activer les voies STAT/SNA1 et les composants de la matrice extracellulaire comme le collagène et l'acide hyaluronique sont également capables d'activer ces voies de signalisation (Tse and Kalluri, 2007, Tzanakakis *et al.*, 2018). L'ensemble de ces voies de signalisation sont responsables de l'expression des facteurs de transcription Snail, Zeb et Twist qui orchestrent la progression de l'EMT (Medici *et al.*, 2008, Yang and Wu, 2008, Thiery *et al.*, 2009). Or, ces derniers répriment la transcription de la E-cadhérine, qui est un événement fondamental de l'EMT (Lo *et al.*, 2007, Peinado *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2008, Yang and Wu, 2008). Ainsi, les cellules progressent vers l'état mésenchymateux en perdant leurs traits épithéliaux, avec une accumulation de  $\beta$ -caténine dans le noyau et une modification de l'expression des gènes. En conséquence, les jonctions cellulaires sont désorganisées suite à l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par Snail (Stemmer *et al.*, 2008) conduisant à la perte de la polarité apico-basale (Whiteman *et al.*, 2008). La membrane basale est dégradée par les métalloprotéases (MMP) dont l'expression est induite par Snail et Zeb (Scott *et al.*, 2019). Parallèlement, ces facteurs de transcription sont responsables de l'induction de l'expression de gènes associés à l'état mésenchymateux : la N-cadhérine, la vimentine, la fibronectine, les intégrines- $\beta$ 1 et  $\beta$ 3 et des MMP. Les cellules mésenchymateuses présentent un cytosquelette profondément réorganisé et expriment un ensemble de facteurs de transcription (ex : Zeb, Snail, Twist) qui favorisent et maintiennent cet état.



**Figure 11 : La transition épithélio-mésenchymateuse.**

Les cellules épithéliales possèdent des jonctions cellulaires leur permettant de se lier entre elles ainsi qu'avec la lame basale afin de former une monocouche. Elles expriment principalement les protéines E-cadhérine et claudines garantes du phénotype épithélial. L'EMT est un processus progressif induit par la présence de facteurs de croissance (ex : TGF $\beta$ ) et de cytokines pro-inflammatoires (ex : TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6). Ces molécules sont responsables de l'activation de voies de signalisation telles que Smad, PI3K/AKT, MAPK/ERK, Notch et NF- $\kappa$ B qui stimulent l'expression de facteurs de transcription responsables de la baisse d'expression de marqueurs épithéliaux et de l'augmentation de marqueurs mésenchymateux. La voie  $\beta$ -caténine est également impliquée dans l'activation de l'EMT *via* la E-cadhérine. Sa translocation dans le noyau permet l'expression de facteurs de transcription. MMP : métalloprotéases matricielles. (Adapté de Gonzalez et Medici, 2014, réalisé avec © BioRender 2021).

Plusieurs études supportent l'implication de l'EMT dans la réponse induite par les MWCNT. Polimeni *et al.* ont mis en évidence que le traitement de cellules BEAS-2B à des concentrations croissantes de MWCNT est responsable de la sécrétion de TGF $\beta$  et l'induction de l'EMT par l'activation de la voie Akt/GSK-3 $\beta$  et Snail-1 (Polimeni *et al.*, 2016). En 2017, Pacurari *et al.* ont mis en évidence l'induction de l'EMT par le TGF $\beta$  et la voie NF- $\kappa$ B (Pacurari *et al.*, 2017). En 2019, Chen *et al.* ont montré que le traitement de cellules BEAS-2B avec des MWCNT est responsable de l'induction de l'EMT par la voie de signalisation TGF $\beta$ 1/Smad (Chen *et al.*, 2019). En 2021, Zhang *et al.* ont confirmé ces observations et indiquent l'activation de macrophages M2 et de l'EMT *via* le TGF $\beta$  (Zhang *et al.*, 2021). De même, le traitement des cellules BEAS-2B avec du Mitsui-7 a été responsable d'une augmentation du TGF $\beta$ 1, du récepteur TGF- $\beta$ R1 et de l'activation de la voie Smad2/3 ayant pour conséquence une augmentation du collagène et l'activation de l'EMT (Mishra *et al.*, 2015). Parallèlement, le traitement de cellules BALB3T3 avec le NM-400 ou le NM-402 a été montré comme stimulant la prolifération des fibroblastes par l'activation de la voie ERK1/2 induite par le PDGF et TGF $\beta$  (Vietti *et al.*, 2016). Les études portant sur les effets des MWCNT *in vitro* ont été répertoriées dans l'Annexe 3.

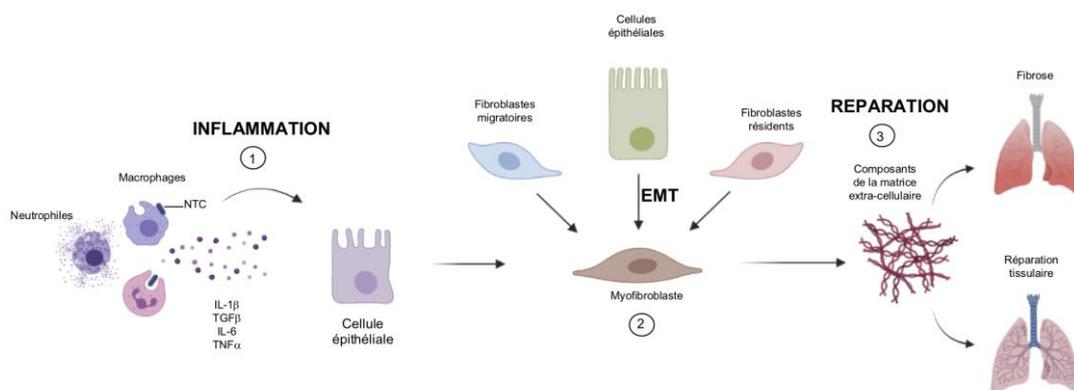
### 3.2. L'EMT, processus pathologique

Les différentes fonctions de l'EMT ont donné lieu à son classement en trois catégories. L'EMT de type 1 est induite lors de l'embryogenèse et le développement d'organes. L'EMT de type 2 est associée au processus de cicatrisation et à la régénération tissulaire. Ce type d'EMT est associée à l'inflammation et s'arrête lorsque l'inflammation est résorbée. Dans le cas d'inflammation persistante, l'EMT de type 2 contribue à la formation de fibrose. Enfin, l'EMT de type 3 a lieu dans les cellules néoplasiques présentant déjà des altérations génétiques. Lors de l'EMT de type 3, les cellules sont capables de produire des métastases et d'envahir des tissus (Kalluri and Weinberg, 2009).

#### 3.2.1. L'EMT et le développement de fibrose pulmonaire

La fibrose pulmonaire résulte de la transformation du parenchyme pulmonaire en tissu fibreux. Ainsi, le tissu normal est progressivement remplacé par du tissu cicatriciel, les parois des alvéoles s'épaississent ce qui provoque une diminution de la capacité de diffusion de l'oxygène. Cette pathologie est responsable de signes cliniques chroniques tels que la dyspnée, la toux et

l'asthénie. À l'échelle cellulaire, la pathologie se développe principalement dans les tissus épithéliaux, elle est caractérisée par une prolifération de myofibroblastes et un dépôt de matières de la matrice extracellulaire. Le système immunitaire, et plus particulièrement l'inflammation, joue un rôle central dans le développement de cette pathologie. Elle est médiée par des cellules inflammatoires et des fibroblastes qui libèrent des signaux pro-inflammatoires, des facteurs de croissance ainsi que des composants de la matrice extracellulaire. En effet, lors d'une inflammation les macrophages et les fibroblastes résidents s'accumulent au site de blessure et sécrètent des facteurs de croissance, des chimiokines et des MMP (MMP-2, MMP-3, MMP-9). La réponse inflammatoire conduit à une altération de la membrane basale et à une dégradation des collagènes (Figure 12). Les cellules épithéliales migrent ensuite vers la zone interstitielle sous l'influence de facteurs de croissance. Les cytokines pro-inflammatoires et les facteurs de croissance précédemment décrits sont également responsables de l'induction de l'EMT dont on connaît l'implication dans la réparation tissulaire. L'EMT a d'ailleurs été mise en évidence dans des cellules épithéliales alvéolaires provenant des biopsies de patients atteints de fibrose (Willis *et al.*, 2005). Étant un processus dynamique et progressif, les cellules qui subissent une EMT sont susceptibles de présenter des marqueurs épithéliaux et à la fois mésenchymateux lors d'une inflammation chronique (Salton *et al.*, 2019). Dans la littérature, des marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine et la desmine ont été utilisés pour identifier les cellules épithéliales en transition suite à une inflammation chronique (Hol and Capetanaki, 2017).



**Figure 12 : Le rôle de l'EMT dans le développement de fibrose.**

(1) La présence de NTC dans les alvéoles pulmonaires est responsable de la mise en place d'une réponse inflammatoire aiguë puis chronique. Le recrutement de cellules immunitaires au point d'inflammation induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance tels qu'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  et TGF $\beta$ . (2) La présence de ces messagers chimiques stimule la migration des fibroblastes, la prolifération des fibroblastes résidents ainsi que la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses par l'activation de l'EMT. (3) La lésion tissulaire induite par l'inflammation conduit à l'accumulation de composants de la matrice extracellulaire et à l'accumulation de fibroblastes. En conséquence, la lésion tissulaire peut être résorbée ou évoluer en fibrose pulmonaire (Adapté de Wynn *et al.*, 2011, réalisé avec © BioRender 2021).

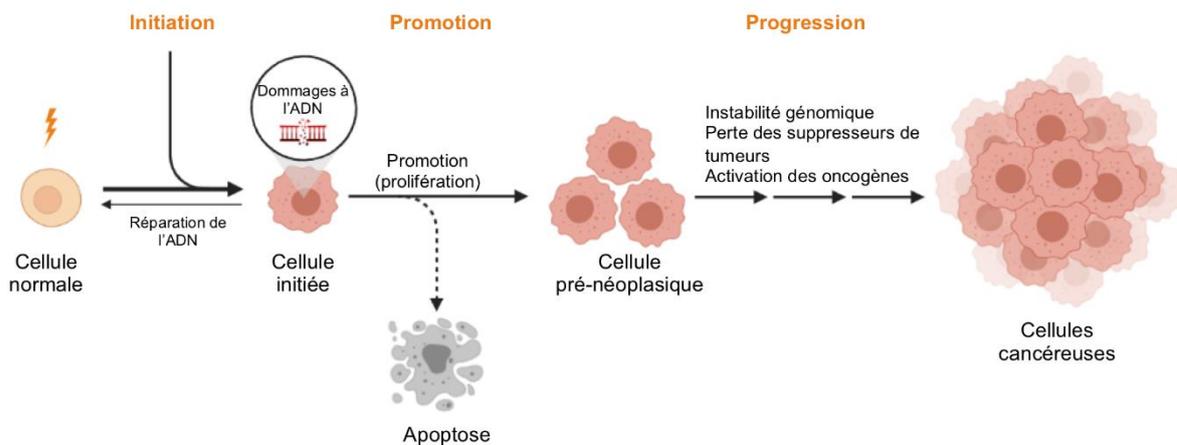
Des études *in vitro* mettent en évidence des mécanismes impliqués dans l'induction de l'EMT et le développement de fibrose suite au traitement des cellules avec des MWCNT. Parmi ces mécanismes, l'activation de fibroblastes par la libération de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques et la production de collagène des fibroblastes participent au développement de fibrose (He *et al.*, 2011, Meng *et al.*, 2015, Vietti *et al.*, 2016, Chortarea *et al.*, 2017, Liao *et al.*, 2018). *In vivo*, l'instillation intra-trachéale de MWCNT a induit le développement de fibrose à court (Porter *et al.*, 2013, Sos Poulsen *et al.*, 2013, Dong *et al.*, 2015) ou à plus long terme (Muller *et al.*, 2005, Aiso *et al.*, 2010, Mercer *et al.*, 2013a, Chen *et al.*, 2014) dans les poumons de rat et/ou de souris. L'exposition de souris C57BL/6N à des MWCNT de propriétés physico-chimiques différentes a montré une réponse inflammatoire, une biopersistance ainsi que la formation de granulomes et le développement de fibrose, 1 an après l'exposition (Dymacek *et al.*, 2018, Knudsen *et al.*, 2019). La réponse d'une exposition aux MWCNT est marquée par le développement de fibroses pulmonaires ou pleurales (Snyder-Talkington *et al.*, 2016a, Rahman *et al.*, 2017, Dymacek *et al.*, 2018).

### 3.2.2. L'EMT et le développement de cancer

#### 3.2.2.1. Cancer, généralités

Le cancer est une pathologie complexe dont la variabilité inter-individuelle et l'environnement jouent un rôle essentiel. Les cancers représentent, en France, la première cause de mortalité chez les hommes et la deuxième cause chez les femmes. Le cancer des poumons est le cancer ayant la plus forte incidence (The global cancer observatory, March 2019). En absence de méthode de dépistage pour la détection précoce du cancer du poumon, la maladie est diagnostiquée tardivement, à un stade avancé, lorsqu'elle est résistante aux thérapies. Il représente 18,4% des décès liés au cancer et constitue la 1<sup>ère</sup> cause de décès suite à cette pathologie. Décrite comme une pathologie progressive, le cancer apparaît à travers un processus multi-étapes au cours duquel des cellules saines acquièrent un phénotype néoplasique : la cancérogenèse. Elle se décompose en 3 phases qui surviennent chronologiquement et constituent une vision simplifiée de son développement (Figure 13). L'initiation constitue la première phase pendant laquelle un agent induit des mutations génétiques dans un ou plusieurs gènes contrôlant les principales voies de régulations cellulaires. Ces altérations génétiques peuvent être des mutations ponctuelles ou des aberrations chromosomiques entraînant une aneuploïdie. La persistance de telles modifications peut être attribuée à l'échec des mécanismes

de réparation de l'ADN. De cette manière, les cancérogènes initient les cellules par une activation des voies prolifératives, l'inactivation des voies apoptotiques, des mécanismes de réparation de l'ADN et de la réponse anti-oxydante. Le processus de cancérogenèse se poursuit par une étape de promotion pendant laquelle les cellules initiées se multiplient indépendamment des facteurs de croissance présents dans le milieu extérieur et forment un foyer de cellules pré-néoplasiques (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013).

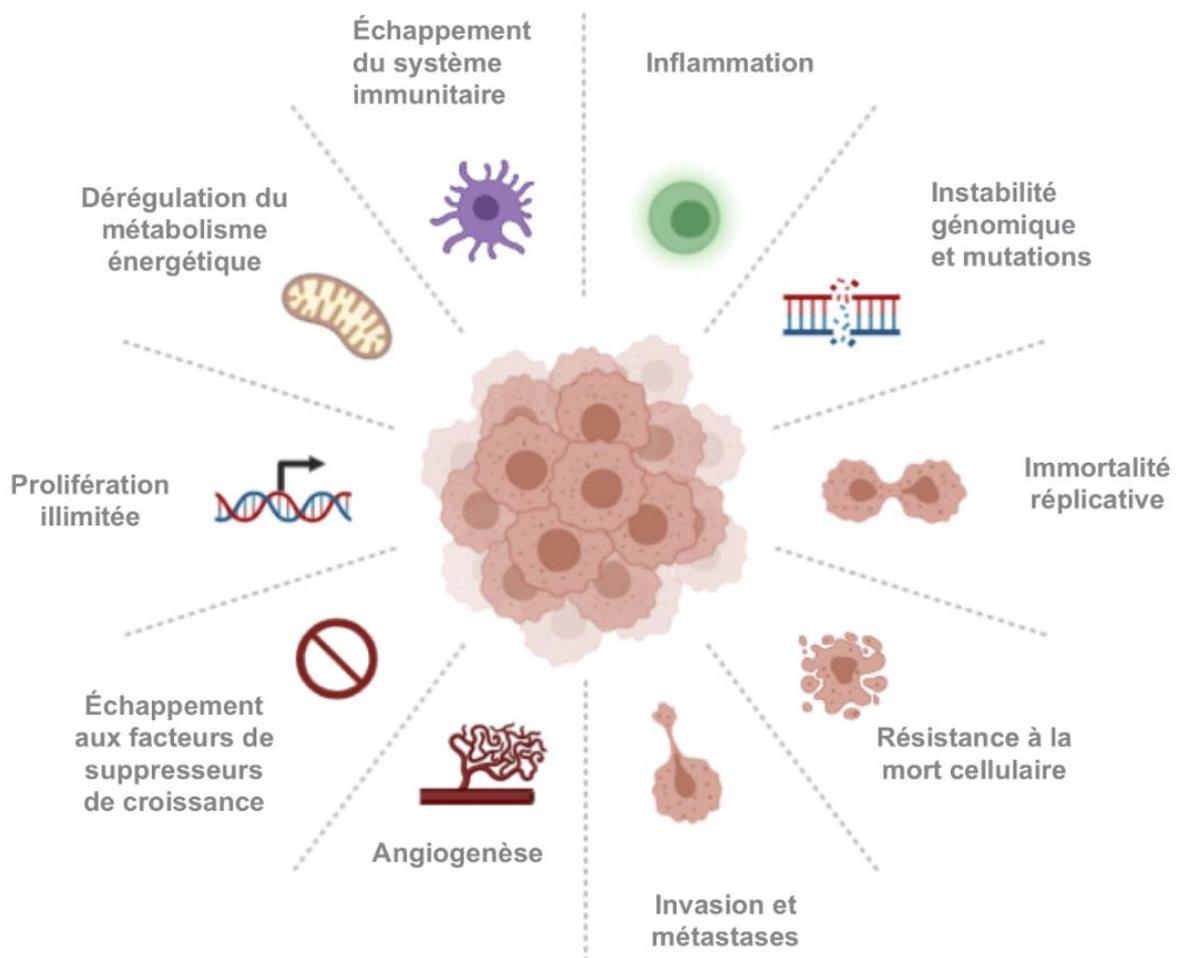


**Figure 13 : Les étapes de la cancérogenèse.**

Le schéma représente les différentes étapes de la cancérogenèse. Ce modèle débute par une première phase d'initiation pendant laquelle la cellule subit des mutations de l'ADN qui sont amenées à être corrigées plus ou moins efficacement par les mécanismes de réparation de l'ADN. La cellule ayant acquis des mutations génétiques susceptibles de modifier son comportement en faveur du développement d'un cancer est appelée cellule initiée. La cellule peut ensuite mourir par apoptose ou survivre et progresser dans le processus cancérogenèse. En effet, le modèle se poursuit par une phase de promotion pendant laquelle les cellules initiées prolifèrent de façon anarchique et continuent d'acquérir des modifications génétiques jusqu'à l'aboutissement de cellules pré-néoplasiques ou pré-cancéreuses. Leur instabilité génomique conduit à la perte des suppresseurs de tumeurs et à l'activation des oncogènes qui favorisent le développement de cellules cancéreuses (Réalisation avec © BioRender 2021).

Lorsqu'une cellule devient cancéreuse, elle acquiert des propriétés caractéristiques qui sont considérées comme des marqueurs de cancérogenèse. Ces marqueurs permettent de rationaliser cette pathologie néoplasique complexe (Figure 14). Une cellule cancéreuse, ou néoplasique, est une cellule dont la prolifération est indépendante des facteurs de croissance présents dans le milieu extracellulaire. Son fonctionnement métabolique indépendant permet l'apport de l'énergie nécessaire au maintien d'un taux de prolifération élevé (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces cellules anormales échappent aux systèmes de contrôle établis, et sont capables de déréguler des signaux intra- et extracellulaires en faveur de leur prolifération. En plus des facteurs de croissance, la présence de mutations somatiques peut être à l'origine d'altérations

du contrôle de la prolifération. Pour maintenir sa prolifération, la cellule doit également contourner les mécanismes antiprolifératifs. La cellule cancéreuse est insensible aux inhibiteurs de croissance présents dans son environnement. Dans les cellules cancéreuses, les facteurs de croissance sont détournés en faveur de l'activation de l'EMT, processus associé à des cancers à haute malignité (Tiwari *et al.*, 2012). Outre cette insensibilité, la cellule résiste aux mécanismes de mort cellulaire programmée. Parmi ces derniers, l'apoptose a pour but d'éliminer les cellules aberrantes qui pourraient porter atteinte à l'intégrité de l'organisme. En condition normale, la cellule qui subit un stress ou qui ne parvient pas à répliquer son ADN de manière exacte entre en apoptose. En plus de leur résistance à l'apoptose, les cellules cancéreuses peuvent devenir immortelles de par leurs séquences télomériques.



**Figure 14 : Les marqueurs du cancer.**

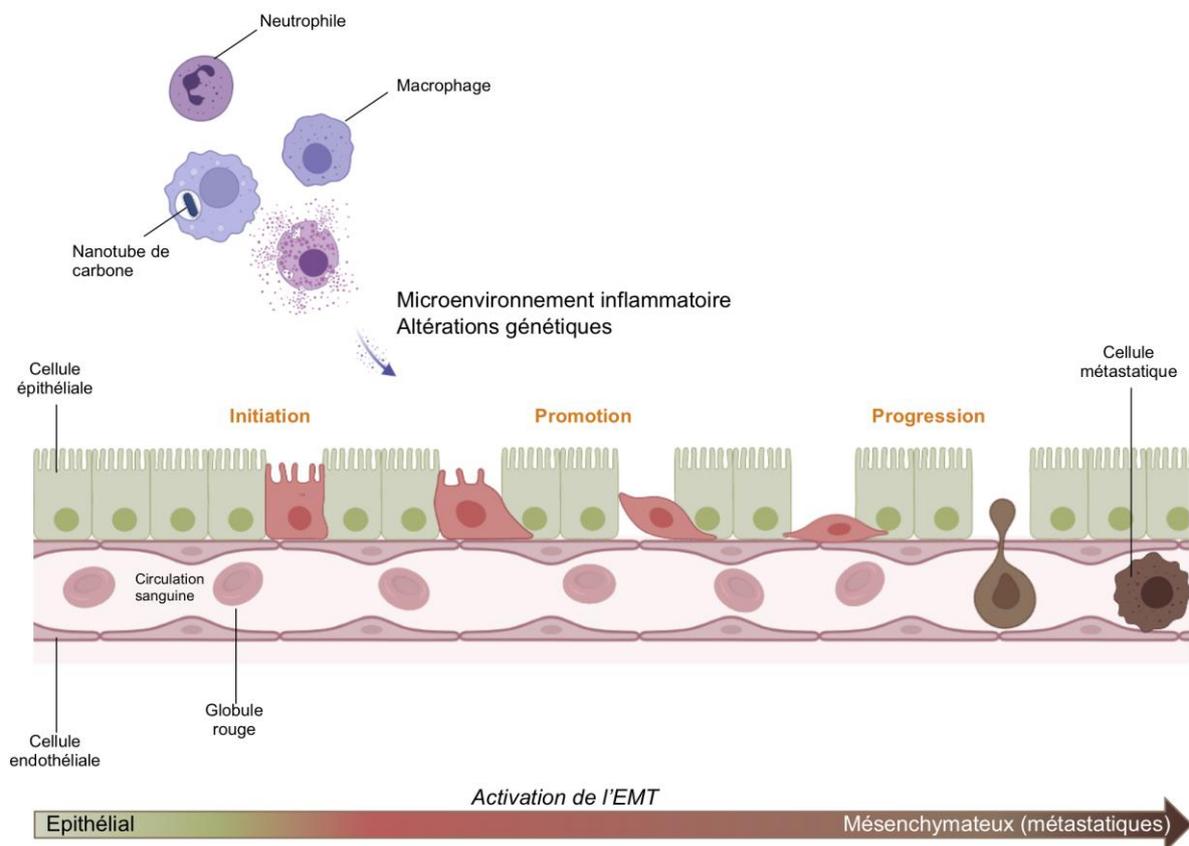
Les marqueurs de la cancérogenèse caractérisent la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Ils constituent des éléments solides pour la compréhension biologique du cancer (Adapté de Hanahan et Weinberg, 2011, réalisé avec © BioRender 2021).

Alors que l'angiogenèse est un phénomène physiologique activé lors d'une reconstruction tissulaire, il est également actif au sein des tumeurs, permettant une néo-vascularisation importante. Tout comme un tissu sain, une tumeur a également besoin d'apport en nutriments et en oxygène mais aussi de l'évacuation des déchets métaboliques et du CO<sub>2</sub>. Ce phénomène favorise la croissance tumorale et l'apport des nutriments nécessaire à la prolifération des cellules. Cependant, la vascularisation tumorale est réalisée de manière anarchique et présente de nombreux défauts (Hanahan and Weinberg, 2011).

Comme précédemment mentionné, l'EMT consiste en une conversion qui implique des modifications phénotypiques profondes, notamment la perte d'adhésion cellule-cellule, la perte de la polarité cellulaire et l'acquisition de propriétés migratoires et invasives. De façon intéressante, la majorité des voies de signalisation impliquées au cours du processus embryonnaire sont également des voies connues pour être activées lors de la progression tumorale. C'est notamment le cas des voies Wnt et Notch ainsi que les voies induites par les facteurs de croissance [ex : HGF, EGF, PDGF, et TGF- $\beta$  (Peinado *et al.*, 2004)]. Les cellules cancéreuses présentent des capacités invasives et migratoires qui leur permettent de produire des métastases et des tumeurs secondaires. L'activation de l'EMT a été proposée comme un mécanisme clé du développement des cancers malins provenant de cellules épithéliales [(Hao *et al.*, 2019)(Figure 15)]. En effet, les cellules de carcinomes peuvent présenter un phénotype mésenchymateux et exprimer des marqueurs caractéristiques tels que l' $\alpha$ -SMA (*alpha-smooth muscle actin*), la FSP1 (*fibroblast-specific protein 1*), la vimentine et la desmine (Yang and Weinberg, 2008). Ces cellules sont capables d'intravasation, de transport dans la circulation puis de colonisation d'autres tissus.

L'expression constitutive d'inducteurs de l'EMT peut ainsi maintenir un phénotype mésenchymateux et invasif tout en permettant la survie des cellules métastatiques par la suppression des mécanismes de mort cellulaire. En effet, les facteurs de transcription Twist1 et Twist2 impliqués dans l'EMT préviennent la mort cellulaire induite par les protéines p16 et p21 (Ansieau *et al.*, 2008). De plus, ces facteurs de transcription coopèrent avec l'activation de la protéine Ras pour activer les voies de l'EMT et promouvoir l'invasion. L'expression d'inducteurs de l'EMT confère également aux cellules tumorales la capacité d'échapper au système immunitaire (Kudo-Saito *et al.*, 2009). Parallèlement, de plus en plus d'études relient le microenvironnement inflammatoire et l'EMT (Lopez-Novoa and Nieto, 2009). En effet,

l'inflammation a pour effet l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B qui est responsable de l'augmentation de l'expression des inducteurs de l'EMT, et plus particulièrement de Snail (Julien *et al.*, 2007, Strippoli *et al.*, 2008) suggérant l'implication de l'EMT a un autre niveau de régulation du processus de cancérogenèse. Enfin, pendant la progression du carcinome, Snail1 est exprimé au début de la transition, tandis que les facteurs de transcription Snail2, Zeb et Twist permettent ensuite de maintenir l'état mésenchymateux et invasif (Peinado *et al.*, 2007). À ce titre, Snail1 et Snail2 coopèrent dans la croissance de tumeurs primaires et dans la formation de métastases, d'autant plus que Snail1 induit l'expression de Zeb (Beltran *et al.*, 2008, Olmeda *et al.*, 2008).



**Figure 15 : Rôle de l'EMT dans le développement des métastases.**

Les cellules subissent d'abord la pression du microenvironnement inflammatoire et l'accumulation d'altérations génétiques. Elles franchissent les étapes d'initiation et de promotion avant de former des métastases. C'est à cette étape qu'intervient l'EMT. Elle confère aux cellules épithéliales des propriétés mésenchymateuses permettant la migration et l'extravasation des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine et leur dissémination dans l'organisme (Adapté de Nieto *et al.*, 2016, réalisé avec © BioRender 2021).

### 3.2.2.2. Nanotubes de carbone et cancer

L'inflammation persistante, le stress oxydatif, les lésions épithéliales ou mésothéliales, la prolifération cellulaire et la génotoxicité sont considérés comme des événements clés menant au développement du cancer du poumon et du mésothéliome suite à une exposition à des particules (Weiner and Neragi-Miandoab, 2009, Andujar *et al.*, 2016, Korchevskiy *et al.*, 2019). L'inflammation est une réponse de l'organisme suite au traitement avec un MWCNT. Cependant, l'inflammation semble persister à des temps plus longs après l'exposition, or l'inflammation chronique est reconnue comme étant le point de départ de différents types de cancers (Multhoff *et al.*, 2011, Greten and Grivennikov, 2019).

Il a été montré qu'une seule injection intrapéritonéale de MWCNT a été suffisante pour observer le développement de mésothéliomes chez des souris p53<sup>+/-</sup> après 1-2 années d'exposition (Takagi *et al.*, 2008, Nagai *et al.*, 2011, Rittinghausen *et al.*, 2014). Dans une autre étude, il a été démontré que l'inhalation de Mitsui-7 a induit de façon dépendante de la dose l'apparition de mésothéliomes chez ces mêmes animaux (Takagi *et al.*, 2012). Le potentiel cancérigène des MWCNT a également été mis en évidence par Sargent *et al.* en 2014 (Sargent *et al.*, 2014). Dans cette étude, des souris ont été préalablement exposées à du méthylcholanthrène, un agent chimique initiateur de tumeurs, puis exposées par inhalation aux MWCNT pendant une durée de 2 ans. Les résultats témoignent de l'effet cancérigène du Mitsui-7, en effet 90% des souris ont développé des adénocarcinomes broncho-alvéolaires (Sargent *et al.*, 2014). De même, Kasai *et al.* ont mis en évidence en 2016 que l'inhalation de Mitsui-7 entraîne le développement de cancers pulmonaires et de tumeurs broncho-alvéolaires (Kasai *et al.*, 2016). À travers ces études, la charge pulmonaire correspondant à la quantité de MWCNT déposée dans les poumons semble être un paramètre crucial. L'exposition de rats au Mitsui-7 par pulvérisation intra-pulmonaire réalisée par Suzui *et al.* en 2016 a mis en évidence la persistance des MWCNT dans les macrophages au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques ainsi que le développement de mésothéliomes malins et de tumeurs broncho-alvéolaires 2 ans après exposition (Suzui *et al.*, 2016). Les tumeurs se sont développées à l'endroit où ont été déposés les MWCNT. En 2016, Snyder-Talkington *et al.* ont également mis en évidence la régulation positive de gènes marqueurs du développement tumoral chez des souris exposées au Mitsui-7 (Snyder-Talkington *et al.*, 2016a). Les études de séquençage ont permis de déterminer qu'à de faibles doses de MWCNT, les gènes fréquemment dérégulés contrôlent le cycle cellulaire, la division cellulaire, les microtubules et l'assemblage des

nucléosomes. À forte dose, les gènes dérégulés contrôlent l'angiogenèse, la croissance et la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et les processus métaboliques (Snyder-Talkington *et al.*, 2016b).

Parallèlement, le test de transformation *in vitro*, ou test de colonies, permet d'évaluer la capacité d'indépendance d'ancrage des cellules traitées de façon chronique aux MWCNT. Siegrist *et al.* ont mis en évidence en 2014, par un test de transformation et un traitement aux MWCNT, que ces derniers sont faiblement transformant à la concentration de 0,024  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Siegrist *et al.*, 2014a). La même année, Wang *et al.* ont également mis en place un test de transformation avec à un traitement de 6 mois à la concentration de 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ce dernier a révélé que le Mitsui-7 induit une transformation de cellules saines en cellules pré-néoplasiques (Wang *et al.*, 2014b). Enfin, en 2017, Phuyal *et al.* ont mis en évidence le potentiel transformant du NM-400, dans une lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine HBEC-3KT (Phuyal *et al.*, 2017). De même, Vales *et al.* ont mis en évidence le potentiel transformant du NM-403 après 4 semaines de traitement et 2 semaines de culture en gélose molle avant l'observation de colonies (Vales *et al.*, 2016). La transformation cellulaire a également été mis en évidence dans des cellules traitées avec des MWCNT fonctionnalisés (Stueckle *et al.*, 2017, Huang *et al.*, 2020). L'analyse transcriptomique du profil d'expression des gènes des cellules traitées révèle une altération des biomarqueurs de dommages pulmonaires, de la cancérogenèse et de la progression tumorale ainsi que des voies de signalisation NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT3, p38 impliquées dans ces mécanismes pathologiques (Ravichandran *et al.*, 2010, He *et al.*, 2011, Snyder-Talkington *et al.*, 2013a, Huang *et al.*, 2020). Une dérégulation positive de gènes contrôlant le stress oxydant, le cycle cellulaire, la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire (NF- $\kappa$ B, AP1, MYC, PPAR $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ), l'organisation de la matrice extracellulaire et une dérégulation négative des gènes qui contrôlent la mort cellulaire (BID, BAD) ont été identifiés *in vitro* dans des lignées de cellules bronchiques humaines, de macrophages ou de cellules du mésoderme pleural (Tilton *et al.*, 2014, Snyder-Talkington *et al.*, 2015, Ghosh *et al.*, 2017, Snyder-Talkington *et al.*, 2019, Ventura *et al.*, 2020a, Ventura *et al.*, 2020b). L'ensemble des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* suggèrent un potentiel cancérogène des MWCNT.



## II. Objectifs

L'émergence de l'utilisation des MWCNT suscite des inquiétudes quant aux risques encourus par une exposition professionnelle des salariés par inhalation aux particules émises lors de procédés industriels. De nombreuses études ont montré que les NTC peuvent se déposer dans les alvéoles pulmonaires et provoquer une réponse inflammatoire aiguë susceptible de devenir chronique (Porter *et al.*, 2010, Poulsen *et al.*, 2016). Or, un microenvironnement inflammatoire est propice au développement de pathologies. Des études ont mis en évidence l'induction significative de marqueurs d'inflammation, de fibroses et de cancers chez des animaux exposés aux MWCNT (Ma-Hock *et al.*, 2009, Mercer *et al.*, 2011, Nagai *et al.*, 2011, Takagi *et al.*, 2012, Kasai *et al.*, 2016). Dans ce contexte, l'activation de l'EMT est un élément clé du développement de ces pathologies et a été mis en évidence *in vitro* (Chen *et al.*, 2019). Les risques potentiels induits par les MWCNT restent débattus à ce jour, en partie en raison de leurs différences de propriétés physico-chimiques.

Les travaux de cette thèse portent sur l'étude du potentiel toxique des MWCNT et prennent part à un projet de plus grande échelle dans le cadre de la prévention des maladies professionnelles. Notre hypothèse repose sur le fait que la toxicité des MWCNT serait influencée par leurs paramètres physiques tels que leur longueur ou leur diamètre.

Le premier axe de recherche comprendra notamment le développement et l'optimisation d'une cinétique de traitement d'un modèle *in vitro* de cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B). Les cellules seront traitées avec des faibles concentrations (0,125-1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de MWCNT de longueurs et diamètres différents : le Mitsui-7 qui est long et épais et le NM-403 qui est court et fin. La cinétique de traitement de 10 semaines comprendra une période de 6 semaines pendant lesquelles les cellules seront continuellement traitées avec des MWCNT pour évaluer le potentiel toxique des deux MWCNT puis une période de 4 semaines sans traitement pour étudier la réversibilité des effets. Au cours de cette cinétique, l'analyse des mitoses et le test des micronoyaux permettront d'évaluer le potentiel génotoxique des différents MWCNT. Parallèlement, la prolifération cellulaire et la cytotoxicité seront évaluées par des techniques d'imagerie en temps réel. De plus, nous tenterons d'identifier l'induction de l'EMT au cours du temps. Pour cela, la composition de la population cellulaire ainsi que la morphologie cellulaire seront observées chaque semaine. Des marqueurs de l'EMT tels que la E-cadhérine, la Claudine-1, la N-cadhérine, la Vimentine et la Fibronectine seront recherchés. L'analyse du transcriptome des cellules traitées permettra d'identifier les gènes différenciellement exprimés suite au traitement et les voies de signalisation dans lesquelles ces

derniers sont impliqués. Enfin, les marqueurs de l'EMT seront analysés à la fin de la période de récupération afin d'évaluer la réversibilité des effets.

Le second axe de recherche concerne des expériences menées *in vivo*. Il nous permettra de déterminer la pertinence de l'utilisation d'un modèle alternatif de rats hétérozygotes pour p53<sup>+/-</sup> pour étudier le potentiel cancérigène des MWCNT et constitue une étude pilote. Pour cela, des rats hétérozygotes pour p53 (OGM) et sauvages (WT) seront exposés à deux MWCNT (Mitsui-7 et NM-403) par instillation intra-trachéale à raison d'une instillation/semaine pendant 4 semaines pour une dose cumulée de 1 mg/rat. Une partie des animaux sera mise à mort 3 jours après la fin des expositions, la seconde partie des animaux sera suivie jusqu'à 8 mois post-exposition afin d'effectuer une étude de la toxicité à court et à long terme. À chaque temps de mise à mort, des observations macroscopiques des poumons seront réalisées. Lors de la nécropsie, un lavage broncho-alvéolaire sera réalisé et permettra d'évaluer la toxicité pulmonaire et l'inflammation. Des échantillons de sang permettront d'évaluer la toxicité systémique et de réaliser un test de génotoxicité (test des micronoyaux). Enfin, des analyses histopathologiques des poumons permettront d'identifier de potentielles altérations structurelles et fonctionnelles liées au développement de pathologies.



# III. Matériel et Méthodes

# 1. Caractérisation et dispersion des nanotubes de carbone

## 1.1. Caractérisation des nanotubes de carbone

Les MWCNT suivants ont été utilisés : le Mitsui-7 (MWNT-7/NRCWE-006) en provenance de MITSUI & Co (Lot# 05072001K28; Tokyo, Japon) a été fourni par le Centre National de Recherche sur l'Environnement de Travail (NRCWE, *National Research Center for Work Environment* Copenhague, Danemark); le NM-401 a été obtenu de l'Institut de toxicologie et de médecine expérimentale de Fraunhofer (Hanovre, Allemagne); le NM-402 est en provenance de Arkema (Colombes, France); le NM-403 a été fourni par le Centre commun de recherche (*Joint Research Centre*, Ispra, Italie). La forme des MWCNT a été observée par microscopie électronique à transmission (TEM, JEOL 2100-F) et leurs diamètres moyens ont été déterminés à partir des images prises. La surface spécifique des MWCNT a été déterminée par une analyse multipoints Brunauer-Emmett-Teller (BET) à l'aide de l'instrument Belsorp Max (Bel, Japon). La réalisation de ces techniques a été supervisée par Mr. Olivier Rastoix (Laboratoire L.A.I.C.A). L'ensemble des propriétés physico-chimiques de ces MWCNT a précédemment été déterminé dans le cadre des projets Européens Nanogenotox (Programme de santé de l'Union européenne, convention n°2009 21) et SmartNanoTox (Programme Horizon 2020 de l'Union européenne, convention n°686098). Le Tableau 1 présente les principales caractéristiques de ces derniers.

**Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des nanotubes de carbone issues de leur caractérisation.** La longueur, le diamètre, la surface spécifique, le pourcentage de pureté et les contaminants métalliques sont présentés ci-dessous pour chaque MWCNT.

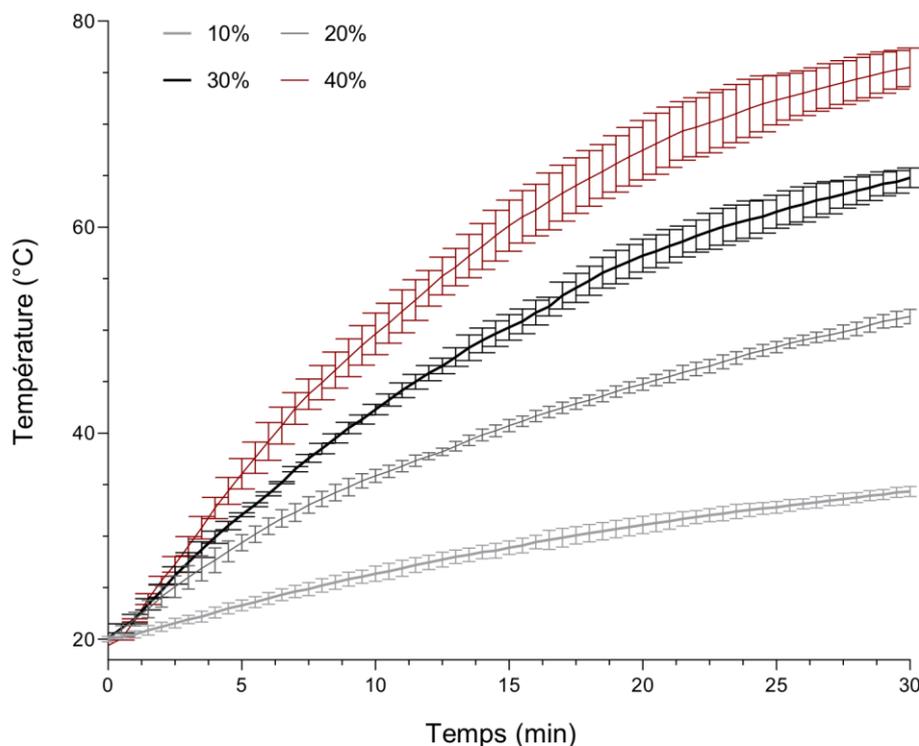
	Longueur ( $\mu\text{m}$ )	Diamètre (nm)	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Pureté (%)	Contenance métallique (% en poids)
Mitsui-7	5,7 ( $\pm 0,49$ )	74 (29-173)	26	>99	$\text{P}_2\text{O}_5$ (0,14), $\text{Fe}_2\text{O}_3$ (0,08), $\text{SO}_3$ (0,08), $\text{CaO}$ (0,03), $\text{MgO}$ (0,01), $\text{SiO}_2$ (0,006), $\text{ZnO}$ (0,001), $\text{CuO}$ (0,0003)
NM-401	4,0 ( $\pm 0,37$ )	67 (24-138)	18	>95	$\text{CaO}$ (0,03), $\text{CuO}$ (0,0002), $\text{Fe}_2\text{O}_3$ (0,05), $\text{MgO}$ (0,01), $\text{P}_2\text{O}_5$ (0,14), $\text{SiO}_2$ (0,009), $\text{SO}_3$ (0,08), $\text{ZnO}$ (0,001)
NM-402	1,4 ( $\pm 0,19$ )	11 (7-20)	226	ND	$\text{Al}_2\text{O}_3$ (2,43), $\text{CaO}$ (0,03), $\text{CuO}$ (0,0005), $\text{Fe}_2\text{O}_3$ (1,310), $\text{MgO}$ (0,001), $\text{NiO}$ (0,0011), $\text{P}_2\text{O}_5$ (0,16), $\text{SiO}_2$ (0,01), $\text{ZnO}$ (0,001)
NM-403	0,4 ( $\pm 0,03$ )	12 (5-37)	135	>90	$\text{Al}_2\text{O}_3$ (0,24), $\text{MgO}$ (0,19), $\text{MnO}$ (0,16), $\text{P}_2\text{O}_5$ (0,14), $\text{CoO}$ (0,12), $\text{CaO}$ (0,03), $\text{CuO}$ (0,003), $\text{Fe}_2\text{O}_3$ (0,002), $\text{NiO}$ (0,0018), $\text{ZnO}$ (0,001)

## 1.2. Dispersion des nanotubes de carbone

La qualité de dispersion des MWCNT a été basée sur une appréciation visuelle. En effet, la méthode de caractérisation des nanomatériaux en suspension établie par le groupe de Deloid (Deloid *et al.*, 2014) fait intervenir l'utilisation de la méthode DLS (*Delayed light Scattering*) qui ne s'applique qu'aux particules sphériques. Elle n'est donc pas adaptée aux MWCNT qui sont en forme de tubes.

### 1.2.1. Expériences réalisées *in vitro*

La température ainsi que la puissance en joules délivrés par le sonificateur Brandson SD-400 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury) lors de la sonification d'une solution en dispositif « cup-horn » ont tout d'abord été mesurées aux amplitudes 10, 20, 30 et 40% afin d'évaluer l'échauffement de la solution pendant 30 min (Figure 16 et Tableau 2).



**Figure 16 : Évaluation de la température délivrée par le sonificateur.**

Une fiole contenant de l'eau a été traitée aux ultrasons par le sonificateur Brandson SD-400 à l'aide d'un dispositif « cup-horn » jusqu'à 30 min consécutives aux amplitudes 10, 20, 30 et 40%. La température de l'eau a été mesurée dans la fiole à l'aide d'un thermomètre. La température a été relevée toutes les 30 sec. Le graphique représente la moyenne  $\pm$  l'écart type et est représentatif de 3 expériences indépendantes.

**Tableau 2 : Calcul de la puissance délivrée par le sonificateur.**

La puissance en joules/sec a été déterminée pour chaque amplitude à partir de l'équation  $P=(dT/dt)MCp$  après 5 et 10 min de sonification aux amplitudes 10 à 40%. P : puissance, dT/dt : pente de la droite, M : masse (10 g), Cp (Capacité Thermique Massique de l'Eau) :  $Cp = 4.186 \text{ J}\times\text{K}^{-1}\times\text{g}^{-1}$ .

Amplitude	Temps de sonification	Pente (K/min)	Puissance (J/min)	J/sec
10%	5 min	0,68	28,34	0,47
	10 min	0,66	27,48	0,46
20%	5 min	1,88	78,87	1,31
	10 min	1,59	66,73	1,11
30%	5 min	2,49	104,29	1,74
	10 min	2,26	94,71	1,58
40%	5 min	3,46	145,04	2,42
	10 min	3,16	132,14	2,20

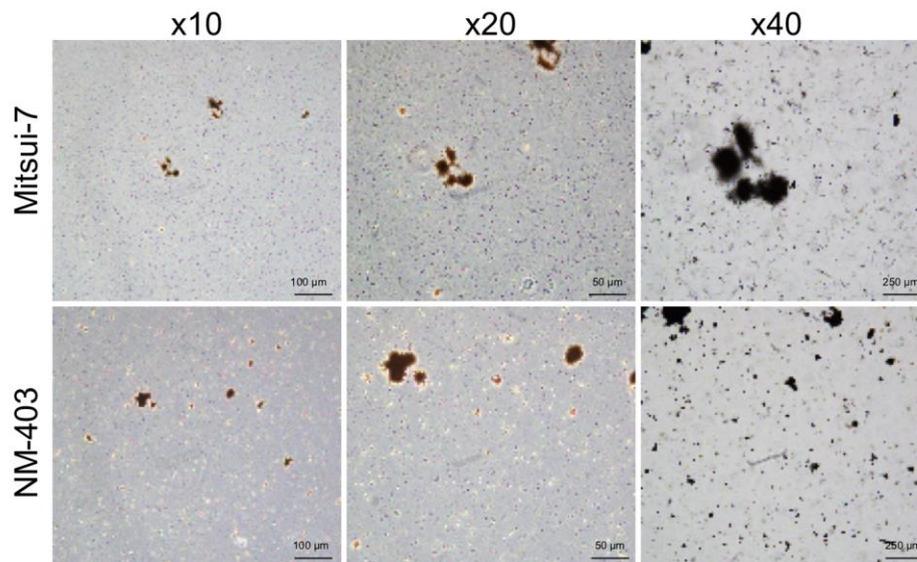
Les MWCNT ont ensuite été mis en suspension à une concentration initiale de 2,56 mg/mL (Nanogenotox) dans du milieu LHC-9-BSA 1%. Cette concentration s'est avérée trop élevée pour l'obtention d'une suspension homogène. En effet, la suspension de MWCNT est restée biphasique jusqu'à 25 min de sonification, alors qu'elle s'est avérée de meilleure qualité lorsque la concentration en MWCNT était plus faible. C'est pourquoi elle a été réduite à 0,5 mg/mL. Deux amplitudes de sonification ont été testées (20% et 40%) afin de déterminer les paramètres permettant d'obtenir une dispersion la plus homogène possible. Les suspensions de MWCNT ont été observées à l'œil nu immédiatement et 24h après sonification (Tableau 3). L'appréciation visuelle a permis d'identifier les conditions dans lesquelles une dispersion était homogène et dans laquelle le nombre d'agglomérats était faible.

Après optimisation du protocole de dispersion, les MWCNT ont été mis en suspension à une concentration finale de 0,5 mg/mL dans du milieu LHC-9-BSA 1%. La solution a été homogénéisée au vortex 15 sec puis traitée aux ultrasons 15 min à une amplitude de 40%. La solution a été placée dans de l'eau glacée afin d'éviter son échauffement au cours de la sonification. La dispersion des MWCNT a été appréciée à l'œil nu puis au microscope optique aux objectifs x10, x40 et x100 (Figure 17). La solution de MWCNT a été préparée avant chaque traitement.

**Tableau 3 : Observations de la qualité de suspension des nanotubes de carbone.**

Les suspensions de MWCNT ont été observées à l'œil nu après sonification. En gris les suspensions présentaient une mauvaise dispersion des particules (deux phases visibles, dont la phase supérieure était composée d'agglomérats de MWCNT, présence de grands agglomérats), en jaune les suspensions de qualité moyenne (une phase mais présence de gros agglomérats), en vert les suspensions présentaient une meilleure dispersion (une phase visible, présence de plus petits agglomérats).

Temps de sonification (min)	Amplitude 20%		Amplitude 20%		Amplitude 40%	
	Mitsui-7 (2,56 mg/mL)	NM-403 (2,56 mg/mL)	Mitsui-7 (0,5 mg/mL)	NM-403 (0,5 mg/mL)	Mitsui-7 (0,5 mg/mL)	NM-403 (0,5 mg/mL)
5	gris	gris	gris	gris	jaune	jaune
10	gris	jaune	gris	jaune	jaune	vert
15	gris	jaune	jaune	vert	vert	vert
20	gris	vert	jaune	vert	vert	vert
25	gris	vert	jaune	vert	vert	vert

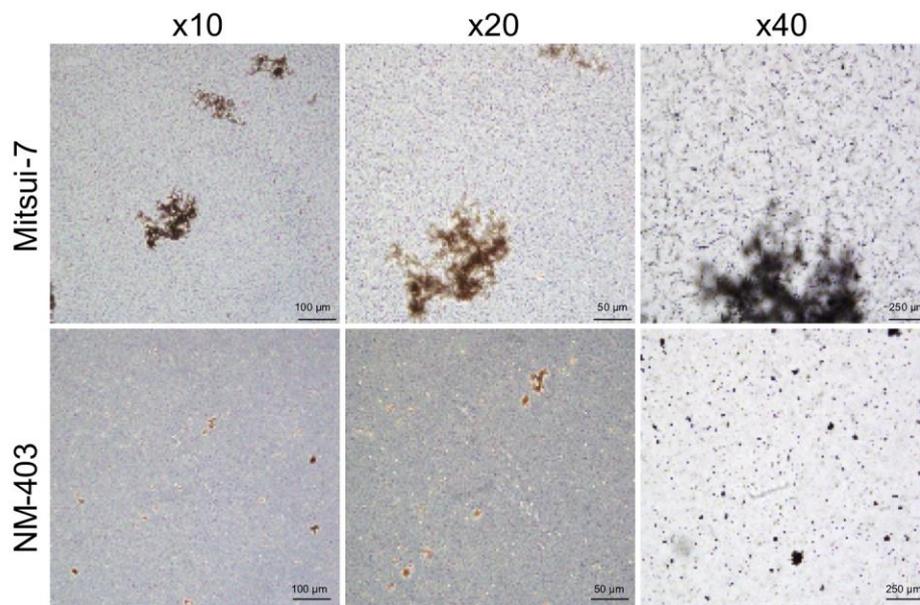


**Figure 17 : Dispersion des MWCNT dans les solutions de traitement utilisées lors des expériences menées *in vitro*.**

Pour les essais réalisés *in vitro*, les MWCNT ont été dispersés à une concentration de 0,5 mg/mL dans du milieu de culture LHC-9-BSA 1%. Les solutions de traitement ont été placées entre lame et lamelle puis observées au microscope optique aux objectifs x10, x20 et x40.

### 1.2.2. Expériences réalisées *in vivo*

Afin de réaliser les instillations intratrachéales chez le rat, les MWCNT ont été dispersés dans un sonificateur muni d'une sonde. Les MWCNT ont été mis en suspension dans du Pluronic 0,1% (Sigma P5556) – NaCl 0,9% à une concentration finale de 1 mg/mL. La solution de Mitsui-7 a été homogénéisée 30 sec au vortex puis traitée aux ultrasons pendant 4 min (10 sec ON, 10 sec OFF) à une amplitude de 10%. La solution de NM-403 a été traitée aux ultrasons pendant 16 min à une amplitude de 10%. De la glace a été ajoutée autour de la solution afin de limiter son échauffement. La dispersion des MWCNT a été appréciée à l'œil nu puis au microscope optique aux objectifs x10, x40 et x100 (Figure 18).



**Figure 18 : Dispersion des MWCNT dans les solutions de traitement utilisées lors des expériences menées *in vivo*.**

Pour les essais réalisés *in vivo*, les MWCNT ont été dispersés à une concentration de 1 mg/mL dans une solution de Pluronic 0,1%-NaCl 0,9%. Les protocoles de dispersion du Mitsui-7 et du NM-403 ont été réalisés, respectivement, selon les travaux de Poulsen *et al.*, 2013 et Knudsen *et al.*, 2019. Les solutions de traitement ont été placées entre lame et lamelle puis observées au microscope optique aux objectifs x10, x20 et x40.

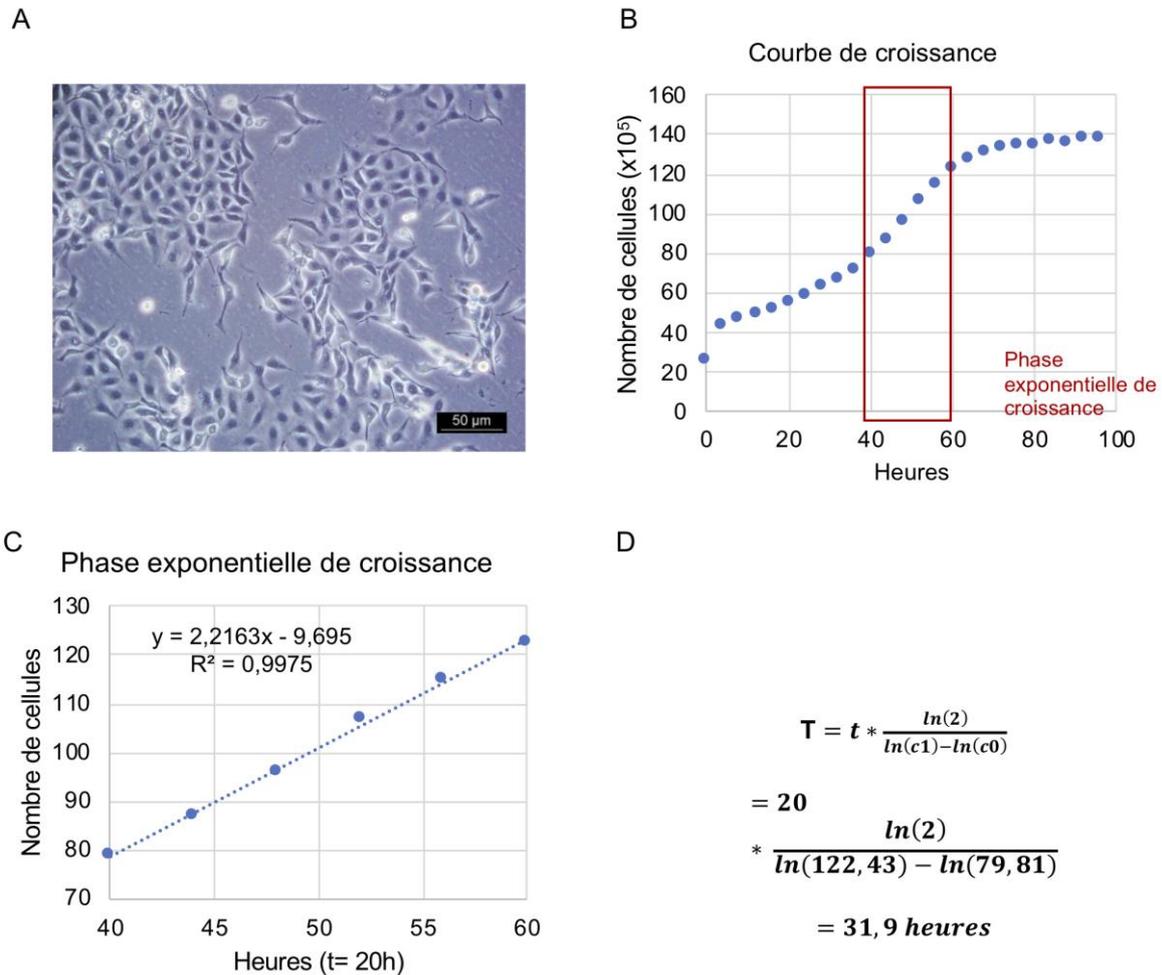
## 2. Expériences menées *in vitro*

### 2.1. Lignée et culture cellulaire

#### 2.1.1. La lignée cellulaire BEAS-2B

La lignée BEAS-2B<sup>®</sup>CRL-9609 (*American Type Culture Collection*, ATCC, USA) est une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines établie à partir d'un épithélium bronchique

provenant de l'autopsie d'un individu sain de sexe masculin dont le temps de doublement est d'environ 32h (Figure 19). Les cellules ont été infectées avec un adénovirus hybride 12-SV40 (Ad12SV40) et clonées afin d'obtenir une lignée cellulaire stable dont la division est illimitée (Bonfil *et al.*, 1989).



**Figure 19 : Les cellules BEAS-2B et temps de doublement.**

Les cellules BEAS-2B sont des cellules épithéliales bronchiques humaines. Ce sont des cellules adhérentes cuboïdes d'environ 20 µm de diamètre. (A) Photo prise avec un microscope optique à l'objectif x40. L'échelle représente 50 µm. Le temps de doublement a été calculé grâce à un marquage fluorescent Nuclight® et l'utilisation du dispositif d'imagerie en temps réel IncuCyteS3®. (B) Ce marquage a permis de déterminer le nombre de cellules en fonction du temps et d'établir la courbe de croissance des cellules. (C) La phase exponentielle de croissance a ensuite été déterminée et une droite a été établie. (D) Le temps de doublement a été calculé à partir de cette droite grâce à la durée de la phase exponentielle (t= 20h) ainsi qu'au nombre de cellules au début (N0) et à la fin (N1) de cette phase.

### 2.1.2. Maintenance des cellules en culture

Les cellules ont été cultivées dans du milieu LHC-9 (Gibco™ #12680013) et maintenues à 37°C sous atmosphère humide équilibrée à 5% CO<sub>2</sub>. Ce milieu de culture sans sérum de veau

foetal est conçu spécifiquement pour la croissance des cellules épithéliales bronchiques. Il contient de l'acide rétinolique, de l'épinéphrine, de la gentamicine mais également des facteurs de croissance tels que l'insuline, l'hydrocortisone, l'EGF (*Epithelial Growth Factor*, facteur de croissance épithéliale), la transferrine, l'extrait pituitaire bovin T3 qui permettent la prolifération des cellules et le maintien de leur phénotype épithélial. Les cellules adhérentes ont été détachées de leur support de culture par ajout de 2 mL de trypsine-EDTA (Gibco™ #25200056) par flasque de 75 cm<sup>2</sup> puis ont été incubées 8 min à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. L'action de la trypsine a été arrêtée par ajout (v/v) d'un inhibiteur de trypsine DTI (*Defined Trypsin Inhibitor*, Gibco™ #R007100). Les cellules ont ensuite été centrifugées 5 min à 130g à température ambiante et le culot cellulaire a été repris dans du milieu LHC-9. Les cellules vivantes et mortes ont été comptées par l'utilisation (v/v) d'un mélange AO/IP (Acridine Orange/Iodure de Propidium) et le comptage a été effectué par le Cellometer® (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Les cellules ont étéensemencées à 3500 cellules/cm<sup>2</sup> et maintenues à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.1.3. Congélation et décongélation

Après amplification, les cellules ont été congelées dans des cryotubes à une densité cellulaire de 1.10<sup>6</sup> cellules/mL dans du milieu de culture LHC-9-10% diméthylsulfoxyde (DMSO). Lors de la décongélation, les cryotubes ont été placés dans un bain marie à 37°C puis le contenu a été transféré dans 9 mL de milieu LHC-9. Les cellules ont ensuite été centrifugées 5 min à 130g à température ambiante et le culot cellulaire a été repris dans 1 mL de milieu de culture. Un comptage AO/IP a permis de déterminer la concentration et la viabilité cellulaire. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été jugé suffisant lorsqu'il excédait 80%.

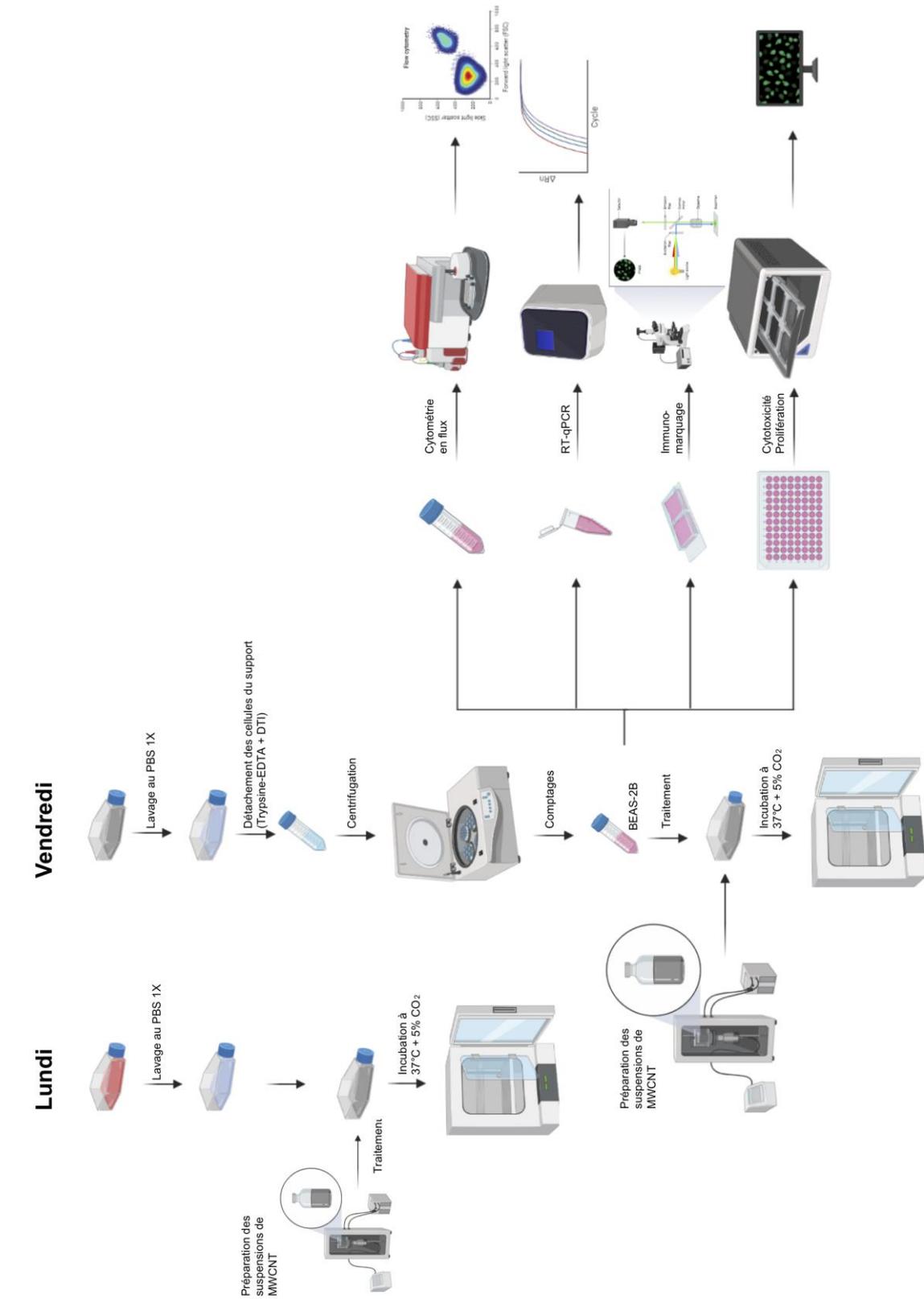
## 2.2. Cinétique de traitement des cellules BEAS-2B

Une cinétique de traitement de 6 semaines des cellules BEAS-2B avec des MWCNT a été établie (Figure 20). Les cellules ont étéensemencées à 3500 cellules/cm<sup>2</sup> au jour 0 (Vendredi) puis traitées 3 jours plus tard (Lundi) avec le contrôle véhicule (BSA 1%), le Mitsui-7 (0,125, 0,25, 0,5 µg/cm<sup>2</sup>), le NM-401 (0,125, 0,25, 0,5, 1 µg/cm<sup>2</sup>), le NM-402 (0,125, 0,25, 0,5, 1 µg/cm<sup>2</sup>) ou le NM-403 (0,25, 0,5, 1 µg/cm<sup>2</sup>). Des concentrations plus hautes ont été testées et se sont avérées être trop cytotoxiques pour réaliser une exposition continue de 6 semaines. La conversion de la concentration en MWCNT de µg/cm<sup>2</sup> en µg/mL est décrite dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Concentrations des nanotubes de carbone utilisées pour le traitement des cellules.**  
Les cellules ont été cultivées en flasque de 75 cm<sup>2</sup> dans un volume de 15 mL.

Concentration en µg/cm <sup>2</sup>	Concentration en µg/mL
0,125	0,625
0,25	1,25
0,5	2,5
1	5

Le vendredi suivant, les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec 2 mL de PBS 1X (Invitrogen, #10010056) puis détachées de leur support. Elles ont étéensemencées à la même densité cellulaire (3500 cellules/cm<sup>2</sup>) et traitées avec les MWCNT aux mêmes concentrations. Trois jours après leur ensemencement (Lundi) les cellules ont été lavées 2 fois avec 2 mL de PBS 1X puis traitées avec le contrôle véhicule (BSA 1%), le Mitsui-7, le NM-401, le NM-402 ou le NM-403. Ce schéma a été reproduit pendant 6 semaines consécutives. Puis, les cellules ont été cultivées pendant 4 semaine supplémentaires sans traitement. La cytotoxicité et la prolifération cellulaire ont été évaluées quotidiennement durant les 6 premières semaines de traitement par imagerie en temps réel. De façon hebdomadaire, la morphologie cellulaire a été observée au microscope optique (objectif x10). Lorsque les cellules ont été détachées de leur support (Vendredi), une partie des cellules a été réensemencée afin de poursuivre la cinétique et une autre a été fixée à l'éthanol 70% pour être analysée ultérieurement par cytométrie en flux. Des culots cellulaires ont aussi été réalisés. Aux temps S4, S5, S6 et SR4 le marqueur de l'EMT E-cadhérine a été analysé par cytométrie en flux. En parallèle, une partie des cellules a été cultivée en chambre de culture afin de réaliser un immunomarquage permettant l'analyse des mitoses et la réalisation du test des micronoyaux pendant les 4 premières semaines de traitement.



A

Légende sur la page suivante.



cytotoxicité ont été évalués pendant les 6 semaines de traitement des cellules BEAS-2B avec les MWCNT.

## 2.4. Étude de la composition de la population cellulaire

### 2.4.1. Observations de la morphologie cellulaire par microscopie optique

La morphologie des cellules BEAS-2B a été observée au microscope optique (objectif x10) pendant les 10 semaines puis catégorisée comme « normale », « en forme d'épingle » ou « mixte ». Ces informations ont été résumées afin de créer une « heatmap » dans laquelle les cellules normales ont été représentées en couleurs claires, les cellules en forme d'épingle en couleurs foncées, et le mélange des cellules normales et en forme d'épingle en couleurs d'intensités moyennes.

### 2.4.2. Analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux

Un million de cellules a été fixé à l'éthanol 70% ajouté au goutte à goutte sous agitation constante. Les cellules ont été conservées à -20°C pour une durée minimale de 2h avant analyse. Les cellules fixées ont ensuite été lavées avec 1 mM EDTA-PBS puis centrifugées à 350g pendant 5 min à 4°C. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans du PBS 1X. La suspension cellulaire a été analysée par cytométrie en flux à l'aide du cytomètre AccuriC6 (BD Biosciences Immunocytometry Systems). Chaque échantillon a été analysé à raison de 10000 évènements comptés dans la population totale de cellules préalablement délimitée. Le logiciel FlowJo™ (10.7.1.) a été utilisé afin d'analyser le pourcentage de la population cellulaire en fonction de la taille et la granulométrie des cellules. Les profils SSC::FSC (*sidewards scatter* :: *forward scatter*) des populations cellulaires ont été établis chaque semaine.

## 2.5. Étude de l'atteinte du fuseau mitotique et génotoxicité cellulaire

### 2.5.1. Analyse des fuseaux mitotiques par immunofluorescence

Les cellules ont été cultivées et traitées dans des chambres de culture (Sarstedt #94.6150.201). À chaque temps de traitement, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X puis fixées avec 2% de formaldéhyde-PBS 1X pendant 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Les cellules ont été lavées une fois avec du PBS 1X, puis les membranes cellulaires ont été

perméabilisées avec 0,1% de Triton X100-PBS 1X suite à une incubation de 8 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS 1X puis incubées séquentiellement avec l'anticorps primaire (anti-tubuline- $\alpha$ , Cell Signalling #3873, 1:1000) puis l'anticorps secondaire (Alexa-Fluor-488 anti-souris, Invitrogen #A11029, 1:1000) pendant 1h à température ambiante, à l'obscurité. Les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS 1X après chaque incubation avec les anticorps. Le montage entre lame et lamelle a été effectué avec un milieu de montage contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) permettant de marquer les noyaux (ProLong<sup>TM</sup> Gold Antifade Mountant with DAPI, Invitrogen #P36931). Les lames ont été analysées avec un microscope à fluorescence. Le marquage Tubuline- $\alpha$ /DAPI a permis d'identifier le réseau de microtubules qui compose le fuseau mitotique et d'apprécier le niveau de compaction de l'ADN. Les différentes phases de la mitose et l'organisation du fuseau mitotique ont été observées afin de déterminer le pourcentage de mitoses anormales pour chaque condition de traitement. Pour ce faire, 200 cellules en mitose ont été comptées puis catégorisées selon l'organisation de leur fuseau mitotique. Une mitose a été classée comme « normale » lorsque son fuseau mitotique était constitué de deux pôles. Elle a été classée comme « monopolaire » ou « multipolaire » lorsque ce dernier n'était constitué, respectivement, que d'un pôle ou de plus de deux pôles. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de mitoses anormales totales, monopolaires ou multipolaires. Le traitement des cellules avec 1,25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de pentoxyde de vanadium ( $\text{V}_2\text{O}_5$ , Sigma #223794) pendant 24h a été utilisé comme contrôle positif. Le  $\text{V}_2\text{O}_5$  a été dissous dans de l'eau distillée puis traité aux ultrasons 15 min à une puissance de 40% dans un dispositif « cup-horn » avant d'être ajouté au milieu de culture.

### 2.5.2. Test des micronoyaux

Les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture (Sarstedt #94.6150.201) puis préparées comme indiqué dans le paragraphe précédent afin d'observer les noyaux des cellules marqués au DAPI. Le test des micronoyaux a été réalisé en analysant le noyau de 2000 cellules par condition en distinguant les noyaux entiers de ceux qui présentaient un micronoyaux. Le  $\text{V}_2\text{O}_5$  a été utilisé comme contrôle positif.

## 2.6. Analyse de l'expression génique par RT-qPCR

### 2.6.1. Extraction des ARN

L'extraction des ARN a été réalisée à partir de  $1.10^6$  cellules avec le kit NucleoSpin<sup>®</sup> miRNA kit (Macherey-Nagel #740971). Suite à la lyse cellulaire et l'élimination des débris cellulaires, les ARNm et lncARN (longs ARN non codants) ont été retenus sur une première colonne de silice. L'ADN a ensuite été dégradé par une incubation de 15 min avec de la DNase. L'éluât restant composé de protéines et les petits ARN a été placé sur une seconde colonne de silice afin d'éluer les petits ARN. Ces derniers ont été ajoutés à la précédente colonne contenant les ARNm et les lncARN. Les ARN totaux ont ensuite été lavés et élués dans un volume final de 50  $\mu$ L. La concentration finale a été déterminée à partir de l'absorbance des échantillons à 260 nm (NanoPhotometer<sup>®</sup> P360).

### 2.6.2. Qualité des ARN

La qualité des ARN a été évaluée par trois approches. Tout d'abord, elle a été déterminée par les ratios  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{260}/A_{230}$  mesurés au NanoPhotometer<sup>®</sup> P360. Ils permettent d'évaluer, respectivement, la présence de contamination par des protéines ou des solvants organiques. L'ARN a été jugé de bonne qualité lorsque le ratio  $A_{260}/A_{280}$  avait une valeur  $\geq 2,0$  et le ratio  $A_{260}/A_{230}$  une valeur  $\geq 1,8$ . L'intégrité des ARN a également été évaluée par leur profil de migration sur gel d'agarose. Pour ce faire, 250 ng d'ARN ont été déposés sur un gel d'agarose 2%, TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA), 1% Gel Red (BIOTIUM #41003). Une migration de 30 min à 100V était suffisante pour visualiser les deux bandes d'ARN ribosomiques (ARNr) majoritaires 28S et 18S et l'absence de SMEAR (multiples bandes visibles en UV correspondant à une dégradation des ARN) et d'ADN génomique. Enfin, les ARN ont été analysés à l'aide de la TapeStation 4200 © (Aligent Technologies, Inc. 2015-2018 #G2991-90021). Le tampon RNA ScreenTape Sample (Aligent #5067-5577) a été placé à température ambiante 30 min avant son utilisation. Une plaque de 96 puits a été préalablement remplie avec 5  $\mu$ L de tampon RNA ScreenTape Sample contenant 1  $\mu$ L d'ARN puis mélangée au vortex 1 min et centrifugée 1 min. Les échantillons ont ensuite été dénaturés à 72°C pendant 3 min puis placés sur glace pendant 2 min. Un marqueur de taille fourni par le kit a été préparé séparément de la même manière. La plaque a ensuite été centrifugée 1 min puis placée dans l'automate TapeStation, tout comme le marqueur de taille. L'automate réalise l'analyse à partir

d'une « High Sensitivity RNA ScreenTape ». Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel TapeStationAnalysis Software Copyright © 2011-2017 Agilent Technologies V.A.02.02(SR1). Ils sont présentés sous forme d'un gel d'électrophorèse reconstitué à partir d'électrophorégrammes obtenus pour chaque échantillon qui permettent de déterminer la qualité de l'ARN ainsi que d'obtenir des informations sur leur taille et sur leur concentration. À travers cette approche, la qualité des ARN a été évaluée selon 3 critères : le profil du gel d'électrophorèse a permis d'identifier deux bandes majoritaires correspondant aux ARNr 18S et 28S ainsi que les petits ARN et l'absence de SMEAR ; un ratio 28S/18S > 1,5 ; la détermination du RIN (*RNA Integrity Number*) > 7. L'ensemble des ARN utilisés dans cette étude ont présenté un RIN d'au moins 7.

### 2.6.3. Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée avec le kit iScript cDNA Synthesis Kit® (Bio-Rad #1708890). Dans un volume réactionnel de 20 µL, 500 µg d'ARN ont été mélangés à 4 µL de mélange réactionnel 5X (dNTP, oligo(dT), amorces aléatoires, tampon, MgCl<sub>2</sub> et stabilisateurs) et 1 µL d'enzyme transcriptase inverse (inhibiteur de RNase et Virus Leucémie Murine (MMLV) transcriptase inverse H+). La réaction de transcription inverse a été réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf, Mastercycler®). Elle débute par une incubation de 5 min à 25°C permettant l'hybridation des amorces suivie d'une seconde de 30 min à 42°C, température à laquelle l'enzyme est active. Cette dernière est ensuite inactivée par une incubation de 5 min à 85°C. Les ADNc ont été conservés à -20°C.

### 2.6.4. Amplification par PCR en temps réel

#### *Le design d'amorces*

Les amorces ont été dessinées dans une région d'intérêt conservée entre les différentes isoformes du gène cible. Pour ce faire, la séquence correspondant à la région d'intérêt a été insérée dans le logiciel Primer3Plus®. Des critères spécifiques ont été ajoutés : taille de l'amorce (20 pb), taille de l'amplicon (90-120 pb) et le % GC (50-65%). La plateforme NCBI/Blast a ensuite été utilisée afin de s'assurer que les amorces ne s'hybrideront que sur le gène d'intérêt. Les amorces ont été commandées auprès de la société Eurogentec (Angers, France).

*Le test des amorces pour la PCR en temps réel*

L'efficacité de chaque couple d'amorces utilisé a été préalablement testée. Une gamme de dilution 1/4, 1/16, 1/64, 1/256 et 1/1024 d'ADNc a été utilisée. L'amplification a été réalisée dans un volume de 20 µL par puits en présence de 4 µL d'ADNc dilué additionné de 250 nM d'amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt (Tableau 5) et de 10 µL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad #1725272). L'amplification et la détection de la fluorescence des produits de PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur en temps réel CFX96 Touch™ (BioRad) selon le programme suivant : une première dénaturation de 3 min à 95°C suivie de 35 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 sec et d'une étape d'hybridation et d'amplification à 60°C pendant 60 sec. Une courbe de dissociation a été réalisée lors de l'augmentation de la température de 60 à 95°C avec un incrément de 0,2°C et a permis de vérifier qu'il n'y avait pas de formation de dimères d'amorces ou d'amplification d'ADN génomique.

**Tableau 5 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR en temps réel.**

Le nom des gènes cibles, les séquences sens (S) et les séquences anti-sens (AS) ainsi que l'efficacité (%) de la PCR de chaque couple sont indiqués dans le tableau.

Gène cible	Séquences	Efficacité de PCR (%)
<i>actb1</i>	S : 5' TTCCTTCCTGGGCATGGAGT 3' AS : 5' AATGCCAGGGTACATGGTGG 3'	102
<i>gapdh</i>	S : 5' TGAACGGGAAGCTCACTGG 3' AS : 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	111
<i>cdh1</i> (Tang <i>et al.</i> , 2019)	S : 5'CGAGAGCTACACGTTTCACGG 3' AS : 5' GGGTGTGCGAGGGAAAAATAGG 3'	112
<i>cdh2</i> (Tang <i>et al.</i> , 2019)	S : 5'AGCCAACCTTAACTGAGGAGT 3' AS : 5'GGCAAGTTGATTGGAGGGATG 3'	103
<i>cldn1</i>	S : 5' CAACGGTGGCCACAAAGATT 3' AS : 5' CTGAATCTGAGCAGCACATTG 3'	92
<i>fn1</i>	S: 5' GATCATGCTGCTGGGACTTC 3' AS : 5' CCTTCTCCCAGGCAAGTACA 3'	101
<i>vim</i>	S : 5' CGTCTTGACCTTGAACGCAA 3' AS : 5' TTCCTGAATCTGAGCCTGCA 3'	96

Les données ont été obtenues sous formes de Cq (*cycle quantification*) qui correspondent au nombre de cycles nécessaires à la détection du produit de PCR ciblé. Les résultats ont été analysés avec le logiciel CFX Manager™ (Version 3.1). La gamme de concentration d'ADNc a permis dans un premier temps d'établir l'efficacité de la PCR à partir de l'équation de la droite reliant la dilution d'ADNc de départ et le nombre de cycle nécessaires à son amplification. L'efficacité de la PCR a été déterminée pour chaque couple d'amorces. Un couple d'amorces est validé lorsque son efficacité se situe entre 90 et 110%. Les produits de PCR ont été déposés avec du bleu de dépôt 6X sur un gel d'agarose 2,5%-TAE 0,5X ainsi qu'un marqueur de taille 25 pb (Invitrogen #10597011). Une migration de 1h30 à 100V a permis de vérifier qu'il n'y avait qu'un seul produit de PCR à la taille attendue. Les amorces qui ont été testées et utilisées pour cette étude sont décrites dans le Tableau 5.

#### *Analyse de l'expression des gènes par PCR en temps réel*

Les ADNc des échantillons d'intérêt ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'H<sub>2</sub>O sans nucléase. L'amplification et la détection de la fluorescence des produits de PCR ont été réalisées avec un mélange contenant du SYBR® Green et la polymérase (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix) additionné des amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt dans les mêmes conditions que décrites dans le paragraphe précédent avec un incrément de 1°C pour la courbe de dissociation. Les gènes rapporteurs utilisés étaient *gapdh* et *actb1*. Leur stabilité a été vérifiée pour chaque condition. Les résultats ont été interprétés selon la moyenne géométrique de ces deux gènes de ménage.

Les résultats ont été analysés grâce l'équation  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  décrite ci-dessous.

$$\Delta Cq^{\text{Témoin}} = Cq^{\text{gène d'intérêt}} - Cq^{\text{moyenne géométrique des gènes de ménage}}$$

$$\Delta Cq^{\text{Traité}} = Cq^{\text{gène d'intérêt}} - Cq^{\text{moyenne géométrique des gènes de ménage}}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq^{\text{Traité}} - \Delta Cq^{\text{Témoin}}$$

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = \text{Variation d'expression génique}$$

## 2.7. Analyses transcriptomiques

### 2.7.1. Hybridation sur puces

Le transcriptome des cellules BEAS-2B traitées 4 et 6 semaines avec le Mitsui-7 (0,25 µg/cm<sup>2</sup>) ou le NM-403 (0,5 µg/cm<sup>2</sup>) a été analysé à l'aide de la technologie de puce d'expression de

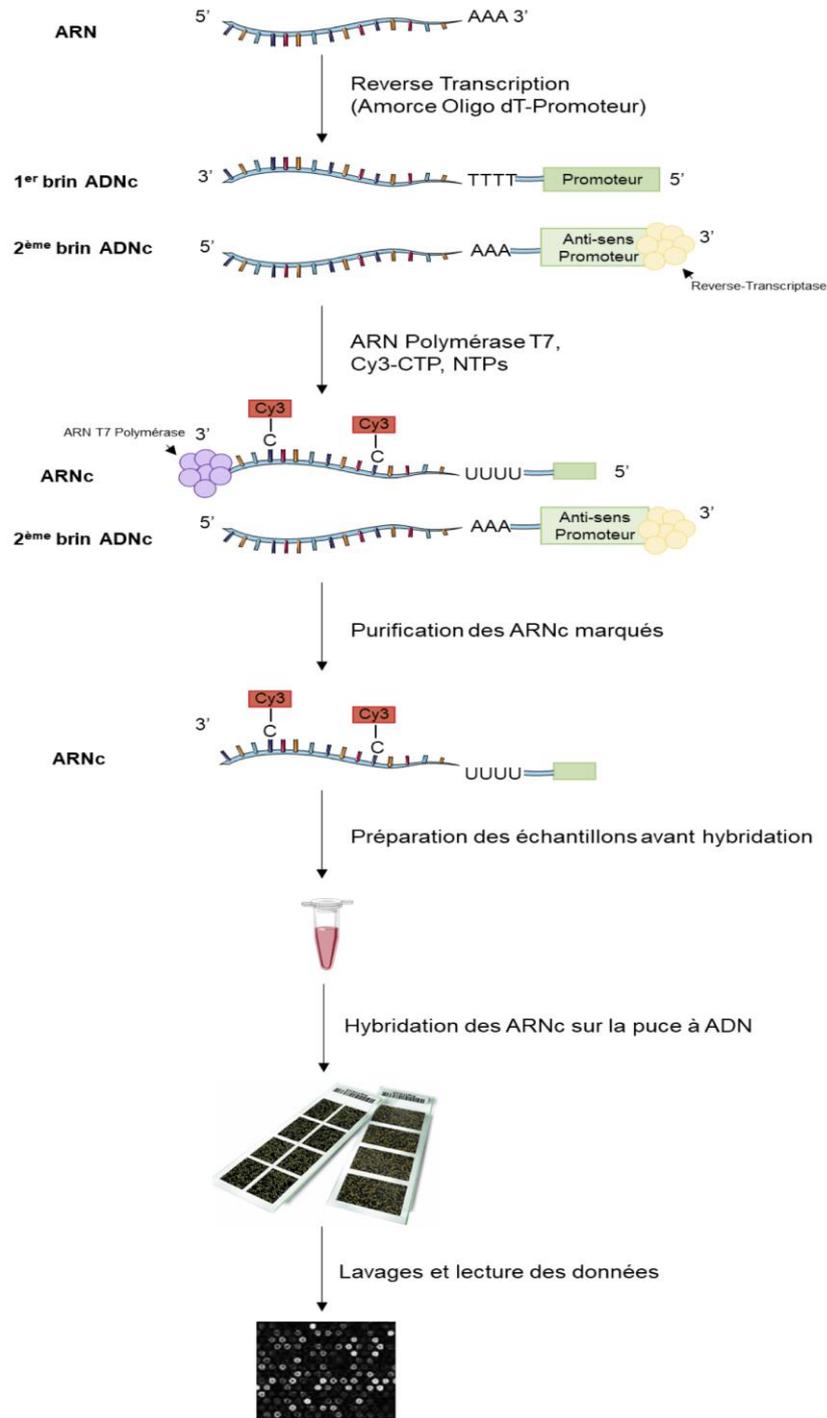
gènes humains SurePrint G3 v3 (Agilent technologies #G4851-60530). Cette puce à ADN permet de cibler 50 684 sondes comprenant des ARNm ainsi qu'un large panel de lncARN. Le principe de réalisation des puces à ADN de la technologie Agilent est décrite dans la Figure 21. Pour réaliser l'hybridation d'ARN sur la puce, un aliquot de 100 ng d'ARN a été utilisé par échantillon.

#### *Étape 1 : Préparation du Spike-Mix*

Dans un premier temps le Spike-Mix a été préparé à partir du kit RNA Spike-In kit (Agilent #5188-5282). Le mélange a été chauffé 5 min à 37°C puis dilué en cascade au 1/20<sup>ème</sup> (Dilution 1 : 2 µL de solution + 38 µL de tampon), puis 1/25<sup>ème</sup> (Dilution 2 : 2 µL de dilution 1 + 48 µL de tampon) et 1/20<sup>ème</sup> (Dilution 3 : 2 µL de dilution 2 + 38 µL de tampon).

#### *Étape 2 : Synthèse d'ARNc marqués*

Les ARN ont été dilués dans de l'eau afin d'obtenir une concentration finale de 40 ng/µL dans un volume minimal de 2,5 µL. Les ARN ont ensuite été dénaturés, 100 ng d'ARN ont été mélangés à 2 µL de Spike-In (Dilution 3) et 0,8 µL de T7 Primer et incubés 10 min à 65°C dans un thermocycleur, puis immédiatement placés sur glace pendant 5 min. Après dénaturation, l'ADNc double brin a été synthétisé à l'aide du kit Low Input Quick Amp Labeling (Agilent #5190-2305). Dans un tube de 1,5 mL un mélange contenant 2 µL de Tampon FS 5X, 1 µL de DTT, 0,5 µL de dNTP, 1,2 µL de mélange Affinity script RNase Block et 1,2 µL de RNase ont été ajoutés à la réaction précédente (ARN-Spike et Primer). Le tube a ensuite été placé dans un thermocycleur selon le programme suivant : 2h à 40°C puis 15 min à 70°C puis 5 min sur glace. Afin de synthétiser et marquer l'ARN complémentaire à l'ADNc double brin précédemment synthétisé, un mélange de transcription contenant de la cyanine 3 a été préparé selon les proportions suivantes : 0,75 µL d'eau ultrapure (sans nucléase), 3,20 µL de tampon de transcription 5X, 0,60 µL de DTT, 1 µL de mélange de NTP, 0,24 µL de Cyanine 3, 0,21 µL de T7 RNA Pol Blend (volume total 6 µL). Un volume de 6 µL de ce mélange a été ajouté à la réaction précédente (volume final = 16 µL) puis le mélange a été placé dans un thermocycleur selon le programme suivant : 2h à 40°C puis 5 min sur glace. Les ARNc obtenus sont marqués à la cyanine 3.



**Figure 21 : Principe de préparation et d'hybridation des ARN avant hybridation sur puce à ADN (Agilent Technologies).**

Les ARN extraits à partir des cellules BEAS-2B ont tout d'abord été transcrits en brins d'ADNc dont une région promotrice de l'ARN polymérase T7 a été ajoutée à l'extrémité. Ce site de fixation permet l'action de l'ARN polymérase T7 intervenant dans la réaction de marquage. En effet, une seconde réaction permet la production d'ARN complémentaire (ARNc) marqué à la cyanine 3. Les ARNc ont ensuite été purifiés et préparés afin d'être hybridés sur la puce. La lecture de la lame a été effectuée dans un scanner de puce à ADN Agilent.

*Étape 3 : Purification des ARNc marqués*

Les ARNc marqués à la cyanine 3 précédemment obtenus ont été purifiés à l'aide du kit RNeasy Mini kit (Qiagen #74134). À température ambiante, les 16 µL d'ARNc ont été mélangés à 84 µL d'eau ultrapure. Ce volume de 100 µL d'ARNc, auquel a été ajouté 350 µL de tampon RLT (Qiagen #79216) puis 250 µL d'EtOH 100% a été placé sur une colonne *gDNA Eliminator* puis centrifugé 1 min à 8000g. L'éluât a été placé sur une nouvelle colonne puis centrifugé 1 min à 8000g. La colonne a été lavée 2 fois avec 500 µL de tampon RPE, puis l'éluat a été réalisée avec 30 µL d'eau ultrapure.

Les ARNc marqués ont ensuite été validés à l'aide des mesures d'absorbance à  $A_{550}$ ,  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  et  $A_{230}$  réalisées au NanoPhotometer® P360. La concentration en ARNc a été déterminée à partir de l'absorbance à  $A_{260}$ , l'absence de contaminants organiques ou protéiques a été validée à l'aide du ratio  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{260}/A_{230}$ , la concentration en cyanine 3 a été déterminée par l'absorbance à  $A_{550}$  nm. L'activité spécifique de la Cyanine 3 a été déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique (pmol/}\mu\text{g)} = \frac{\text{Concentration Cy3 (pmol/}\mu\text{L)}}{\text{Concentration ARNc (ng/}\mu\text{L)}} \times 100.$$

Elle doit avoir une valeur > 6 afin de juger le marquage suffisant pour le dépôt sur puce à ADN.

*Étape 4 : Hybridation sur puce*

Une quantité de 600 ng d'ARN a été diluée dans un volume final de 14 µL d'eau ultrapure. Un mélange de fragmentation contenant 5 µL d'eau, 5 µL d'agent bloquant 10X et 1 µL de tampon de fragmentation a été préparé en parallèle, puis ajouté aux ARN précédemment dilués. Le mélange a été chauffé 30 min à 60°C puis placé sur glace pendant 1 min. Ensuite, 25 µL de tampon d'hybridation a été ajouté. Le mélange a été centrifugé 1 min à 13000g. Les échantillons ont été placés sur glace avant d'être déposés sur une gasket puis la lame a été positionnée dessus. Le montage a été refermé et placé dans un four d'hybridation pendant 17h à 65°C avec une rotation de 10rpm.

*Étape 5 : Lavage et lecture de la lame*

Après l'hybridation des ARN sur la lame, le montage a été séparé dans le tampon 1 (Agilent #5188-5327) puis la lame a été lavée successivement dans du tampon de lavage 1 puis 2 (Agilent #5188-5327). Elle a ensuite été placée dans un scanner de puces à ADN (Agilent

#G2505C) permettant sa lecture selon les critères suivants : canal vert (Cy3), résolution 3  $\mu\text{m}$ , résolution TIFF (20 bits) et XDR, Red PMT et Green PMT à 100%. Les données ont été extraites en utilisant le logiciel Feature Extraction 11.0 (Agilent Technologies). Un rapport de qualité a été émis pour chaque échantillon déposé. L'échantillon n'est validé que lorsqu'il répond positivement aux 10 critères d'évaluation de qualité. Un exemple de rapport de contrôle qualité généré par le logiciel Feature Extraction est présenté dans l'Annexe 4. On y distingue notamment la détection des spots aux 4 coins de la lame, la distribution spatiale des *outliers* ainsi que des données statistiques de contrôle interne.

### 2.7.2. Analyse des données de transcriptomique

Les données ont été analysées avec le logiciel GeneSpring 14.9-GX-PA (Agilent Technologies). Les données d'intensité ont été, dans un premier temps, normalisées par la méthode des percentiles (normalisation par rapport au 75<sup>ème</sup> percentile) puis distribuées dans une représentation en BoxPlot afin d'apprécier leur homogénéité. La ligne de base a ainsi été ramenée à la médiane des échantillons. Dans un second temps un contrôle qualité des échantillons (homogénéité des groupes) a été effectué par une vue 3D de la distribution des échantillons. Afin d'étudier les gènes modulés de manière significative entre deux conditions (Contrôle *versus* Traité) à différents temps de traitement (S4 et S6) les données ont été filtrées selon les critères suivants :

- Filtre sur les flags : les valeurs ont été conservées lorsqu'une intensité de fluorescence a été détectée dans au moins une condition dans 75% des échantillons.
- Filtre sur le niveau d'expression : les valeurs ont été conservées lorsque les sondes présentaient une intensité de fluorescence supérieure au bruit de fond (>150) dans au moins une condition dans 75% des échantillons.
- Filtre sur les percentiles : lorsque les sondes présentaient une intensité de fluorescence inférieure ou supérieures aux valeurs les plus extrêmes (20%) dans au moins une condition dans 75% des échantillons.

Pour déterminer la différence d'expression des gènes entre deux conditions à différents temps de traitement, nous avons réalisé un test ANOVA one-way avec une p-value < 0,05 et un fold-change de 1,5.

Des diagrammes de Venn ont été produits grâce au logiciel Venn Diagrams - Genomics Biotoools (<https://www.biotoools.fr>) et ont permis d'établir des comparaisons de gènes différentiellement exprimés entre les deux MWCNT testés après 4 et 6 semaines de traitement.

Les listes de gènes différentiellement exprimés ont été insérées dans la base de données EnrichR (Enrichr maayanlab.cloud) afin d'identifier les principales voies de signalisation cellulaire dans lesquels interviennent ces gènes. La base de données *Elsevier Pathway collection* a plus particulièrement été utilisée.

## 2.8. Analyses protéiques

### 2.8.1. Analyse du marqueur épithélial E-cadhérine par cytométrie en flux

La modification du marqueur extracellulaire des cellules épithéliales E-cadhérine a été déterminée à l'aide du cytomètre AccuriC6<sup>®</sup>. Ainsi,  $1.10^6$  cellules ont été centrifugées 5 min à 350g à 4°C. Le culot cellulaire a été lavé une fois avec 3 mL de PBS 1X puis remis en suspension dans 100 µL de tampon (PBS 1X, 0,5% BSA, 1 mM EDTA). Puis 10 µL d'anticorps E-cadherin-PE (Miltenyi #130-099-688) et 1 µL de marqueur de viabilité Viobility<sup>™</sup> (Miltenyi #130-110-207) ont été ajoutés afin de permettre le marquage de la protéine d'intérêt et la détermination du pourcentage de viabilité cellulaire. Un contrôle négatif a été constitué de cellules incubées avec 2 µL d'isotype Mouse IgG1-PE (Miltenyi #130-113-762). Le mélange a été incubé 10 min à température ambiante à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été centrifugées 10 min à 350g. Le culot cellulaire a été lavé 2 fois avec 1 mL de tampon puis remis en suspension dans un volume de 100 µL de tampon. Chaque échantillon a été analysé à raison de 10 000 événements comptés dans le canal d'intérêt dans la population totale de cellules préalablement délimitée. Le pourcentage de viabilité était supérieur à 98% dans la totalité des échantillons. Les cellules mortes ont été exclues de l'analyse grâce au marqueur Viobility<sup>™</sup>.

### 2.8.2. Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été extraites à partir de culots cellulaires de  $1.10^6$  cellules. Le culot a été remis en suspension dans 200 µL de tampon d'extraction MPER<sup>™</sup> (*Mammalian Protein Extraction Reagent*, Thermo Scientific #78501) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Complete*<sup>™</sup>, Thermo Scientific #04693132001) puis mélangé au vortex pendant 10 min à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 15 min à 14000g à 4°C. Les surnageants contenant les protéines totales ont été prélevés et les protéines ont été dosées par la méthode Bradford.

### 2.8.3. Dosage des protéines par la méthode Bradford

Une gamme étalon de BSA (*Bovine serum albumine*, BioRad #5000206) de 0 à 20 µg/mL a été réalisée en parallèle de chaque dosage protéique. Chaque échantillon a été dilué au 1/200<sup>ème</sup>. La réaction s'effectue en plaque 96 puits : 40 µL de réactif de Bradford (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, BioRad #500-0006) ont été ajoutés à 160 µL d'échantillon dilué, ou de point de la gamme. L'absorbance à 595 nm a été mesurée après homogénéisation par le lecteur de plaque infinite M200PRO piloté par le logiciel Magellan Pro 7.3. La concentration finale protéique a été déterminée à partir de l'équation de droite de la gamme étalon de BSA.

### 2.8.4. Western-Blot

Les protéines ont été mélangées à du tampon Laemmli (BioRad #161-0737) contenant du β-mercaptoéthanol (Sigma #M6250). Les échantillons ont ensuite été dénaturés par une incubation de 5 min à 99°C avant d'être déposés sur un gel à gradient de polyacrylamide de 4 à 20% (Criterion<sup>TM</sup> TGX Stain-Free, BioRad #5678094) avec le marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Kaleidoscope<sup>TM</sup> Prestained Protein Standards (BioRad #1610375). Les protéines (10 µg) ont migré pendant 1h40 à 200V dans une cuve de migration contenant du tampon TGS 1X (Tris/Glycine/SDS, BioRad #161-0772). La migration des protéines dans le gel a été vérifiée par une étape d'activation d'une molécule photosensible par les UV (1 min) présente dans le gel. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PolyVinylidene Fluoride (BioRad #170-4157) à l'aide du dispositif de transfert semi-liquide Trans-Blot Turbo<sup>TM</sup> (BioRad) à 2,5A pendant 10 min. Puis la membrane a été activée par une incubation de 1 min dans de l'éthanol 100% et rincée dans du TBST 1X (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20). L'étape de saturation de la membrane a été réalisée au cours d'une incubation de 1h à température ambiante dans du TBST 1X supplémenté avec 5% de lait. Les anticorps primaires et secondaires ont été préparés aux dilutions indiquées dans le Tableau 6 dans du TBST 1X supplémenté de 5% de BSA. La membrane a été incubée séquentiellement avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C sous agitation puis avec les anticorps secondaires couplés à la *horseradish peroxidase* (HRP) selon l'hôte de l'anticorps primaire pendant 1h sous agitation à température ambiante. La membrane a été lavée 3 fois 5 min avec du TBST 1X après chaque incubation. Enfin, la membrane a été incubée 5 min sous agitation, à l'obscurité, dans un mélange de solution de révélation (Clarity<sup>TM</sup> Western ECL Substrates, BioRad #170-5060). La détection et la quantification du signal de

chimioluminescence ont été réalisées par l'utilisation du système ChemiDoc™ (BioRad) à l'aide du logiciel Image Lab™ (BioRad).

**Tableau 6 : Conditions d'utilisation des anticorps pour Western Blot.**

Le nom et la taille de la protéine cible, les références des anticorps primaires et secondaires et leurs dilutions sont indiqués.

Cible	Poids moléculaire	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
<b>Actine-β</b>	42 kDa	Ref #3700 (Cell Signaling)	Anti-lapin
		Dilution : 1:1000	Dilution : 1:2000
<b>E-cadhérine</b>	135 kDa	Ref #14472 (Cell Signaling)	Anti-lapin
		Dilution : 1:1000	Dilution : 1:2000
<b>Vimentine</b>	57 kDa	Ref #5741 (Cell Signaling)	Anti-lapin
		Dilution : 1:1000	Dilution : 1:2000

### 2.9. Analyses statistiques des données *in vitro*

Les analyses statistiques des résultats obtenus *in vitro*, sauf pour les données de transcriptomiques, ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio (version 1.4.1103). Le seuil de significativité a été défini à 5%. Pour l'analyse des résultats, une transformation logarithmique a été appliquée aux valeurs brutes. Afin d'effectuer des comparaisons multiples, une ANOVA à un facteur a été réalisé, suivi d'un test post-hoc de comparaison multiples de Dunnett. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne).

## 3. Expériences menées *in vivo*

L'étude de la toxicité des MWCNT sur un modèle *in vivo* de rats sauvages et hétérozygotes p53<sup>+/-</sup> est le fruit d'un travail collaboratif inter-laboratoires. En effet, cette étude s'inscrit dans un projet à plus grande échelle, nécessitant l'intervention d'un grand nombre de personnes pour sa réalisation. Parmi ces dernières, Carole Seidel (Responsable d'études au laboratoire C.M.R.) et Laurent Gaté (Responsable du Laboratoire C.M.R.) ont participé à la conception du projet ainsi qu'aux démarches administratives. Carole Seidel, Laurent Gaté, Sylvie Sébillaud (Attachée d'études – Laboratoire C.M.R.), Mylène Lorcin (Technicienne de laboratoire – Laboratoire C.M.R.), Sylvie Michaux (Zootechnicienne – unité ASBA), Laurine Douteau (Zootechnicienne – unité ASBA) et moi-même avons participé à la réalisation des expositions des animaux ainsi qu'au traitement des différents échantillons collectés. Philippe Marsan

(Technicien de laboratoire - Laboratoire B.M.) et Anne-Marie Lambert-Xolin (Technicienne de Laboratoire – Laboratoire B.M.) ont participé au traitement des échantillons sanguins. Henrik Wolff du laboratoire Finnish Institute of Occupational Health (Topeliuksenkatu 41B 00250 Helsinki) a réalisé les analyses histopathologiques des poumons. Frédéric Cosnier (Laboratoire T.I.P.C.) a utilisé le modèle MPPD pour le calcul des doses d'exposition chez l'Homme.

### 3.1. Choix du modèle

Le modèle expérimental de référence permettant d'évaluer le potentiel cancérigène d'une substance chimique nécessite l'exposition d'animaux pendant deux ans à cette substance. Un seul test permettant d'identifier et de classer un agent cancérigène est reconnu à ce jour. Il s'agit d'un essai de cancérogenèse à long terme utilisant des rongeurs. Il a été publié en 2018 par l'OCDE : *« L'objectif d'une étude à long terme de cancérogenèse est d'observer des animaux d'essai au cours de la majeure partie de leur durée de vie, pour suivre le développement éventuel de lésions néoplasiques durant ou après l'exposition à diverses doses d'une substance d'essai par une voie d'administration appropriée. (...) Les deux sexes sont employés. Chaque groupe de dose et groupe témoin contient au moins 50 animaux de chaque sexe. Trois niveaux de dose et un témoin sont employés au moins. (...) La durée de l'étude est normalement de 24 mois pour les rongeurs. (...) Les résultats de ces études incluent des mesures (pesée, consommation de nourriture), et au moins, des observations quotidiennes détaillées, ainsi que l'autopsie générale et l'histopathologie. »* (OCDE, Essai n°451). Cette approche expérimentale est longue et coûteuse. Elle nécessite une infrastructure dédiée et fait intervenir un grand nombre d'animaux par substance testée. Développer des modèles expérimentaux *in vivo* alternatifs permettant d'obtenir des informations sur le potentiel cancérigène des MWCNT plus rapidement et d'utiliser moins d'animaux constitue un enjeu majeur. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser des rats génétiquement modifiés déficients pour le gène codant la protéine p53, protéine indispensable au maintien de l'intégrité du génome. La déficience de la protéine p53 rend les animaux plus susceptibles au développement de tumeurs qui se développent plus fréquemment et plus précocement que chez les rats dont le génome est intact.

### 3.2. Éthique animale, réglementation et hébergement

Les expérimentations animales ont été réalisées conformément à la législation et aux réglementations européennes et françaises relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Directive européenne 2010/63/UE et Décret 2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013) au sein d'une animalerie agréée par les services vétérinaires de la Direction départementale de la protection des populations de Meurthe et Moselle (Agrément D54-54-710). Le projet a été évalué par le Comité d'Éthique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale (CELMEA n°66) et autorisé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (autorisation APAFIS n°14910-201804301843804). Des rats Sprague Dawley femelles (Horizon Discovery) de génotype sauvage (WT) et hétérozygote pour p53 (OGM) ont été réceptionnés à un âge allant de 7 à 10 semaines. Ils ont été hébergés dans des cages ventilées individuellement (Tecniplast) avec des conditions environnementales standard (humidité relative :  $55 \pm 10\%$ , température :  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  et cycle lumière/obscurité 12/12h). Pendant les phases d'hébergement, les animaux avaient un accès libre et illimité à de l'eau et de la nourriture pour rats de laboratoire standards (A04 Safe diet) ainsi qu'un enrichissement par cage (tunnel en carton). Les animaux ont été répartis à un minimum de 2 animaux par cage et suivis quotidiennement.

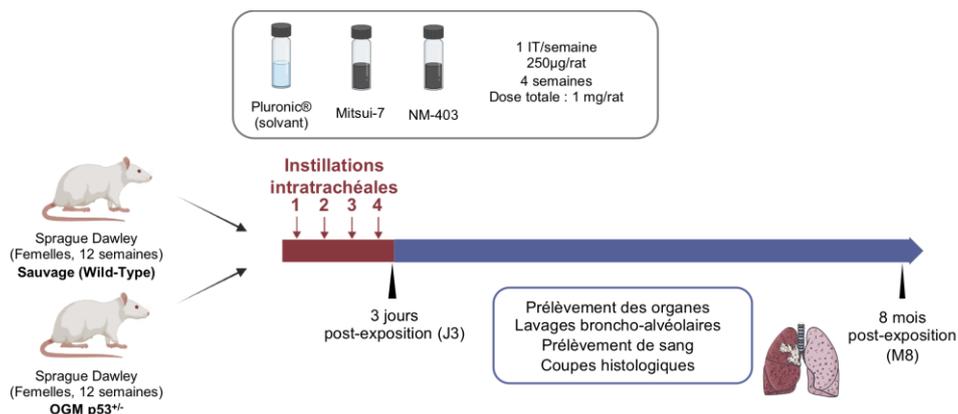
### 3.3. Génotypage des animaux

Afin de confirmer le génotype des animaux WT et OGM p53<sup>+/-</sup>, un génotypage a été réalisé sur chaque rat. Un échantillon de sang a été prélevé à la queue de l'animal sur anticoagulant (EDTA) puis congelé à  $-20^\circ\text{C}$ . L'ADN a été extrait avec le kit QIAmp DNA Blood Mini (Qiagen #2143234). Pour cela, 200  $\mu\text{L}$  de sang ont été mélangés avec 20  $\mu\text{L}$  de protéase et 200  $\mu\text{L}$  de Tampon AL puis mélangé au vortex pendant 15 sec et incubé 10 min à  $56^\circ\text{C}$ . Puis, 200  $\mu\text{L}$  d'éthanol 96-100% ont été ajoutés et la solution a été mélangée au vortex puis transférée sur une colonne QIAmp Mini Column. Celle-ci a été centrifugée 1 min à 6000g. La colonne a ensuite été lavée successivement avec 500  $\mu\text{L}$  de tampon AW1 puis AW2. L'ADN a été élué avec 50  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl pH 8,4 10 mM puis dosé au Nanophotometer (A<sub>260</sub>). Une PCR a été réalisée à partir de 100 ng d'ADN avec les amorces sens (5'-TCTCAAAGAACGGAAGGAA-3') et anti-sens (5'-CTACCAACCCACCAGCTCAC-3') ciblant le gène *Tp53* (McCoy *et al.*, 2013) et le kit Hot Star Taq Polymerase (Qiagen #203205). Pour un échantillon, 10  $\mu\text{L}$  de tampon PCR 10X, 2  $\mu\text{L}$  de mélange de dNTP à 10 mM, 0,5  $\mu\text{L}$

d'amorces sens (100 mM), 0,5  $\mu$ L d'amorces anti-sens (100 mM), 1  $\mu$ L de polymérase Hot Star Taq et 36  $\mu$ L d'eau ultrapure ont été ajoutés à 50  $\mu$ L d'ADN (100 ng) puis placés dans un thermocycleur selon le programme suivant : 15 min à 95°C, 30 cycles composés de 30 sec à 94°C, 30 sec à 50°C, 30 sec à 72°C, terminé par 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont migré sur un gel d'agarose 2,5% TAE 0,5X pendant 2h avec un marqueur de taille 25 pb. Les produits de PCR ont également été analysés grâce à l'utilisation du kit Agilent DNA 1000 Kit (©Agilent Technologies #5067-1504). Les réactifs (marqueur, gel matrice, intercalant) ont été préparés puis ajoutés à la puce selon les recommandations du fournisseur. Pour cela, 1  $\mu$ L d'ADNc (0,1-50 ng) par échantillon a été placé dans la puce puis dans le Bioanalyzer (©Agilent Technologies). Les résultats ont été interprétés avec le logiciel 2100 Expert. Le profil obtenu a permis d'identifier les produits de PCR ainsi que de déterminer leur taille sous forme d'un profil électrophorétique.

### 3.4. Design expérimental

Les groupes d'animaux WT et OGM ont été exposés aux MWCNT Mitsui-7 et NM-403 par instillation intra-trachéale (IT) à l'âge de 12 semaines selon le schéma suivant : 1 IT/semaine pendant 4 semaines à raison de 250  $\mu$ g/IT/rat (dose totale administrée : 1 mg/rat). Un groupe contrôle a été exposé par IT avec du Pluronic (milieu de dispersion des MWCNT). Un premier groupe d'animaux a été mis à mort 3 jours post-exposition (J3), un second groupe 8 mois post-exposition (M8), ceci permettant d'évaluer la toxicité des MWCNT, respectivement, à court et à long terme (Figure 22).



**Figure 22 : Protocole expérimental d'exposition des rats WT et OGM aux MWCNT.**

Les animaux ont été exposés aux MWCNT par 4 instillations intratrachéales de 250  $\mu$ g/rat (IT). Un premier groupe a été mis à mort 3 jours post-exposition, et un second 8 mois post-exposition. Aux deux temps de mise à mort, les organes ont été prélevés, un lavage broncho-alvéolaire a été effectué et une analyse histopathologique a été réalisée.

### 3.5. Constitution des groupes d'animaux

Les rats Sprague Dawley (WT ou OGM) ont été divisés dans les différents lots de manière aléatoire : un lot témoin négatif (Pluronic) et un lot exposé pour chaque MWCNT : Mitsui-7 et NM-403 (Tableau 7). Des rats ont été exposés au N-éthyl-N-nitrosourée (ENU, Sigma Aldrich #N3385) et constituent des contrôles positifs pour le test des micronoyaux.

**Tableau 7 : Nombre d'animaux par groupe et par temps d'exposition.**

Les animaux ont été randomisés afin d'éviter un effet de lot. Les IT réalisées sur chaque animal ont été réalisées par des expérimentateurs différents et de façon alternative entre le matin et l'après-midi afin d'éviter un effet expérimentateur ou un effet temps.

		Temps post-exposition		Nombre total d'animaux
		3 jours	8 mois	
WT	Pluronic	8	13	21
	Mitsui-7	6	12	18
	NM-403	7	13	20
	ENU	2	2	4
OGM p53 <sup>+/-</sup>	Pluronic	7	15	22
	Mitsui-7	6	15	21
	NM-403	5	15	20
	ENU	2	0	2

### 3.6. Voies d'exposition des animaux

#### 3.6.1. Exposition par instillation intra-trachéale

Les MWCNT Mitsui-7 et NM-403 ont été administrés 1 fois par semaine pendant 4 semaines par IT aux rats WT et OGM ayant atteint l'âge de 12 semaines à la première IT. Dans un premier temps les MWCNT ont été dispersés dans du Pluronic (Sigma Aldrich #P5556) 0,1%, NaCl 0,9% à une concentration de 1 mg/mL. L'animal a été préalablement anesthésié avec un mélange domitor-kétamine (Labcorp, 0,25 mg/kg – 40 mg/kg) par voie intrapéritonéale. La partie téflon d'un cathéter IV Terumo Surflo 16G a ensuite été introduit par la gueule de l'animal dans sa trachée. Une solution d'Antisedan (Labcorp, 1,25 mg/kg) a été injectée par voie sous-cutanée. Puis, 250 µL de solution de Pluronic ou de MWCNT suivis de 500 µL d'air ont été instillés à l'aide d'une seringue de 1 mL avant que l'animal ne se réveille. Ce dernier a ensuite été tenu en observation jusqu'à son réveil complet. Les instillations intra-trachéales ont été réalisées par Carole Seidel, Sylvie Sébillaud, Mylène Lorcin et moi-même avec l'aide des zootechniciennes.

### 3.6.2. Exposition par gavage

Les rats ont été exposés à l'ENU à 48h et 24h avant la mise à mort à une dose respectivement de 50 mg/kg et 25 mg/kg. Deux solutions de ENU ont été préalablement préparées stérilement extemporanément. Dans un tube conique, une solution à 5 mg/mL et une seconde à 2,5 mg/mL de ENU ont été préparées selon les doses de traitement souhaitées (respectivement 50 mg/kg et 25 mg/kg). Puis, 1 mL de cette solution a été administrée pour 100 g de rat par gavage. Les gavages ont été réalisés par Sylvie Sébillaud.

### 3.7. Suivi des animaux et bien-être animal

Avant le protocole d'exposition des animaux, ces derniers ont été pris en charge par l'ensemble des personnes amenées à interagir avec eux. En effet, une phase d'habituation, permettant aux animaux de s'acclimater, a permis de faciliter leur manipulation et leur préhension. Lors des expositions, une attention particulière a été portée à chaque animal de l'anesthésie jusqu'au réveil. À partir de la 1<sup>ère</sup> IT, une fiche de suivi d'animaux a été établie (Annexe 5). Les animaux ont été pesés et observés quotidiennement à partir de la première IT jusqu'à la mise à mort pour les animaux mis à mort à J3 et 3 fois par semaine pour les animaux suivis pendant 8 mois sous condition d'absence de signe clinique. Des points limites ont été établis et un score a été attribué à chacun d'entre eux (Tableau 8). L'arrêt du protocole expérimental pour l'animal et sa mise à mort était effective dès que le score était égal ou supérieur à 10.

#### **Tableau 8 : Liste des points limites et leurs scores correspondants.**

Un nombre de point a été attribué à chaque point limite. Le protocole expérimental a été stoppé et l'animal a été mis à mort dès lors que le score était  $\geq 10$ . IT : instillation intra-trachéale.

Signes cliniques	Points	Signes cliniques	Points
Perte de poids de 10% en 1 semaine	5	Prostration, piloérection sévère	5
Perte de poids de 20% en 1 semaine	10	Tremblements, convulsions	6
Apparition de masses palpables dont le diamètre en mm est inférieur à 10% du poids total de l'animal	5	Apparition de masses empêchant l'animal de se nourrir, s'hydrater ou se déplacer	10
Apparition de masses palpables dont le diamètre en mm supérieur à 10% du poids	10	Lésions cutanées étendues, plaies purulentes	3
Distension abdominal inférieur à 20%	5	Salivation (sauf juste après IT)	6
Distension abdominal supérieur à 20%	10	Diarrhée depuis moins de 3 jours	5
Apparition de masses internes palpables	10	Diarrhée depuis plus de 3 jours	10
		Léthargie, sommeil, coma	10

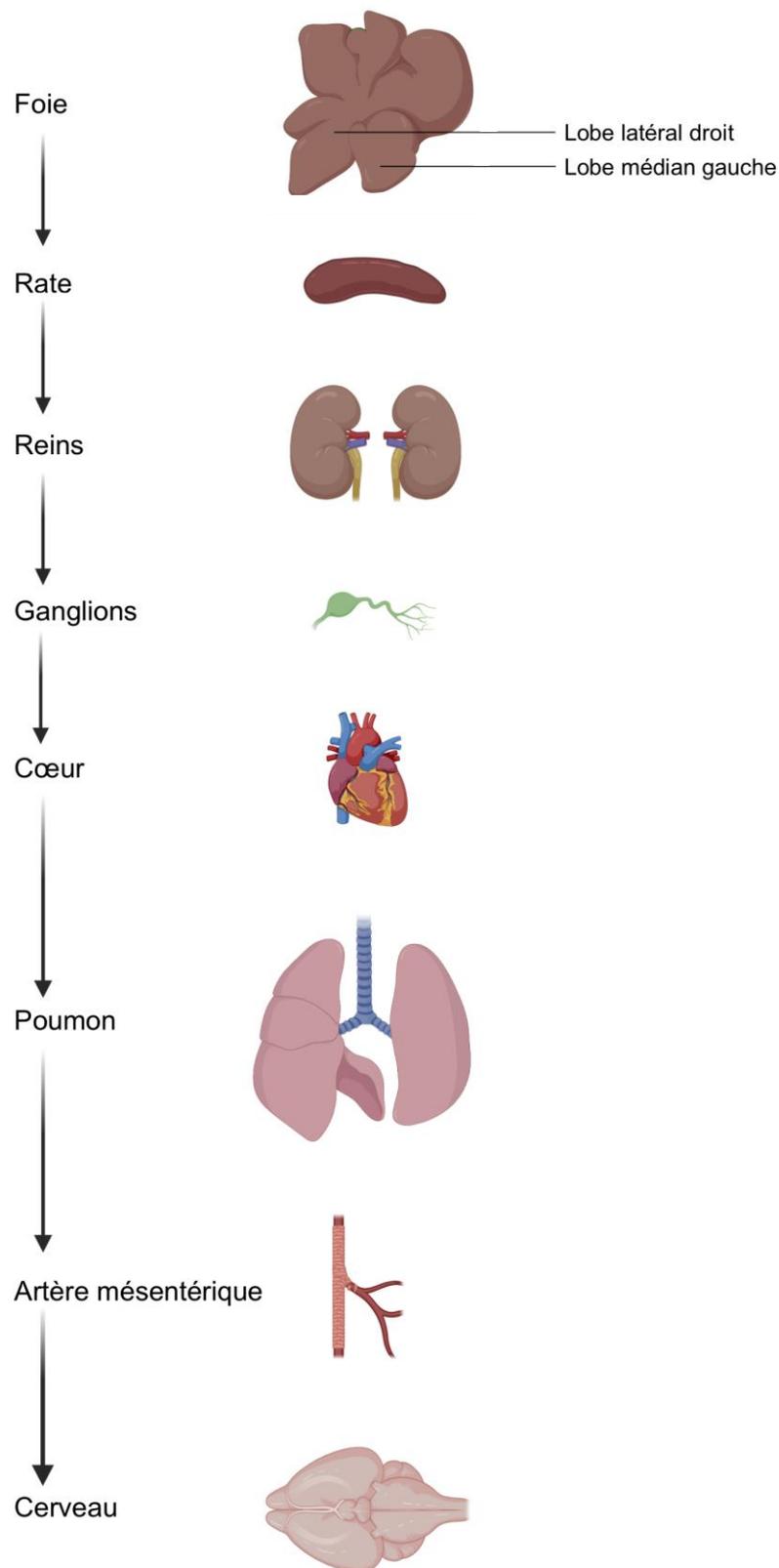
### 3.8. Protocole d'anesthésie et de mise à mort des animaux

#### 3.8.1. Mise à mort

Les animaux WT et OGM ont été mis à mort 3 jours et 8 mois après la dernière IT. Afin d'éviter un effet du cycle circadien, les animaux des différents groupes ont été mis à mort alternativement tout au long de la journée. L'animal a été anesthésié par injection d'un mélange xylazine-kétamine (10 mg/kg – 75 mg/kg) par voie intrapéritonéale. Une fois l'anesthésie profonde obtenue, l'animal a été maintenu en décubitus dorsal sur une planche. Ensuite, du sang a été prélevé à la queue de l'animal à l'aide d'un cathéter IV Surflo Térumo 24G (# SR-OX2419CA) puis transféré dans un tube Microvette 500 K3EDTA (Sarstedt). L'animal a été mis à mort par exsanguination à l'aorte abdominale. Pour ce faire, le poil de l'animal a été imbibé avec de l'éthanol 70% et l'abdomen a été ouvert. Puis l'aorte abdominale a été dégagée et à l'aide d'un microperfuseur Microflex 18G (Vigon SA #246-122), le sang de l'animal a été collecté dans 1 tube Venosafe Sec (Vigon SA #VF053SP) et 1 tube Venosafe Héparine de lithium (Vigon SA #VF054SHL) puis le reste du sang a été collecté dans un flacon de prélèvement de 60 mL en polystyrène. À l'arrêt de l'écoulement sanguin, l'aiguille a été retirée et un coton a été placé sur le point de prélèvement.

#### 3.8.2. Collecte des tissus

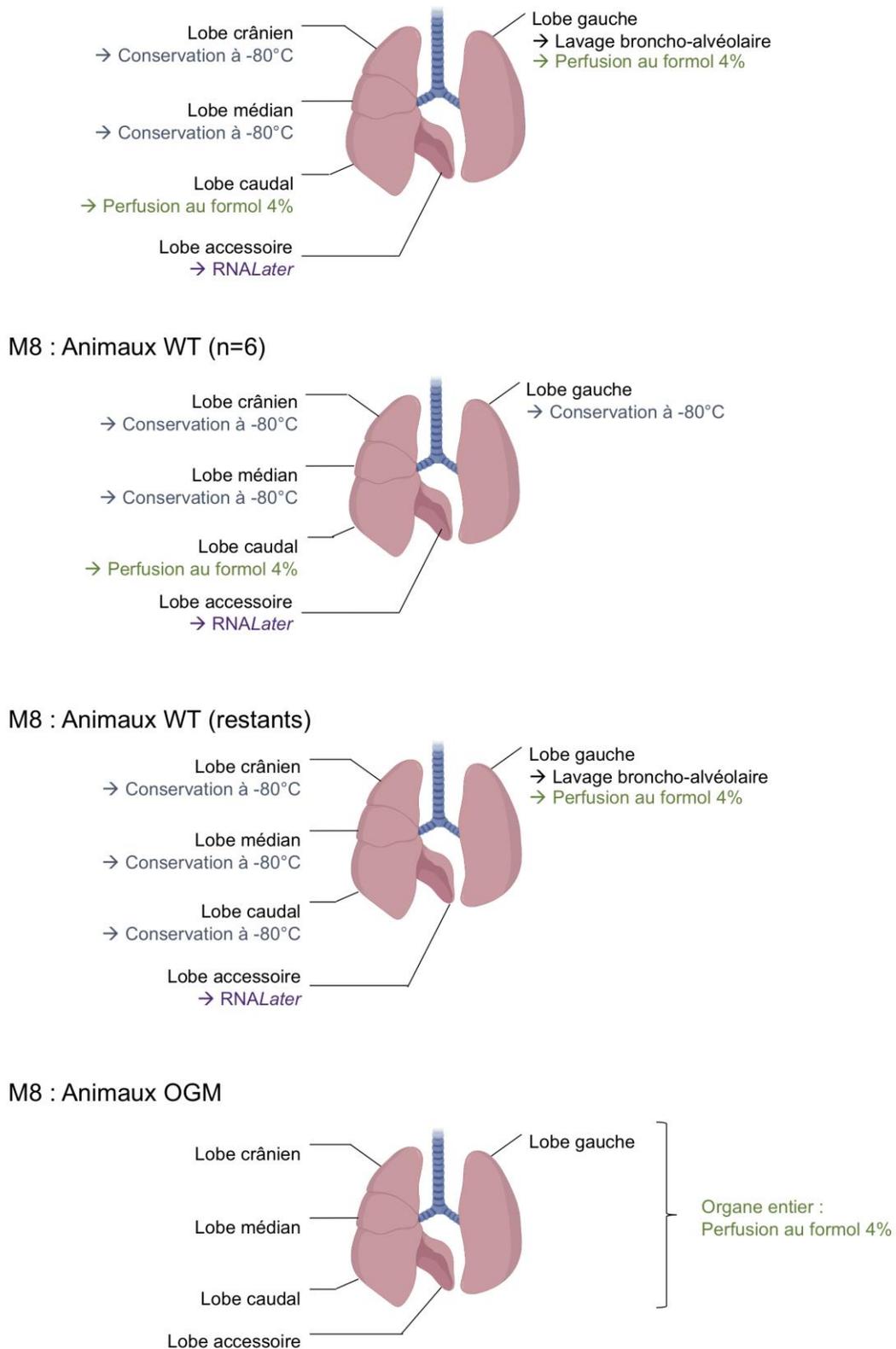
La collecte des organes s'est déroulée dans l'ordre décrit dans la Figure 23. Le foie a été retiré puis placé en vue viscérale. L'organe a été pesé puis le lobe latéral droit a été sectionné et placé dans une cassette histologique. Le lobe médian gauche a également été sectionné et placé dans un tube contenant 3 mL de tampon RNAlater (Invitrogen # 10427114). Le reste du foie a été immédiatement congelé dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C. La rate a ensuite été prélevée puis pesée. Les 2/3 de l'organe ont été congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C et le reste a été placé dans une cassette histologique. Ensuite, les reins ont été prélevés puis pesés. Le rein droit a été placé dans une cassette histologique et le rein gauche a été congelé dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C. Les ganglions associés au poumon ont été prélevés et placés dans une cassette histologique. Enfin, la trachée a été sectionnée le plus loin possible du poumon et le bloc poumon-cœur a été retiré. Le cœur a été congelé dans de l'azote liquide puis conservé à -80°C. Enfin, l'artère mésentérique et le cerveau ont été prélevés puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.



**Figure 23 : Ordre de collecte des tissus des animaux WT ou OGM après leur mise à mort.** Après anesthésie de l'animal, ce dernier est mis à mort par exsanguination à l'aorte abdominale. Le sang, puis les différents organes ont été prélevés successivement.

Le traitement du poumon diffère entre les deux temps de mise à mort (Figure 24). Au temps J3, le poumon est retiré de la cage thoracique puis pesé. Le lobe accessoire est ligaturé, prélevé puis placé dans 3 mL de tampon RNAlater. Le lobe crânien et le lobe médian sont ligaturés, prélevés puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Le lobe caudal est clampé puis le lavage broncho-alvéolaire est réalisé dans le poumon gauche. Ce dernier est ensuite perfusé avec 3 mL de formol tamponné 4% (Sigma Aldrich # HT501128) puis ligaturé. Le clamp du lobe caudal est retiré puis il est perfusé avec 2 mL de formol 4% et ligaturé. Le lobe caudal et le poumon gauche sont sectionnés au-dessus de la ligature puis placés dans une cassette d'histologie dans du formol tamponné 4%. Après 24h d'immersion les lobes gauche et caudal sont coupés longitudinalement de manière à faciliter l'accessibilité des solvants lors de la déshydratation des organes puis immergés dans de l'éthanol 70%. Au temps 8 mois, le poumon est retiré de la cage thoracique puis pesé pour les animaux WT et OGM :

- Pour 6 animaux WT de chaque groupe, le lobe accessoire est ligaturé, prélevé puis placé dans 3 mL de tampon RNAlater. Les lobes crânien, médian et gauche sont ligaturés puis prélevés avant d'être congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Le lobe caudal est perfusé avec 2 mL de formol tamponné 4% puis placé dans une cassette d'histologie dans du formol tamponné 4%. Après 24h d'immersion le lobe caudal est coupé longitudinalement puis immergé dans de l'éthanol 70%.
- Pour les animaux WT restants (6 à 7 rat/groupe), le poumon droit est clampé, le lobe accessoire est ligaturé, prélevé puis placé dans 3 mL de tampon RNAlater. Les lobes crânien, médian et caudal sont ligaturés, prélevés puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Le lavage broncho-alvéolaire est réalisé sur le poumon gauche. Ce dernier est ensuite perfusé avec 3 mL de formol tamponné 4% puis ligaturé et placé dans une cassette d'histologie dans du formol tamponné 4%. Après 24h d'immersion le lobe gauche est coupé longitudinalement puis immergé dans de l'éthanol 70%.
- Pour les animaux OGM, le poumon entier est perfusé avec 8 mL de formol 4% puis placé dans une cassette d'histologie dans du formol tamponné 4%. Après 24h d'immersion, chaque lobe du poumon est coupé longitudinalement puis immergés dans de l'éthanol 70%.



**Figure 24 : Prélèvement et traitement des lobes pulmonaires des animaux WT et OGM aux temps J3 et M8.**

Les poumons sont prélevés chez tous les animaux WT et OGM, le traitement des différents lobes pulmonaires varie entre les animaux WT et OGM ainsi qu'entre les différents temps de traitement.

### 3.9. Analyses du lavage broncho-alvéolaire

#### 3.9.1. Réalisation et traitement du lavage broncho-alvéolaire

Un lavage broncho-alvéolaire (LBA) a été réalisé sur le poumon gauche une fois l'organe prélevé. Différents expérimentateurs ont réalisé le LBA des animaux des différents groupes afin d'éviter un effet expérimentateur. L'extrémité de la tubulure d'un microperfuseur Microflex 18G munie du Luerlock a été insérée dans la trachée. Le LBA du poumon gauche a été réalisé par injection puis aspiration de 4 mL de PBS 1X froid à l'aide d'une seringue. Le liquide collecté a été placé dans un tube conique de 15 mL puis placé dans la glace (tube 1). Ce même geste a ensuite été répété 4x avec 4 mL de PBS 1X froid, l'ensemble du liquide collecté a été placé dans un second tube conique de 15 mL puis placé dans la glace (tube 2). Les deux tubes collectés lors de la réalisation du LBA ont été centrifugés 5 min à 400g à 4°C. Le surnageant du tube 1 a été réparti par 500 µL dans 6 tubes dont 5 stockés à -80°C, et un à 4°C pour la réalisation d'analyses biochimiques extemporanées. Le surnageant du second tube a été aspiré, le culot a été remis en suspension dans 300 µL de PBS 1X. Le liquide a été transféré dans le tube 1 où le culot a été mis en suspension. Le nombre de cellules et le pourcentage de viabilité cellulaire ont été déterminés grâce à un mélange d'AO/IP, le comptage a été effectué à l'aide du Cellometer<sup>®</sup>. Le volume de la suspension a ensuite été ajusté à une concentration cellulaire de  $1.10^6$  cellules/mL, puis 1 mL de PBS 1X a été ajouté. Quatre cyto-centrifugations sur lames superfrost (Fisher Scientific # 10149870) de 75, 100, 150 et 200 µL ont été réalisées à une vitesse de 650rpm pendant 5 min à l'aide du Cytofuge 2 (StatSpin, TRIOLAB, Brøndby, Danemark) puis fixées pendant 3 min dans du méthanol (VWR #20847.295). Enfin, le restant de suspension a été centrifugé 5 min à 400g à 4°C. Le surnageant a été aspiré et le culot cellulaire a été repris avec 350 µL de tampon RLT-β-mercaptoéthanol et congelé à -20°C.

#### 3.9.2. Cytologie du lavage broncho-alvéolaire

La coloration de May Grünwald (éosinate de bleu de méthylène) Giemsa (éosinate d'azur de méthylène) permet l'action successive des deux colorants neutres. Chaque colorant contient des ions colorés acides (éosine) et basiques (bleu et azur de méthylène) qui se fixent sur les structures cellulaires. Ainsi, les structures basiques captent les ions éosinates (coloration rosée des hématies et du cytoplasme des granulocytes,) et les structures acides captent le bleu de méthylène (coloration bleu du cytoplasme des cellules mononucléaires et des plaquettes) ou

l'azur de méthylène (coloration rouge des granulations de monocytes, des grands lymphocytes et des thrombocytes). Certaines structures cellulaires peuvent capter à la fois les ions acides et basiques, c'est le cas de la chromatine présente dans les cellules nucléées mais également des granulations des granulocytes neutrophiles. Cette coloration permet de distinguer les différentes cellules. Après fixation au méthanol, les lames de LBA ont été soumises aux étapes suivantes : coloration au May-Grünwald (Merck #1.01424.1000) pendant 3 min, coloration au May-Grünwald dilué au 1/2 dans du tampon phosphate à 0,1 M pendant 1 min, coloration au Giemsa (Merck #1.09204.500) dilué au 1/10 dans du tampon phosphate à 0,1 M pendant 20 min, puis rincées dans du tampon phosphate pendant 5 sec, égouttées et séchées. Une lamelle a été montée à l'aide d'EntellanF (Sigma Aldrich #1.07961.0100). Lors de la lecture de la cytologie, les lames ont été randomisées en aveugle puis 500 cellules/échantillon ont été comptées au microscope optique. Parmi ces dernières, les granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), les macrophages et les lymphocytes ont été dénombrés.

### 3.9.3. Analyses biochimiques du lavage broncho-alvéolaire

Les analyses biochimiques du LBA ont été réalisées à partir des tubes décrits dans le paragraphe 7.10.1. à l'aide de l'automate Pentra400 (Horiba, Montpellier). L'activité des enzymes phosphatase alcaline (PAL, #A11A01626) et LDH (#A11A01824) ont été mesurées grâce aux kits ABX Pentra. La NAG (N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) a été quantifiée séparément à l'aide du kit NAG Test kit (Helier Scientific #1290050/1290100). Les principes de dosage font intervenir des réactions colorimétriques. Les protéines totales ont été évaluées avec le kit DC Protein Assay (BioRad #5000111).

## 3.10. Traitement du sang

### 3.10.1. Hématologie

Le sang prélevé à la queue dans un tube microvrette K<sub>3</sub>EDTA a permis d'établir la formule sanguine comprenant la numération des hématies, des leucocytes et des plaquettes à l'aide d'un automate d'hématologie à usage vétérinaire ProCyteDX (©2014 IDEXX Laboratories, Inc., Eragny sur Oise, France). La méthode de mesure est basée sur la cytométrie en flux.

### 3.10.2. Biochimie du plasma

Le sang prélevé à l'aorte abdominale dans un tube Lithium-héparine a été centrifugé 10 min à 1500g. Le plasma a été collecté afin de réaliser les analyses biochimiques avec l'automate Pentra400. L'activité des enzymes suivantes ont été mesurées grâce au kits ABX Pentra : la PAL (#A11A01626), la glutamate oxyloAcétate transaminase (GOT,#A11A01627), la glutamate pyruvate transaminase (GPT,#A11A01629) et la LDH (#A11A01824). La quantité de bilirubine, d'urée et de créatinine a été déterminée à l'aide des kits ABX Pentra (#A11A01639, #A11A01641, #A11A01933).

### 3.10.3. Test des micronoyaux

Le sang prélevé à la queue a été utilisé afin d'effectuer le test des micronoyaux à l'aide du kit MicroFlowPlus Rat Blood (Litron Laboratories, BD Biosciences #552731). Pour réaliser le test, 100 µL de sang ont été déposés dans un tube contenant 350 µL d'anticoagulant puis mélangé doucement par aspiration refoulement et conservés à 4°C sur la journée. Puis, 180 µL de ce mélange ont été ajouté au goutte à goutte sous agitation à un tube contenant 2 mL de méthanol (VWR #20847.295) à -80°C. Le tube a ensuite été mélangé au vortex puis remplacé à -80°C jusqu'à l'analyse. Pour l'analyse, 12 mL de solution tampon (contenant 1% de sérum de veau foetal) ont été ajoutés à chaque échantillon qui ont ensuite été centrifugés 5 min à 400g à 4°C. Le surnageant a été aspiré et le culot a été resuspendu dans 50 µL de surnageant restant. Trois standards fournis par le kit ont été préparés dans la solution tampon : un contrôle positif (taux élevé de micronoyaux), un contrôle négatif (taux bas de micronoyaux) et un contrôle standard Malaria utilisé pour la calibration du cytomètre. Une solution de marquage (LS1) a été préparée dans la solution tampon, avec de la RNase et un anticorps anti-CD71-FITC (marquage des réticulocytes). Une deuxième solution de marquage (LS2) a été préparée à partir de la solution LS1 à laquelle a été ajouté l'anticorps anti-CD61-PE (marquage des plaquettes). Ainsi, seuls le contrôle négatif et le contrôle Malaria ont été incubés avec la solution LS1 et l'ensemble des échantillons ont été incubés avec la solution LS2 pendant 30 min à 4°C à l'obscurité puis pendant 30 min à température ambiante à l'obscurité pour permettre la dégradation de l'ARN. Un volume de 2 mL de solution d'IP (fournie par le kit) a été ajouté extemporanément avant l'analyse par cytométrie en flux (CANTO II, Becton Dickinson). L'analyse des données a été effectuée à l'aide logiciel du Canto FACSDiva comme suit : élimination des plaquettes, compensation du signal FL1-FL2, calcul du pourcentage des micronoyaux.

### 3.11. Analyses histologiques

Le lobe pulmonaire caudal des rats OGM à J3 et des rats WT à M8, et le poumon entier des rats OGM à M8 ont été lentement remplis et fixés avec du formaldéhyde tamponné neutre à 4 % (Sigma Aldrich). Après déshydratation, ils ont été inclus dans de la paraffine, les blocs de tissus ont été sectionnés et les lames ont été colorées à l'aide de la technique de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine ou au rouge Sirius avant l'analyse histopathologique par microscopie à champ clair. Les analyses histologiques ont été menées par Henrik Wolff du laboratoire Finnish Institute of Occupational Health (Topeliuksenkatu 41B 00250 Helsinki).

### 3.12. Analyses statistiques des données *in vivo*

Les analyses statistiques des résultats obtenus *in vivo* ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio (version 1.4.1103). Le seuil de significativité a été défini à 5%. Un modèle linéaire suivi d'un test de comparaison multiples de Dunnett a été appliqué. Les données sont exprimées en médiane avec le premier (Q1) et le troisième (Q3) quartile correspondant, respectivement à 25 et 75% des scores.

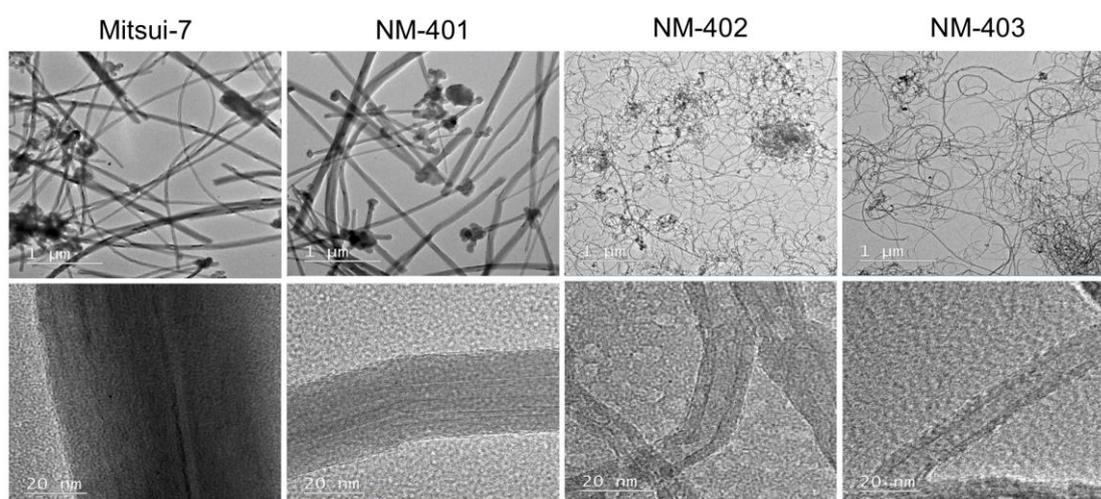


# IV. Résultats

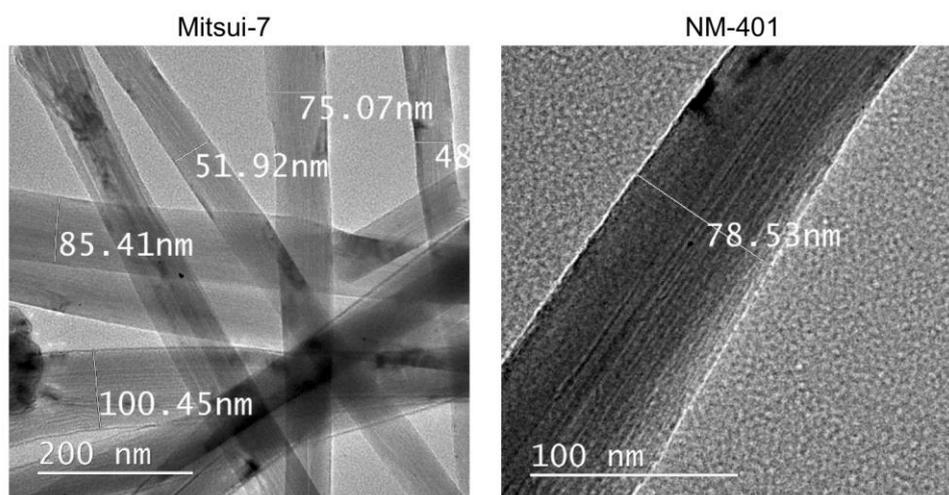
## 1. Caractérisation des nanotubes de carbone

Les poudres de Mitsui-7, NM-401, NM-402 et NM-403 ont été caractérisées par une approche utilisant la microscopie électronique à transmission. La Figure 25A montre une série d'images qui permettent d'apprécier la longueur, le diamètre et la forme de chaque MWCNT. Alors que le Mitsui-7 et le NM-401 ont une forme droite, les NM-402 et NM-403 présentent une forme plus enchevêtrée et aléatoire. Les images des panneaux inférieurs permettent de distinguer les multiples parois des MWCNT.

A



B



**Figure 25 : Images des nanotubes de carbone en microscopie électronique à transmission.**

(A) Les images représentent les MWCNT Mitsui-7, NM-401, NM-402 et NM-403. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$  (images supérieures) et 20 nm (images inférieures). (B) Le diamètre moyen des MWCNT a été déterminé à partir d'images prises par TEM. Échelles : 200 et 100 nm.

Le diamètre moyen de chaque MWCNT a été mesuré à partir de ces images (Figure 25B), il représente la moyenne de 100 mesures effectuées au hasard (Tableau 9). À contrario, les longueurs des MWCNT n'ont pas pu être mesurées par cette approche. En parallèle, l'instrument Belsorp Max a été utilisé pour déterminer la surface spécifique de chaque MWCNT. Cette méthode est basée sur le principe d'adsorption physique de molécules de gaz sur une surface solide. Les valeurs moyennes de diamètres et de surfaces spécifiques sont présentées dans le Tableau 9. Ils permettent de constater que le Mitsui-7 et le NM-401 ont un diamètre et une surface spécifique compris dans le même ordre de grandeur, respectivement d'environ 80 nm et 15 g/m<sup>2</sup>. Les NM-402 et NM-403 partagent également des similitudes, ils ont un diamètre moyen de 12 nm et une surface spécifique d'environ 200 g/m<sup>2</sup>. Les mesures réalisées au laboratoire coïncident avec celles décrites dans la littérature (Jackson *et al.*, 2015, Gate *et al.*, 2019).

**Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques des nanotubes de carbone.**

Le diamètre et la surface spécifique ont été mesurés au laboratoire. Les données obtenues ont été comparées à celles indiquées dans la littérature (Jackson *et al.*, 2015, Gate *et al.*, 2019).

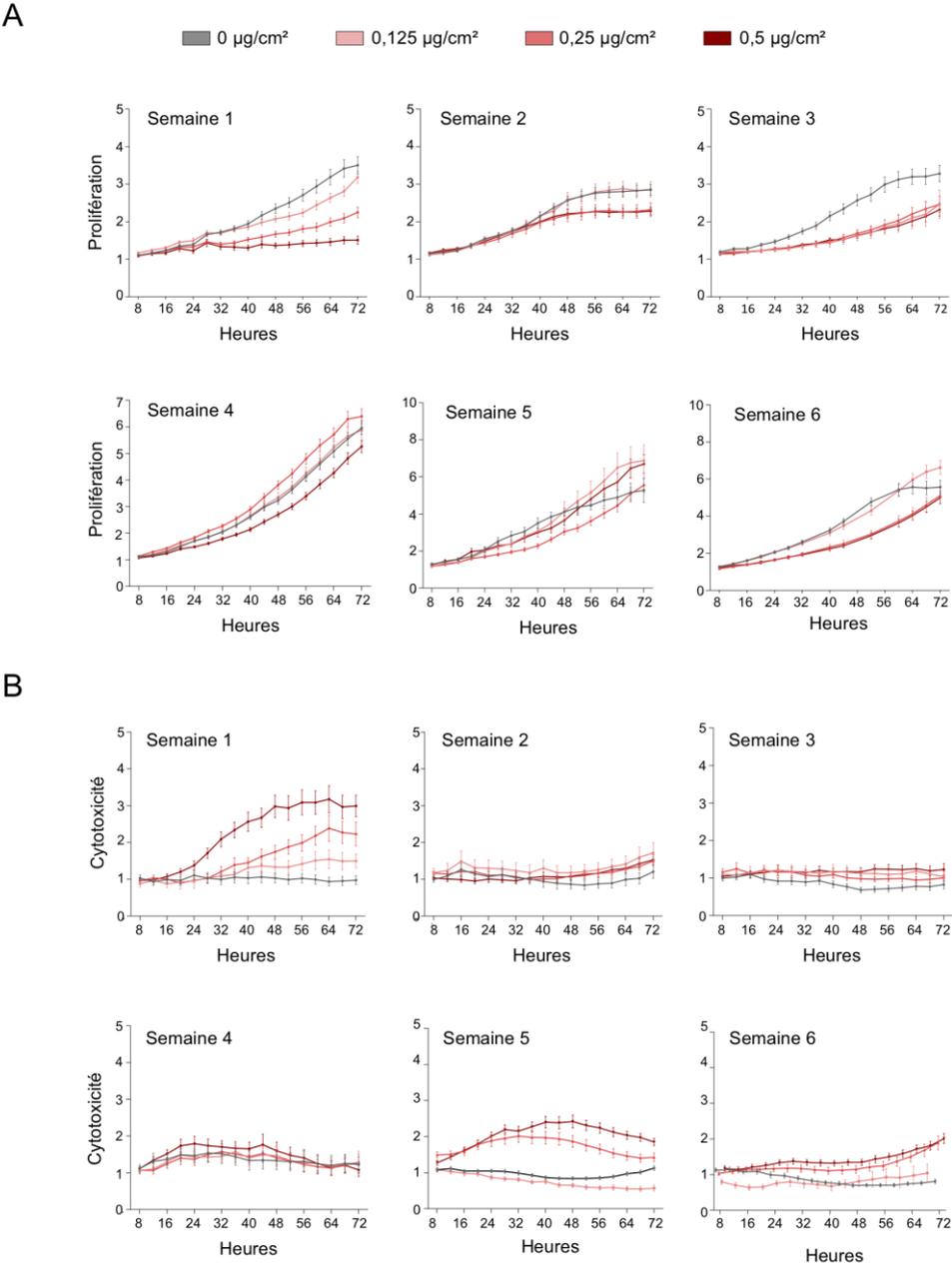
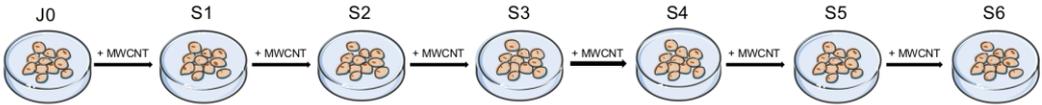
	Diamètre (nm) publié	Diamètre (nm) mesuré	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g) publiée	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g) mesurée
Mitsui-7	74 (29-173)	80 (33-190)	26	15
NM-401	67 (24-138)	78 (24-150)	18	13
NM-402	11 (7-20)	12 (6-20)	226	198
NM-403	12 (5-37)	12 (5-25)	135	187

## 2. Étude de la toxicité des MWCNT *in vitro*

### 2.1. Effets antiprolifératifs et cytotoxiques

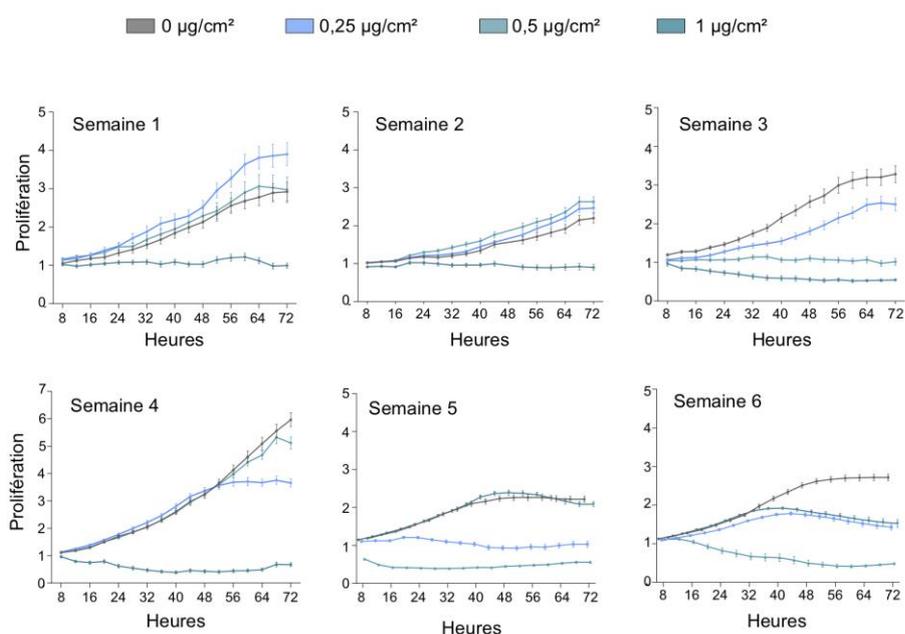
Afin de déterminer l'impact des MWCNT sur la prolifération cellulaire ainsi que leur cytotoxicité, les cellules BEAS-2B ont été cultivées en présence des différents MWCNT pendant 6 semaines. Les cellules ont été marquées à l'aide du réactif NuLight Rapid Red Reagent®, qui colore les noyaux des cellules en rouge, et Cytotox Green Reagent®, qui colore les cellules mortes en vert. Le nombre total de cellules et le nombre de cellules mortes ont été comptés à intervalle de temps régulier par l'utilisation d'imagerie cellulaire en temps réel. Comme montré dans la Figure 26A, le traitement des cellules avec le Mitsui-7 a ralenti de façon dépendante de la concentration la prolifération cellulaire pendant la 1<sup>ère</sup> semaine de traitement.

La concentration la plus haute de Mitsui-7 a également ralenti la prolifération cellulaire pendant les 6 semaines de traitement alors que les cellules traitées avec les concentrations plus faibles avaient une prolifération similaire au contrôle aux semaines 4 et 5 (Figure 26A).

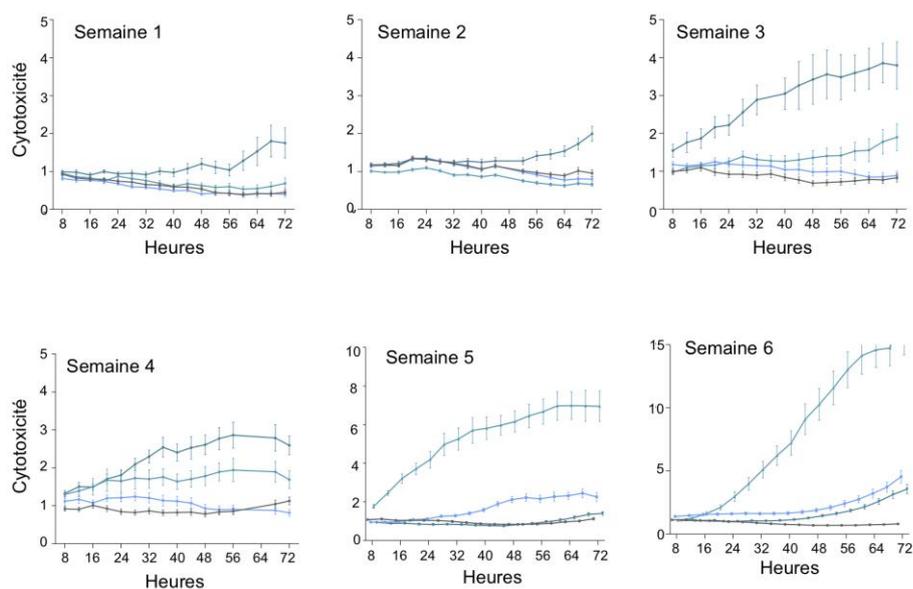


Légende sur la page suivante.

C



D



### Figure 26 : Effets antiprolifératif et cytotoxique des MWCNT.

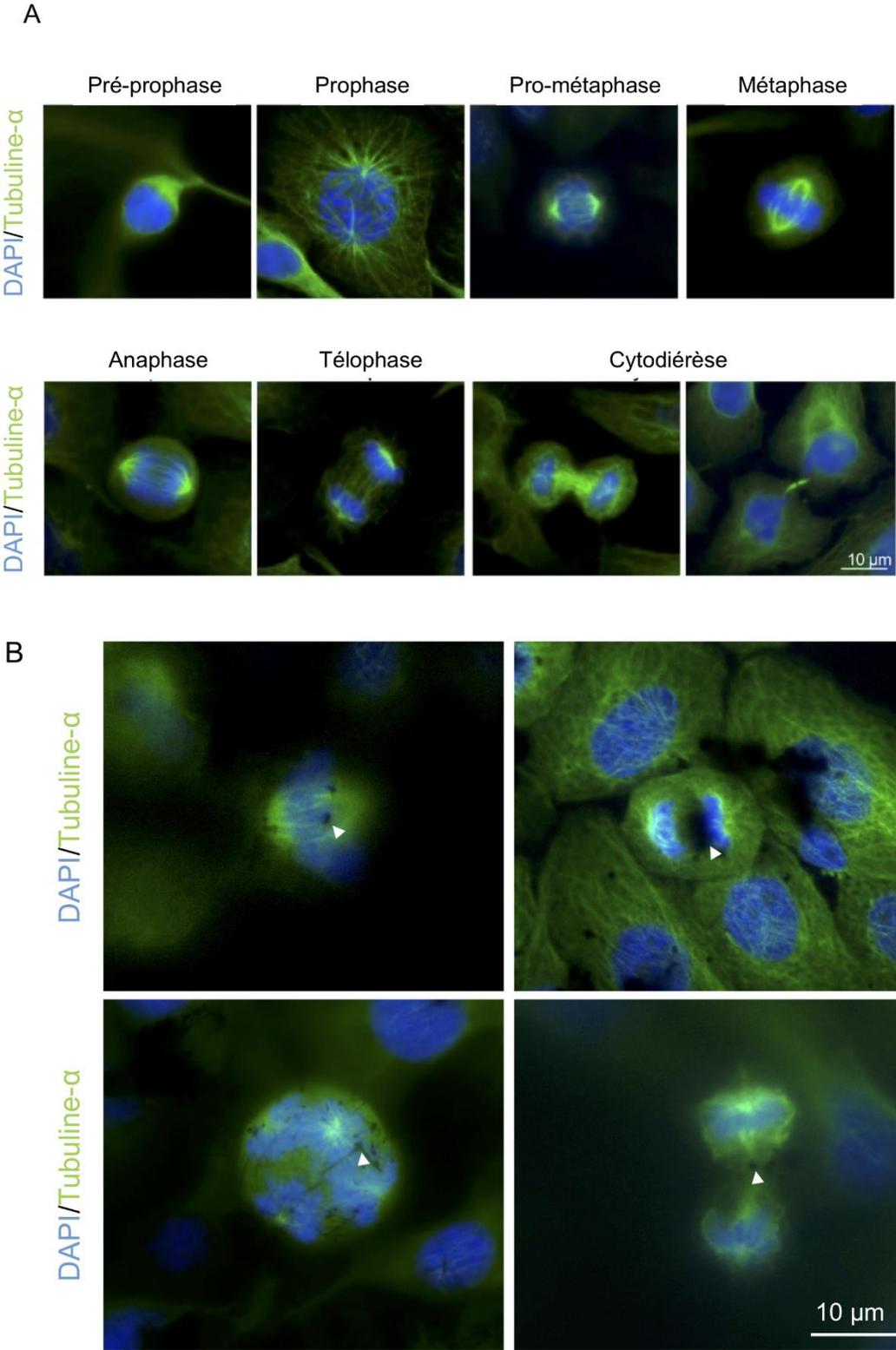
Les cellules BEAS-2B ont été traitées avec du Mitsui-7 (A et B) ou du NM-403 (C et D) aux concentrations indiquées pendant 6 semaines consécutives. (A et C) La prolifération cellulaire a été mesurée en utilisant le réactif NucLight qui permet de marquer toutes les cellules. (B et D) La cytotoxicité a été déterminée en utilisant les réactifs NucLight et Cytotox qui permettent d'établir le ratio cellules mortes/cellules totales. Les données ont été normalisées au premier point d'acquisition après ajout des sondes fluorescentes (4h). Les graphiques sont représentatifs de 3 et 2 expériences indépendantes, respectivement, pour les semaines 1 à 4 et 5 à 6.

Un effet cytotoxique a été observé uniquement pendant la 1<sup>ère</sup> et la 5<sup>ème</sup> semaine de traitement avec le Mitsui-7 (Figure 26 B). Pendant la S1, l'effet cytotoxique était présent dès la plus faible concentration et de façon dépendante de la concentration, alors que pendant la S5 l'effet cytotoxique n'a été évident qu'aux traitements avec les deux concentrations les plus hautes (0,25 et 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Figure 26B). En parallèle des traitements au Mitsui-7, les cellules BEAS-2B ont été cultivées en présence du MWCNT NM-403. Lors du traitement des cellules avec 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NM-403, une forte inhibition de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de la cytotoxicité ont été constatées pendant les 6 semaines de traitement, surtout à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine (Figure 26C, D). Les traitements avec les plus faibles concentrations ne semblent ni inhiber la prolifération ni augmenter la cytotoxicité pendant les 2 premières semaines de traitement. Les effets antiprolifératifs et cytotoxiques de ces 2 derniers traitements n'ont été observés qu'à partir de la semaine 3 et étaient plus évidents lorsque les cellules étaient traitées avec 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NM-403 (Figure 26C, D).

Les traitements avec le Mitsui-7 et le NM-403 ont un effet antiprolifératif et cytotoxique. Le Mitsui-7 induit des effets plus précoces que le NM-403.

## 2.2. Mitoses anormales et génotoxicité

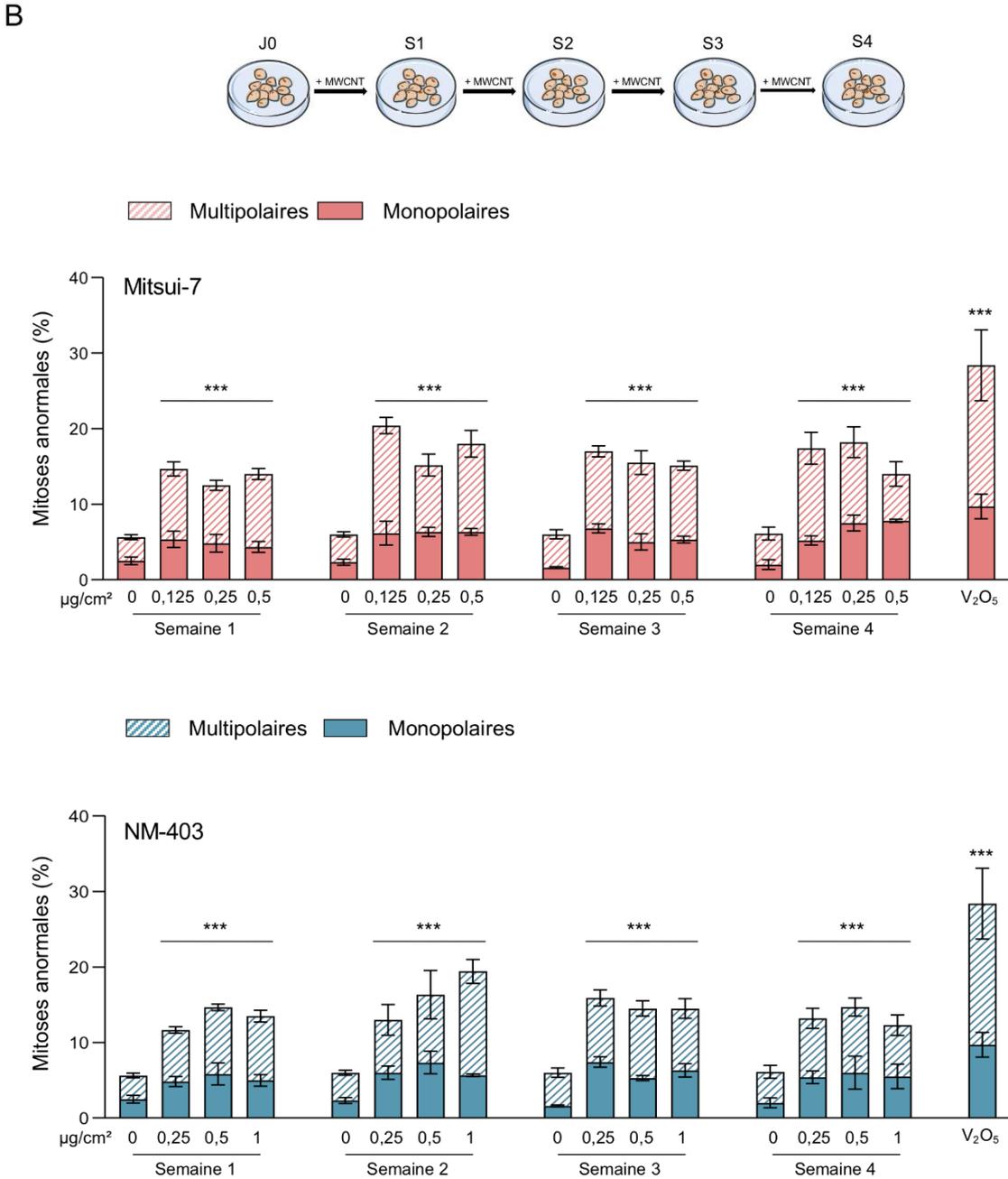
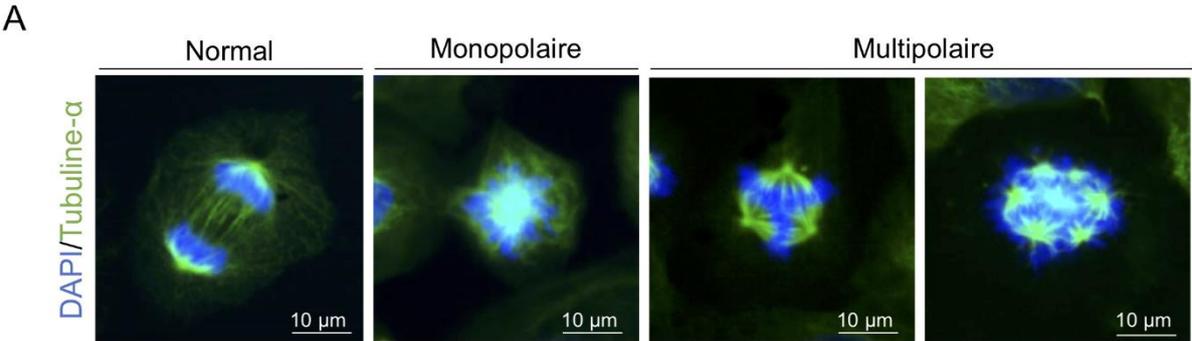
La division cellulaire est une étape clé dans le maintien de l'intégrité génomique, c'est pourquoi l'impact des MWCNT lors de la mitose a été étudié. Dans un premier temps les différentes phases de la mitose ont été observées (Figure 27A). Dans ce but, la tubuline- $\alpha$ , protéine structurale des microtubules qui composent le fuseau mitotique, a été marquée par un anticorps spécifique et les noyaux des cellules ont été colorés au DAPI. Par cette approche, le fuseau mitotique ainsi que la compaction de l'ADN ont pu être observés par microscopie à fluorescence. L'organisation du fuseau mitotique et l'apparition de deux pôles ont permis d'identifier les étapes de pré-prophase et de prophase par lesquelles débute la mitose. L'intensité du marquage de la tubuline- $\alpha$  aux pôles du fuseau mitotique a ensuite permis de les identifier clairement.



**Figure 27 : Les différentes phases de la mitose dans la lignée BEAS-2B.**  
Les cellules ont été immunomarquées avec un anticorps anti-tubuline- $\alpha$  et les noyaux ont été marqués avec du DAPI. Les cellules ont été observées avec un microscope à fluorescence. L'échelle indique 10  $\mu$ m. (A) Les différentes phases de la mitose ont été observées. (B) Des MWCNT ont été observés à proximité des cellules lors de la division cellulaire, ils sont indiqués par une flèche blanche.

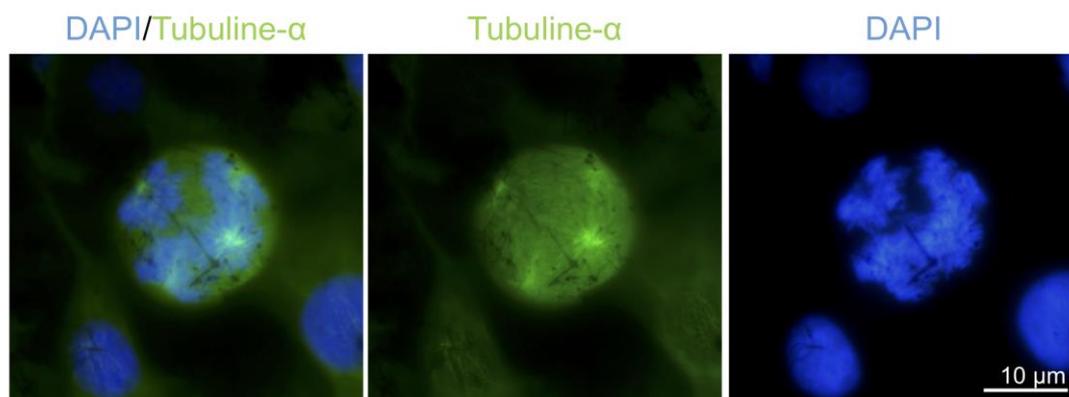
Les chromosomes s'organisent progressivement pendant la pro-métaphase puis s'alignent ensuite sur un même plan à équidistance des deux pôles. À cette étape, le marquage de la tubuline- $\alpha$  a mis en évidence l'attachement des microtubules aux chromosomes, il s'agit de l'anaphase. Pendant cette étape, chaque chromatide est entraînée par des microtubules vers les pôles de la cellule. En même temps, les pôles s'éloignent les uns des autres. À la fin de l'anaphase, la télophase débute par une élongation de la cellule. Les noyaux commencent à se former aux pôles. La cytotérière termine la mitose avec l'apparition d'un anneau contractile, la cellule subit une constriction centrale à partir de laquelle la cellule est divisée en deux cellules filles. Lors de cette analyse, des MWCNT ont été observés près des fuseaux mitotiques aux différentes phases de la mitose (Figure 27B).

Les mitoses anormales, définies comme toute cellule en division dont le fuseau mitotique est composé d'un seul pôle (monopolaire) ou de plus de deux pôles (multipolaire), ont été identifiées et quantifiées. Dans la Figure 28A sont montrés des exemples d'une mitose normale, d'une monopolaire et d'une multipolaire. Afin de déterminer le pourcentage de mitoses anormales suite aux traitements avec les MWCNT, 200 cellules en division ont été comptées en distinguant les mitoses normales, monopolaires et multipolaires. Dès la plus faible concentration de MWCNT une augmentation de 2 à 4 fois du pourcentage de mitoses anormales a été observée pendant les 4 premières semaines de traitement. Les résultats présentés dans la Figure 28B montrent que les traitements avec les deux MWCNT étaient responsables de l'augmentation du pourcentage de mitoses anormales indépendamment du temps et de la concentration de traitement en comparaison aux cellules contrôles. Il est possible de noter que les mitoses anormales induites par le traitement avec les deux MWCNT étaient principalement des mitoses multipolaires. Le traitement avec  $1,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{V}_2\text{O}_5$  a été utilisé comme contrôle positif. Ce traitement a induit une augmentation de 6 fois le pourcentage de mitoses anormales, principalement multipolaires également.



Légende sur la page suivante.

C

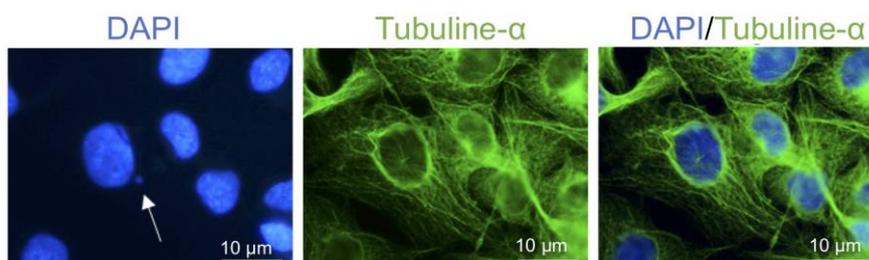


### Figure 28 : Les MWCNT induisent des mitoses anormales.

Les cellules ont été immunomarquées avec un anticorps anti-tubuline- $\alpha$  et les noyaux ont été marqués avec du DAPI. Les cellules ont été observées avec un microscope à fluorescence. L'échelle indique 10  $\mu\text{m}$ . (A) Les images sont représentatives de mitoses normales et anormales composées d'un seul pôle (monopolaire) ou plus de deux pôles (multipolaire). (B) Les cellules ont été traitées avec du Mitsui-7 (haut) ou du NM-403 (bas) aux concentrations indiquées pendant 4 semaines. Les fuseaux mitotiques de 200 cellules en mitose ont été analysées par condition. Les histogrammes représentent le pourcentage de mitoses anormales : les barres rayées indiquent les mitoses multipolaires et les barres en pleine couleur les mitoses monopolaires. Un traitement de 24h avec du  $\text{V}_2\text{O}_5$  a été utilisé comme contrôle positif. Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  la SEM (erreur standard à la moyenne) de 3 expériences indépendantes. \*\*\*  $p < 0,001$  significativement différent du contrôle. (C) Les images représentent une mitose quadripolaire avec des MWCNT à proximité.

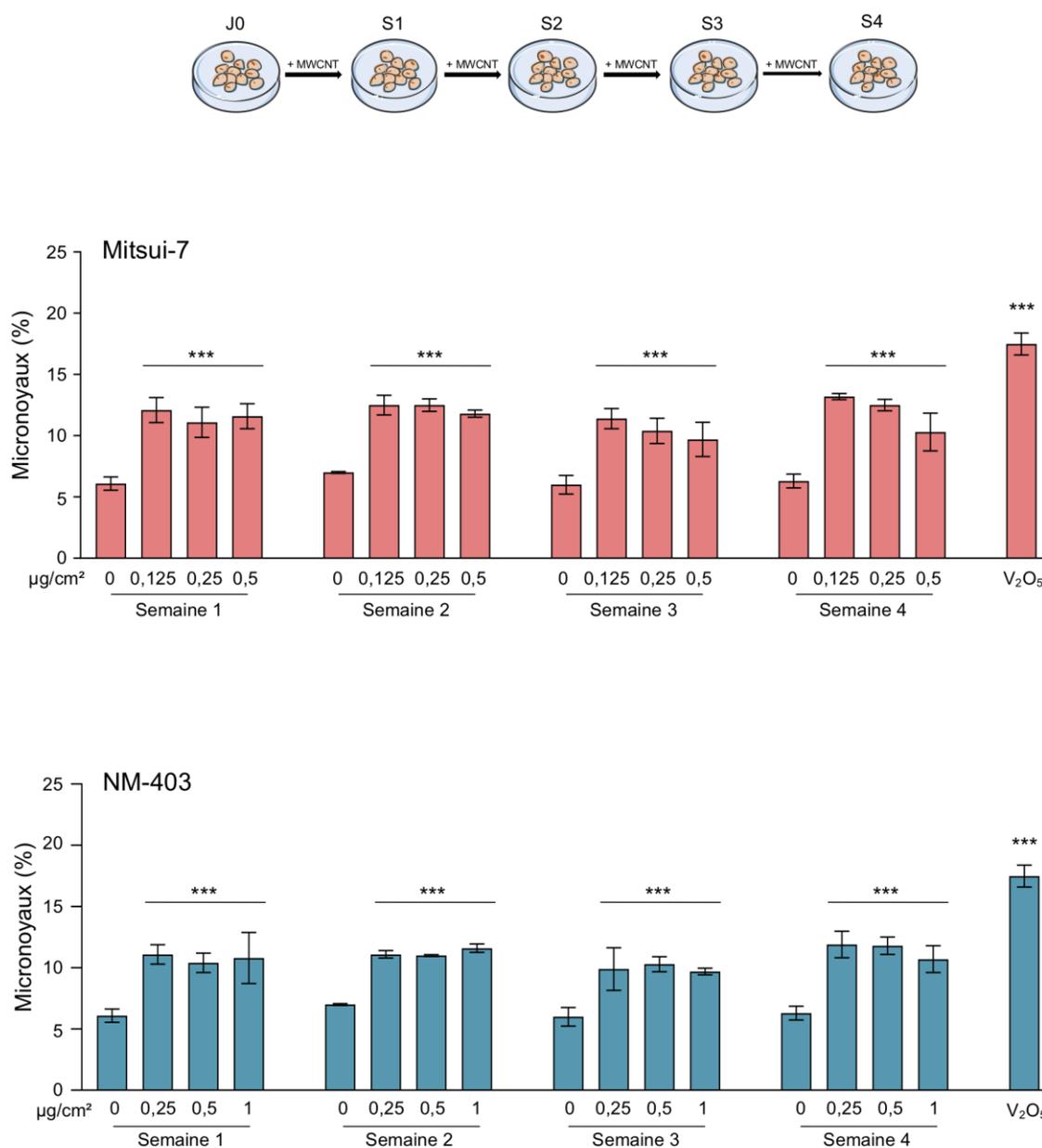
Au cours de l'analyse des mitoses anormales induites par le traitement avec les MWCNT, la présence de ces derniers a été constatée à proximité des pôles du fuseau mitotique comme illustré dans la Figure 28C qui montre une mitose quadripolaire. Un test adapté a permis d'évaluer la génotoxicité des MWCNT dans la lignée BEAS-2B (Figure 29A). Après marquage des noyaux au DAPI, 2000 cellules ont été analysées par microscopie à fluorescence afin de déterminer la présence ou non d'un micronoyau.

A



Légende sur la page suivante.

B



**Figure 29 : Le Mitsui-7 et le NM-403 induisent l'augmentation de la fréquence d'apparition de micronoyaux.**

Les noyaux ont été marqués avec du DAPI et 2000 cellules ont été analysées par condition. (A) Les images sont représentatives d'une cellule présentant un micronoyau (flèche blanche). L'échelle indique 10 µm. (B) Les cellules ont été traitées avec du Mitsui-7 (haut, 0,125, 0,25 et 0,5 µg/cm<sup>2</sup>) ou du NM-403 (bas, 0,25, 0,5 et 1 µg/cm<sup>2</sup>) pendant 4 semaines. Le traitement des cellules avec le V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1,25 µg/cm<sup>2</sup>) pendant 24h a été utilisé comme contrôle positif. Les histogrammes représentent la moyenne ± la SEM (erreur standard à la moyenne) de 3 expériences indépendantes. \*\*\* p < 0,001 significativement différent du contrôle.

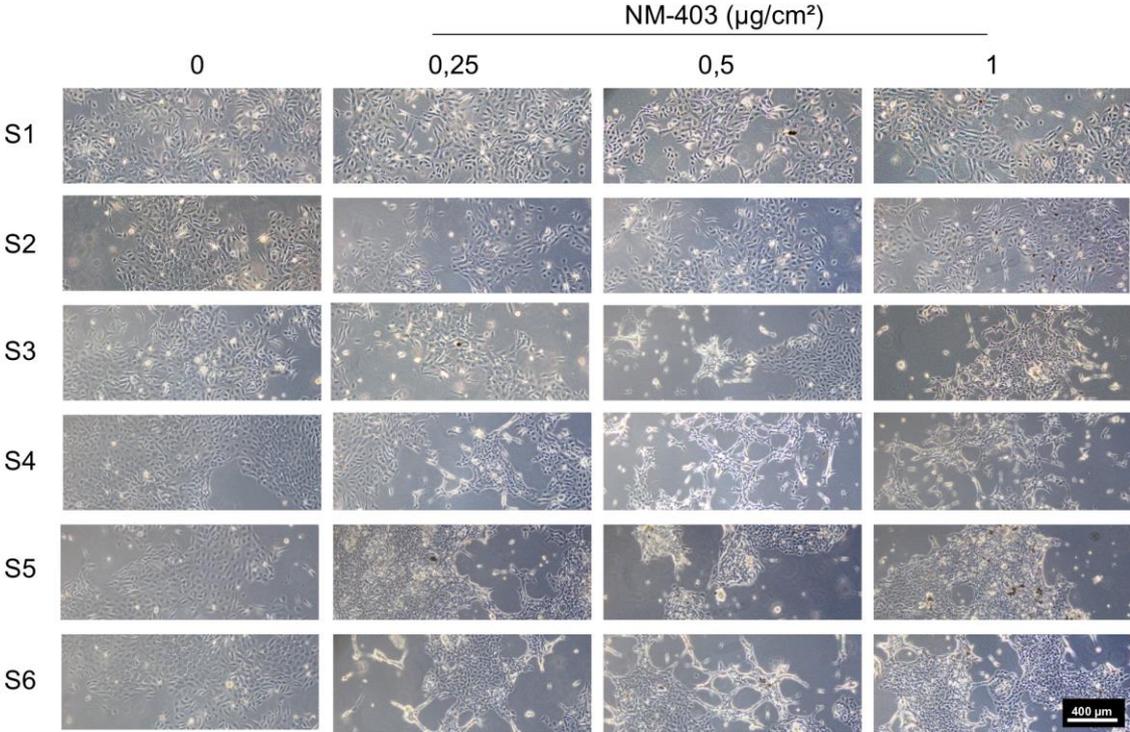
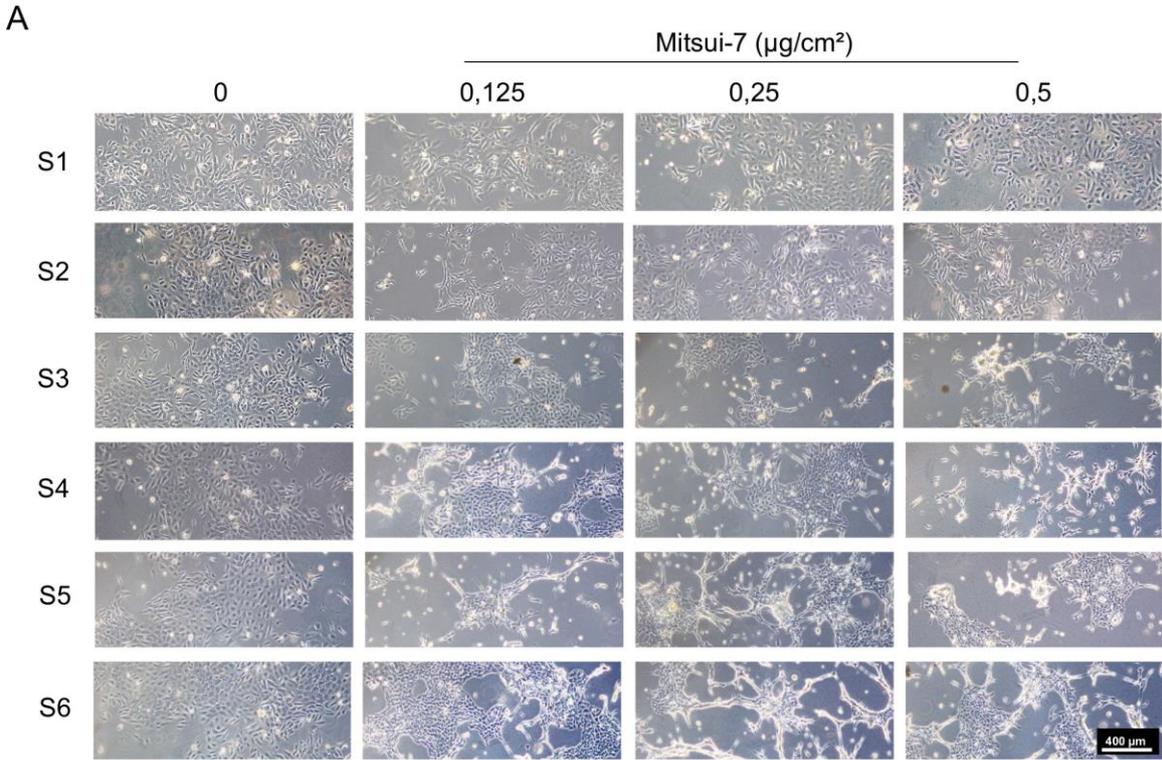
Le Mitsui-7 et le NM-403 ont induit une augmentation de 2 fois le pourcentage des cellules présentant un micronoyau dès la concentration la plus faible et dès la première semaine de traitement (Figure 29B). De façon similaire à l'induction de mitoses anormales, l'augmentation

du pourcentage des cellules ayant un ou des micronoyaux, induite par les MWCNT, était indépendante de la concentration et de la durée du traitement. Pour ces expériences aussi, le  $V_2O_5$  a été utilisé comme contrôle positif. Un traitement de 24h avec cet agent a conduit à une augmentation de 4 fois le pourcentage des cellules présentant un micronoyau en comparaison avec le contrôle. Au-delà des 4 premières semaines de traitement, une modification de la morphologie cellulaire a été observée, les cellules proliféraient en multicouches, ce qui a empêché la poursuite des analyses des fuseaux mitotiques et des micronoyaux.

**Les MWCNT ont un effet génotoxique indépendant du temps et de la concentration de traitement.**

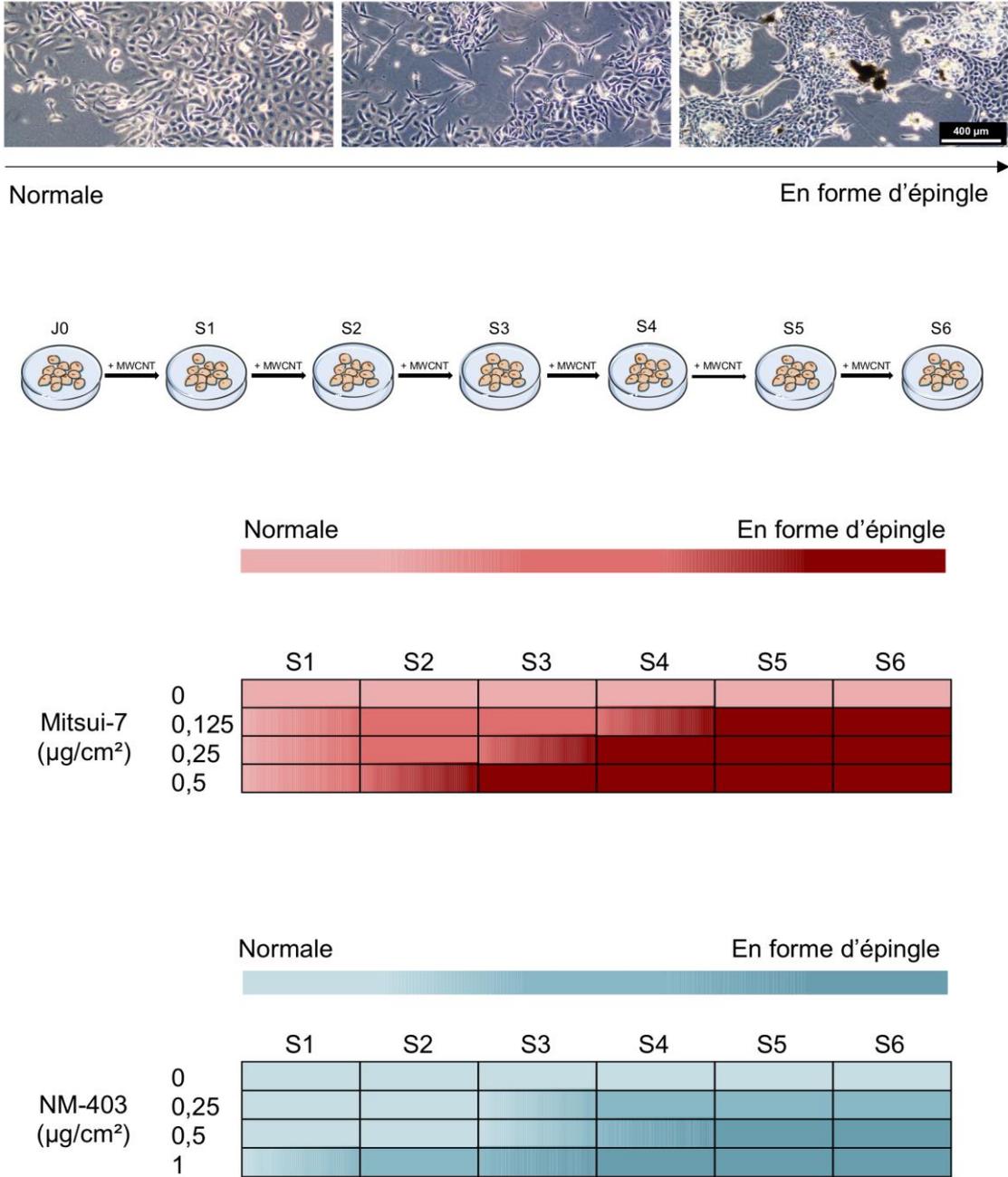
### 2.3. Altérations morphologiques

Les cellules BEAS-2B sont des cellules épithéliales bronchiques humaines, adhérentes d'environ 20  $\mu\text{m}$  de diamètre qui forment une monocouche en conditions standard de culture. L'observation hebdomadaire de la morphologie des cellules a permis de mettre en évidence une modification de celle-ci. Des images représentatives de la population des cellules BEAS-2B après traitement avec les différentes concentrations de Mitsui-7 et de NM-403 ont été reportées dans la Figure 30A. Il a été constaté que les cellules exposées aux deux MWCNT perdaient progressivement leur morphologie épithéliale en faveur d'une population de cellules de plus petite taille et de forme plus allongée dont la croissance ne s'effectuait plus de manière organisée (Figure 30B). Les différentes morphologies ont été classées en 3 états : morphologie normale, morphologie en forme d'épingle et mélange des deux types de morphologie. Les cellules traitées avec le Mitsui-7 subissaient cette modification de morphologie et de croissance en fonction de la concentration et du temps de traitement. En effet, les premières modifications de morphologie ont été observées dès la 1<sup>ère</sup> semaine de traitement pour la concentration la plus élevée (0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) et sont apparues plus évidentes lors de la 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> semaine de traitement avec les concentrations plus faibles (0,25 et 0,125  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Figure 30B). Quant au traitement avec le NM-403, la modification de la morphologie cellulaire a débuté pendant la 2<sup>ème</sup> semaine de traitement avec la concentration la plus élevée (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) et pendant la 4<sup>ème</sup> semaine de traitement avec la concentration intermédiaire (0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Seules quelques cellules de morphologie différente ont été observées à la concentration la plus faible (0,25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) après 6 semaines de traitement.



Légende sur la page suivante.

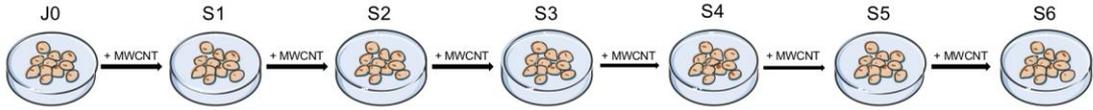
B



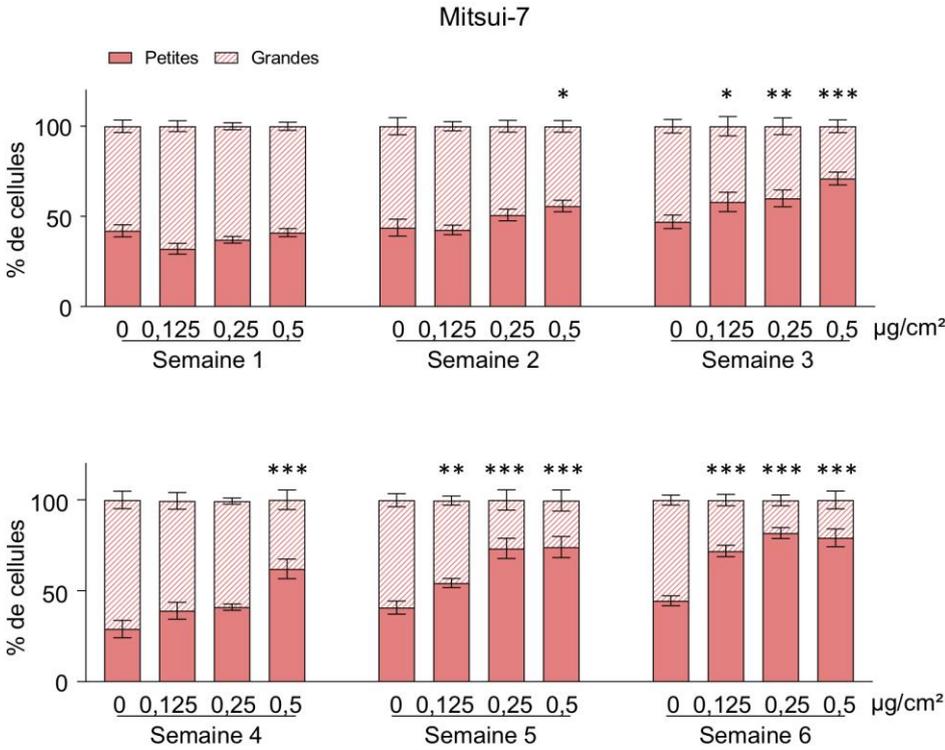
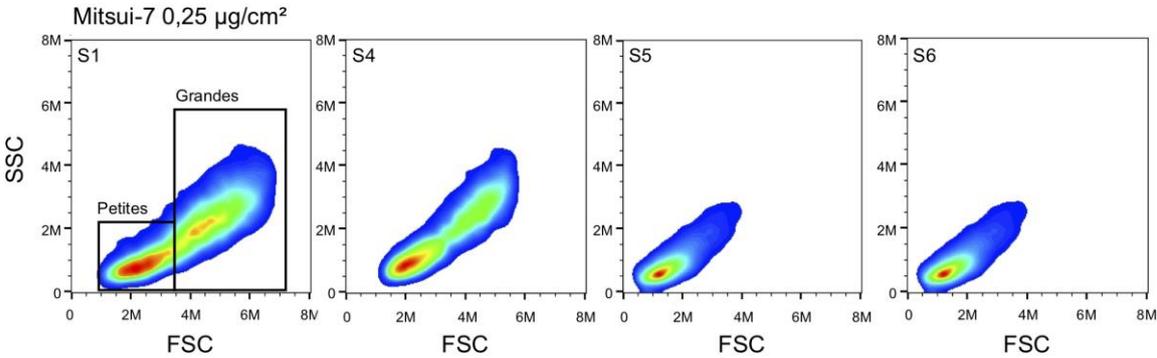
**Figure 30 : Modifications de la morphologie des cellules BEAS-2B traitées avec le Mitsui-7 et le NM-403.**

Les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de Mitsui-7 et de NM-403 pendant 6 semaines. La morphologie cellulaire a été observée de façon hebdomadaire avec un microscope optique. L'échelle représente 400 μm. (A) Les images de microscopie à contraste de phase des cellules BEAS-2B traitées aux concentrations indiquées de Mitsui-7 et de NM-403 sont représentatives de la population cellulaire au cours des semaines de traitement. (B) Les morphologies des cellules ont été classées comme normale, mixte ou en forme d'épingle. La heatmap représente l'évolution de la modification de la morphologie de couleur claire pour les cellules normales à foncée pour les cellules en forme d'épingle. Les résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes. S : semaine.

Afin de quantifier cette modification de morphologie, la population cellulaire a été caractérisée par cytométrie en flux. Ces analyses ont permis de mettre en évidence deux populations cellulaires : une population de grandes cellules très granuleuses appelées « grandes cellules » et une seconde dont les cellules étaient de petite taille et de faible granulométrie appelées « petites cellules » (Figure 31).



A



Légende sur la page suivante.



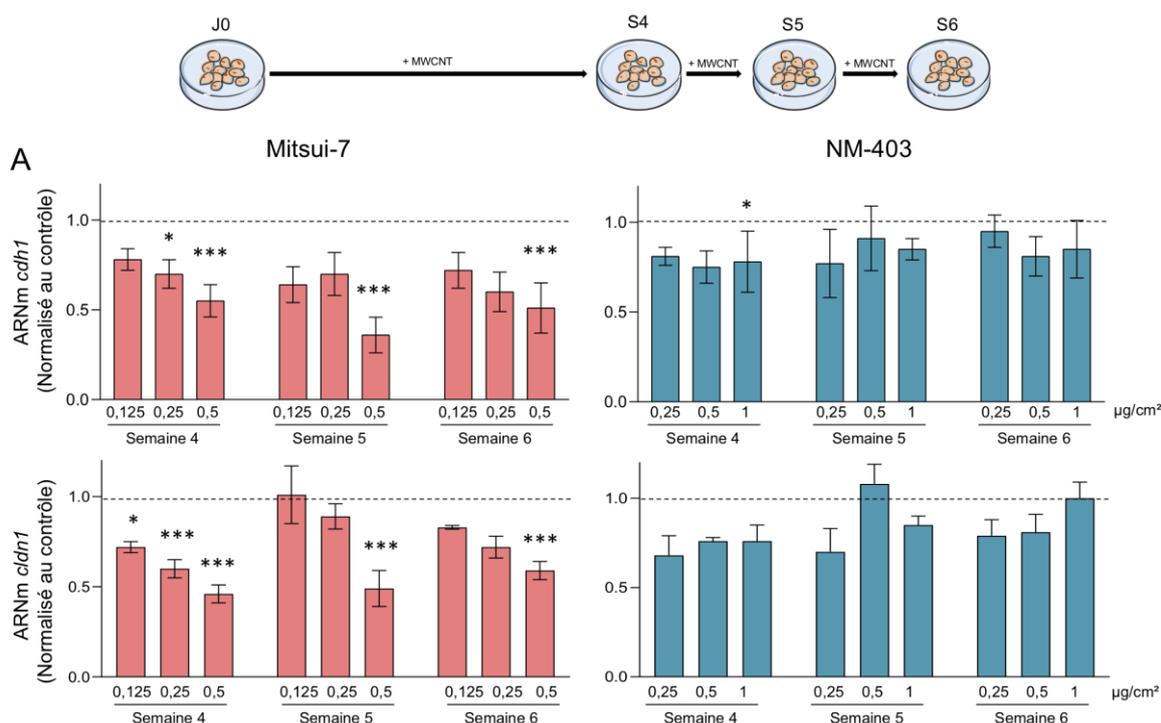
La quantification du pourcentage de cellules dans chaque catégorie a été réalisée par analyse informatique en traçant une fenêtre autour de chaque population. Cette quantification a révélé que la population des cellules contrôles était composée d'environ 40% de petites cellules et 60% de grandes cellules. En accord avec les modifications de morphologie observées précédemment, le rapport du pourcentage de petites/grandes cellules s'est inversé avec le temps de traitement avec les MWCNT. En effet, une augmentation du pourcentage de petites cellules dépendante du temps et de la concentration a été observée suite au traitement avec le Mitsui-7 (Figure 31A). Cette augmentation a été observée de façon marquée avec la concentration la plus élevée de Mitsui-7 ( $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dès la 2<sup>ème</sup> semaine de traitement. Cette augmentation était croissante jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine, passant de 55% en S2 à 80% en S6. Après 5 et 6 semaines de traitement, les concentrations les plus faibles ont aussi induit une augmentation de la population de petites cellules pour représenter entre 70 et 80% de la population en S6. De même, le traitement des cellules avec le NM-403 a conduit à une augmentation du pourcentage de petites cellules à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine de traitement dès la plus faible concentration (Figure 31B). La population cellulaire était composée de 70 à 80% de petites cellules à la 6<sup>ème</sup> semaine de traitement, indépendamment de la concentration (Figure 31B).

Les MWCNT ont induit une modification de la morphologie cellulaire en faveur d'une population de cellules de petite taille et de faible granulométrie.

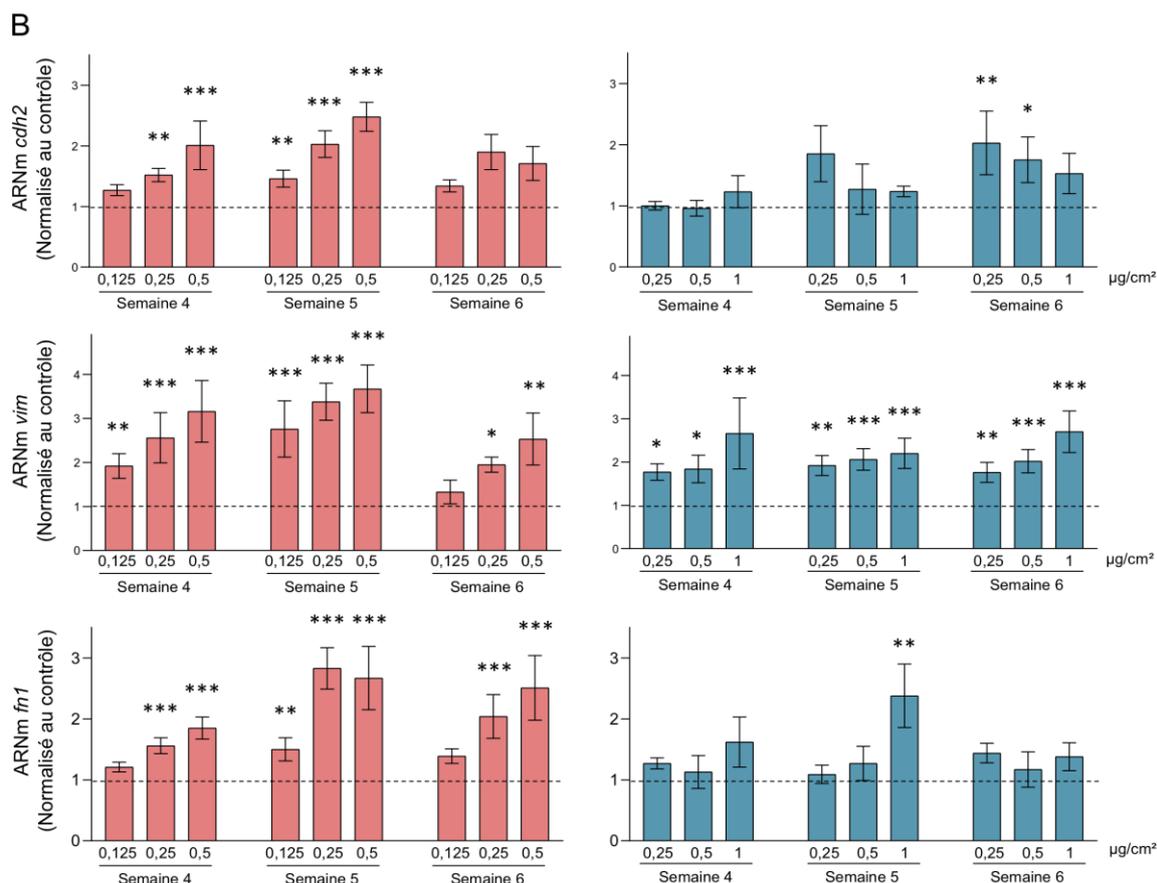
#### 2.4. Les MWCNT induisent la transition épithélio-mésenchymateuse

L'observation hebdomadaire et l'étude par cytométrie en flux des cellules traitées avec le Mitsui-7 et le NM-403 a donc permis de constater que les cellules traitées devenaient plus petites et de forme plus allongée. Leurs noyaux étaient également plus petits et elles ne proliféraient plus en monocouche. Ces caractéristiques phénotypiques sont similaires à celles des cellules mésenchymateuses, ce qui suggère que les cellules BEAS-2B subissaient une conversion progressive de l'état épithélial vers l'état mésenchymateux. Par conséquent, les modifications d'expression de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse ont été étudiées dans un premier temps. L'effet du traitement des cellules avec les MWCNT sur l'expression de *cdh1* codant la E-cadhérine et *clnd1* codant la Claudine-1, gènes marqueurs de

l'état épithélial, a été analysé. Une diminution de 2 fois de l'expression de *cdh1* et de 1,5 fois de celle de *clnd1* a été observée suite au traitement avec la plus forte concentration de Mitsui-7 après 4, 5 et 6 semaines (Figure 32A). Le traitement avec le NM-403 a peu affecté l'expression de ces deux marqueurs épithéiaux aux 3 semaines étudiées (Figure 32A). En complément, l'expression des gènes marqueurs de l'état mésenchymateux *cdh2* codant la N-cadhérine, *vim* codant la Vimentine et *fn1* codant la Fibronectine a été analysée par RT-qPCR. L'augmentation de l'expression de ces 3 gènes a principalement été observée aux deux concentrations les plus élevées de Mitsui-7 aux semaines 4, 5 et 6. La concentration la plus élevée a induit une augmentation de 2 à 2,5 fois l'expression de *cdh2*, de 2,5 à 3,5 fois l'expression de *vim* et de 2 à 2,5 fois l'expression de *fn1* (Figure 32B). Le traitement avec le NM-403 a conduit en une induction plus modérée. En effet, ce traitement a induit une augmentation de 2 fois l'expression de l'ARNm de *fn1* en S5 et de 2 fois l'ARNm de *cdh2* en S6. De même, ce traitement a augmenté de 2 à 3,5 fois l'expression de l'ARNm de *vim* de la S4 à la S6.



Légende sur la page suivante.

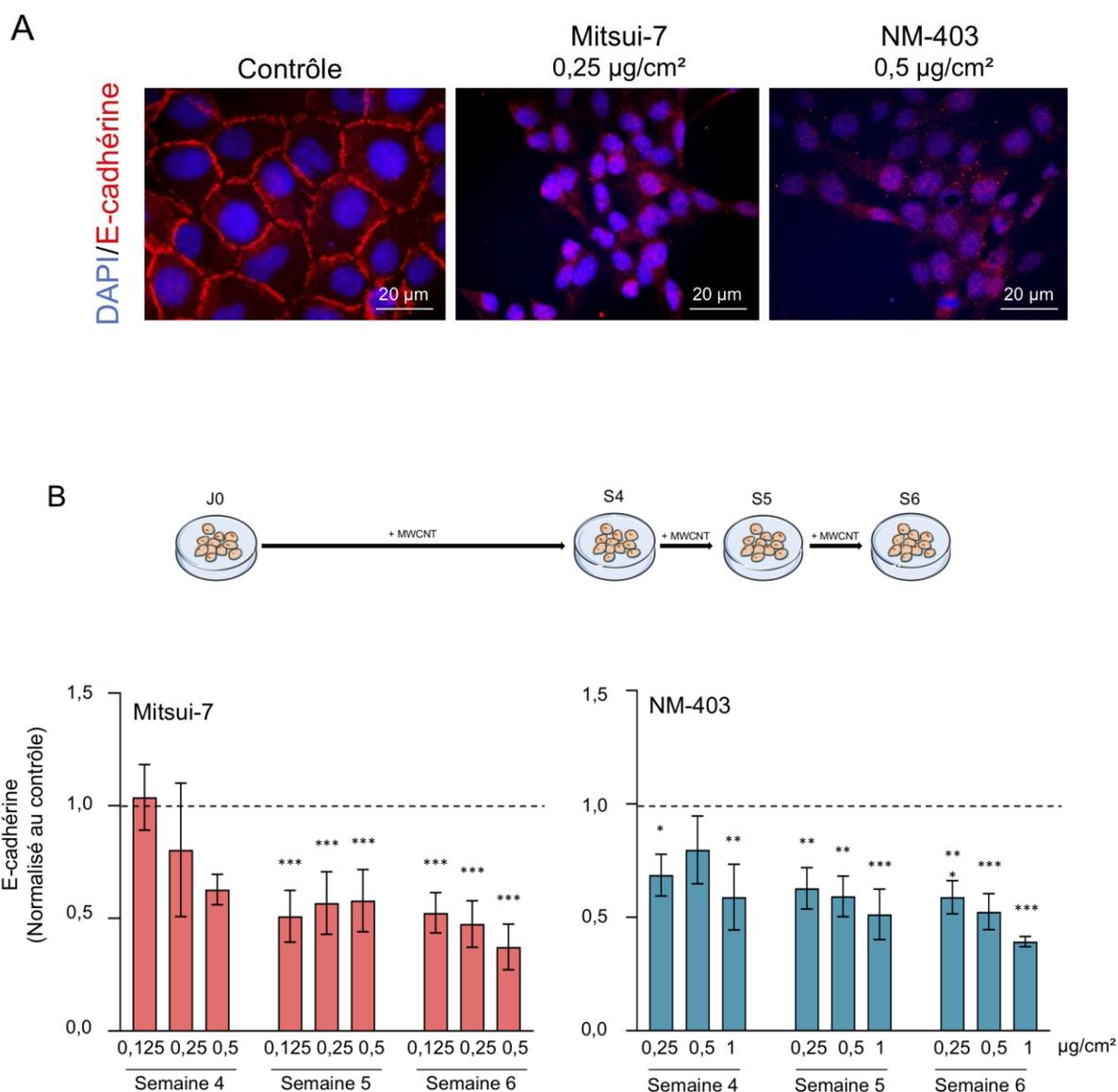


**Figure 32 : Les MWCNT modifient l'expression de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.**

Les ARN des cellules totales traitées avec les concentrations indiquées de Mitsui-7 (à gauche) ou de NM-403 (à droite) ont été extraits et l'expression des gènes a été analysée par RT-qPCR. (A) Les marqueurs épithéliaux *cdh1* (E-cadhérine) et *cldn1* (Claudine-1) et (B) les marqueurs mésenchymateux *cdh2* (N-cadhérine), *vim* (Vimentine) et *fn1* (Fibronectine) ont été évalués après 4, 5 et 6 semaines de traitement. Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  la SEM (erreur standard de la moyenne) de 3 expériences indépendantes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativement différent du contrôle.

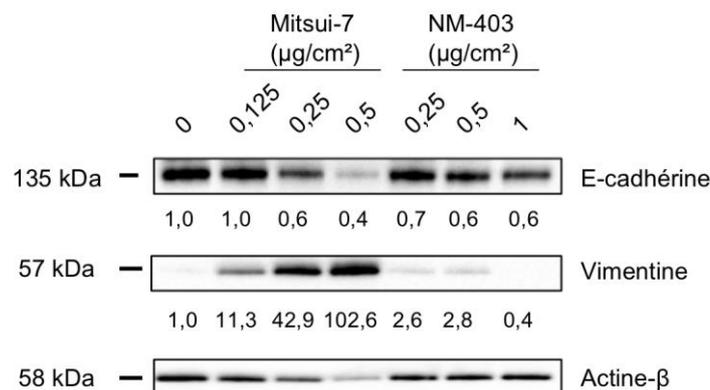
En deuxième approche, et pour étudier les conséquences des modifications de l'expression de ces gènes à l'échelle protéique, une approche qualitative par immunomarquage a permis d'observer une diminution de la protéine E-cadhérine après traitement avec les MWCNT (Figure 33A). Cette protéine a ensuite été quantifiée dans la population émergente de petites cellules par cytométrie en flux. Aucune modification significative de la quantité de E-cadhérine n'a été observée après 4 semaines de traitement avec le Mitsui-7 (Figure 33B). Par contre, après 5 et 6 semaines de traitement, la quantité de E-cadhérine a fortement diminué (entre 30 et 60%) en fonction de la concentration en Mitsui-7 (Figure 33B). Le traitement avec le NM-403 a, quant à lui, également induit une diminution de la E-cadhérine jusqu'à 50%, diminution visible

principalement après 5 et 6 semaines de traitement (Figure 33B). Des analyses par Western Blot ont confirmé la diminution de cette protéine après 6 semaines de traitement avec le Mitsui-7 et le NM-403, principalement observée avec la concentration la plus élevée (Figure 33C). En accord avec le niveau d'ARNm, 6 semaines de traitement avec ces MWCNT a également induit la Vimentine à l'échelle protéique de façon dépendante de la concentration pour le Mitsui-7 et de façon plus modérée pour le NM-403 (Figure 33C).



Légende sur la page suivante.

C



**Figure 33 : Les MWCNT ont induit une diminution du marqueur épithélial E-cadhérine et une augmentation du marqueur mésenchymateux Vimentine à l'échelle protéique.**

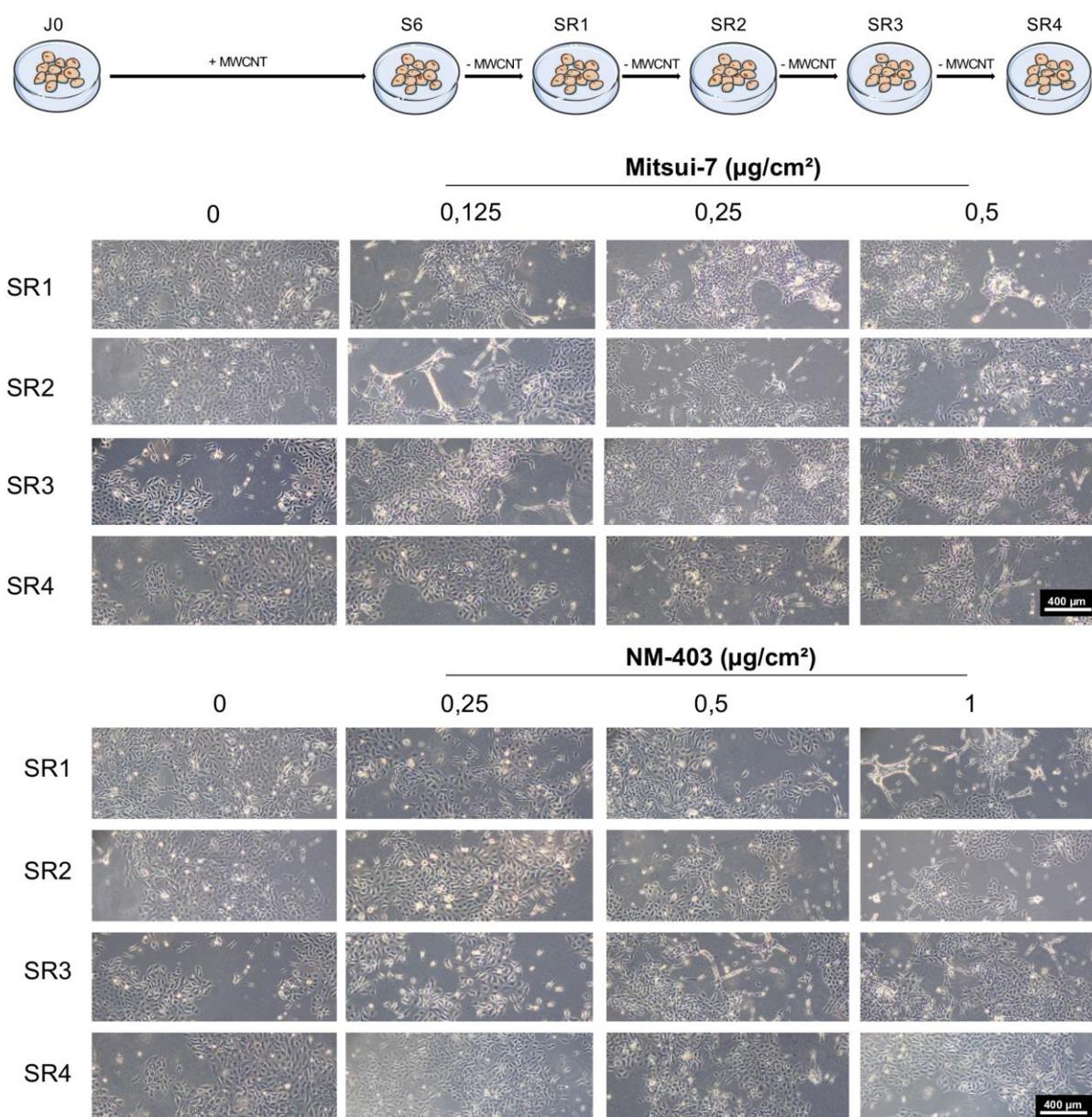
(A) Les cellules contrôles, traitées avec 0,25 μg/cm<sup>2</sup> de Mitsui-7 ou 0,5 μg/cm<sup>2</sup> de NM-403 pendant 6 semaines ont été immunomarquées avec un anticorps anti-E-cadhérine (rouge) et les noyaux ont été colorés au DAPI. Les images sont représentatives de la population. Échelle : 20 μm. (B) Les cellules ont été traitées avec les concentrations indiquées de Mitsui-7 (gauche) ou de NM-403 (droite) pendant 4 à 6 semaines et ont été marquées avec l'anticorps anti-E-cadhérine puis analysées par cytométrie en flux. Le marqueur extracellulaire E-cadhérine a été quantifié dans la population de petites cellules. L'histogramme représente le rapport d'intensité moyenne de fluorescence/nombre total de petites cellules rapporté au témoin. Les histogrammes représentent la moyenne ± la SEM (erreur standard de la moyenne) de 3 expériences indépendantes. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 significativement différent du témoin. (C) Les protéines totales ont été extraites des cellules traitées pendant 6 semaines aux concentrations indiquées de Mitsui-7 et NM-403. Les niveaux de protéines de E-cadhérine et Vimentine ont été analysés par Western Blot. Les quantifications sont présentées selon le ratio « Protéine d'intérêt/actine-β » rapportée au témoin. Les Western Blots sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

Les MWCNT induisent la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules BEAS-2B.

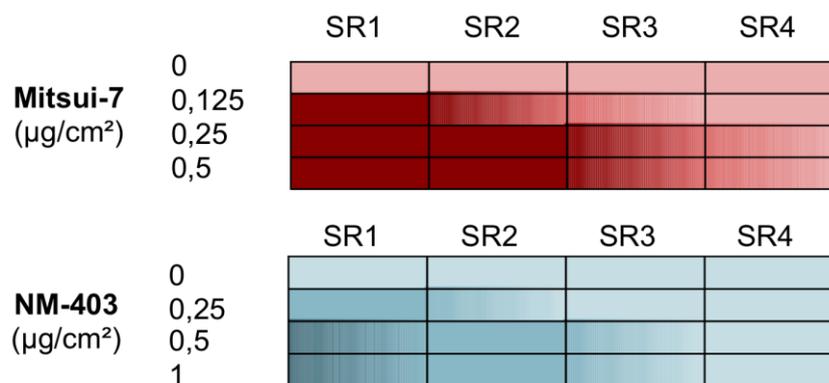
## 2.5. Étude de la réversibilité des effets

Pour évaluer la réversibilité des effets induits par le traitement avec les MWCNT, les cellules précédemment traitées pendant 6 semaines consécutives ont été maintenues en culture sans MWCNT pendant 4 semaines supplémentaires. Cette période est appelée « récupération ». À partir de la 3<sup>ème</sup> semaine de récupération, une partie de la population des cellules traitées avec la plus faible concentration (0,125 μg/cm<sup>2</sup>) de Mitsui-7 avait retrouvé sa morphologie épithéliale (Figure 34). Après la 4<sup>ème</sup> semaine de récupération seules les cellules traitées avec la faible concentration de Mitsui-7 ont totalement retrouvé leur morphologie épithéliale, alors

qu'aux deux concentrations plus élevées (0,25 et 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) un mélange de cellules normales et en forme d'épingles a été observé. Les cellules traitées avec le NM-403 ont retrouvé une morphologie épithéliale plus rapidement, dès la 2<sup>ème</sup> semaine de récupération pour la concentration la plus faible (0,25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) et à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine de récupération pour les concentrations les plus élevées (0,5 et 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Ces observations peuvent être corrélées avec la composition de la population cellulaire quantifiée par cytométrie en flux.



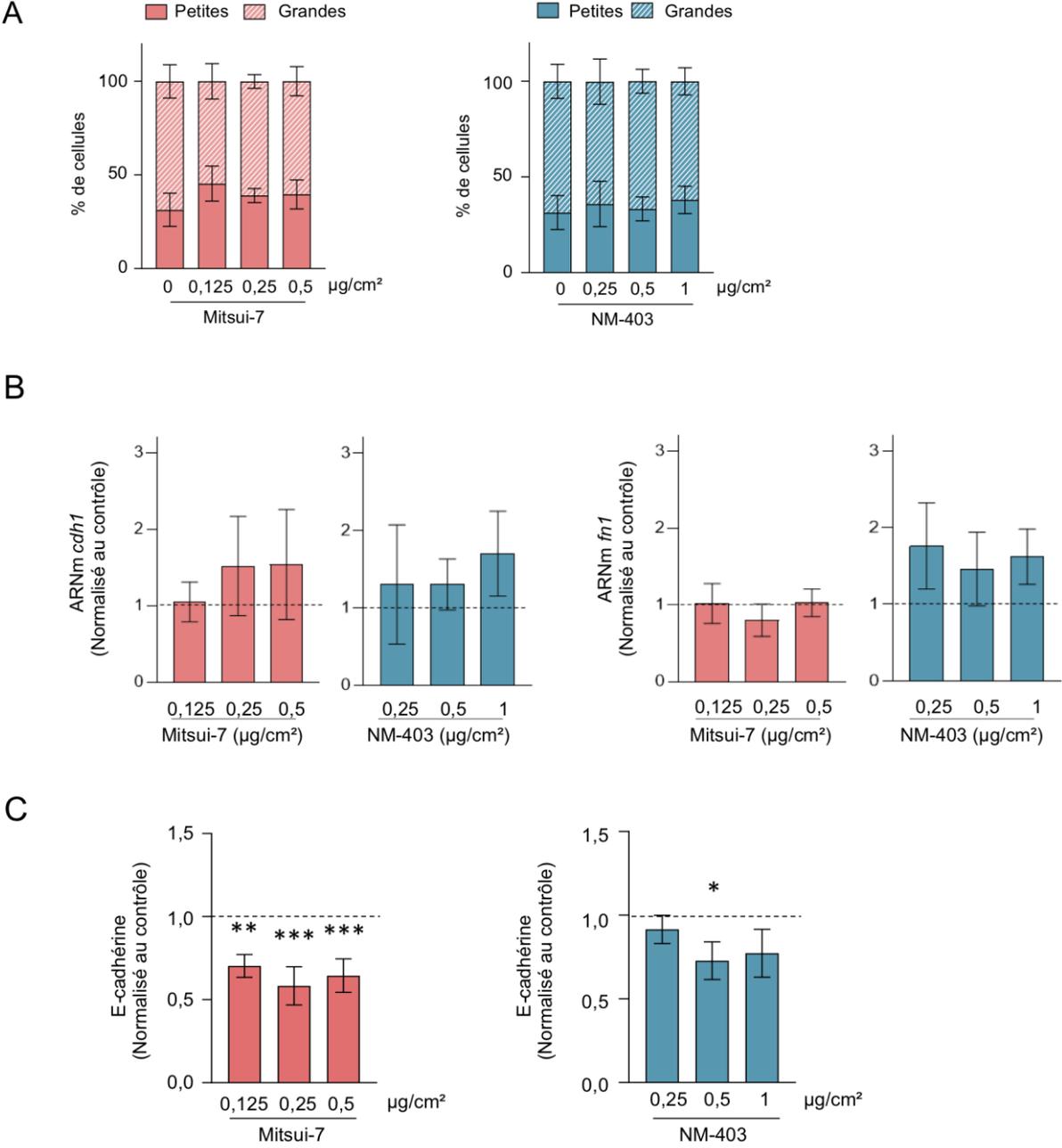
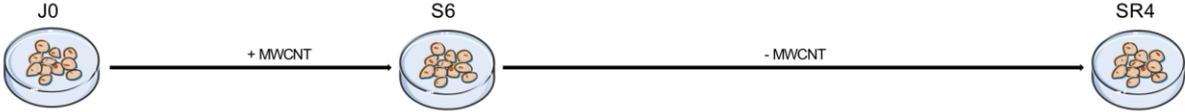
Légende sur la page suivante.



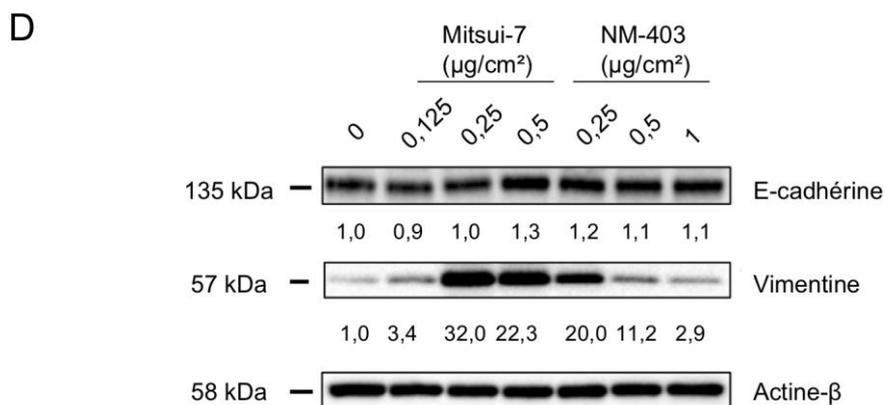
**Figure 34 : Les modifications de morphologie des cellules BEAS-2B étaient réversibles.**

Après les 6 semaines de traitement avec du Mitsui-7 (0,125, 0,25 et 0,5 µg/cm<sup>2</sup>) ou du NM-403 (0,25, 0,5 et 1 µg/cm<sup>2</sup>), les cellules ont été cultivées sans traitement pendant 4 semaines (SR1-SR4). Les images de microscopie à contraste de phase des cellules BEAS-2B traitées aux concentrations indiquées de Mitsui-7 et de NM-403 sont représentatives de la population cellulaire au cours des 4 semaines de récupération. Échelle : 400 µm. La heatmap représente les modifications morphologiques observées dans les cellules au cours des 4 semaines de la période de récupération : de la forme d'épingle (foncé) à la forme normale (clair). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. SR : semaine de récupération.

Dans toutes les conditions de traitement, après 4 semaines de récupération, la proportion de petites cellules et de grandes cellules était comparable à celle de la condition contrôle, soit environ 40% de petites cellules et 60% de grandes cellules (Figure 35A). À la fin de la période de récupération, l'expression de la E-cadhérine (*cdh1*) dans la population totale était revenue à un niveau similaire aux cellules contrôles que les cellules aient été traitées avec du Mitsui-7 ou du NM-403 et de façon indépendante de la concentration utilisée (Figure 35B). De même, l'expression de l'ARNm codant la Fibronectine (*fn1*), marqueur mésenchymateux, était similaire à celle trouvée dans les cellules contrôles (Figure 35B). Dans la population de petites cellules originellement traitées avec le Mitsui-7, la quantité de marqueur extracellulaire E-cadhérine était restée inférieure à celle des cellules témoins, bien que la diminution observée était plus faible qu'après les 6 semaines de traitement (Figure 35C). En ce qui concerne les traitements avec le NM-403, la quantité protéique de E-cadhérine était quasiment revenue au niveau basal après 4 semaines de récupération. De plus, les analyses réalisées par Western Blot ont montré qu'à la fin de la période de récupération, la protéine E-cadhérine était revenue au niveau des cellules contrôles dans la population cellulaire totale. L'induction de la protéine Vimentine était maintenue après 4 semaines de récupération mais était inférieure à celle observée après 6 semaines de traitement (Figure 35D).



Légende sur la page suivante.



**Figure 35 : La transition épithélio-mésenchymateuse induite par les MWCNT était réversible.**

Après les 6 semaines de traitement avec du Mitsui-7 (0,125, 0,25 et 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ou du NM-403 (0,25, 0,5 et 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), les cellules ont été cultivées sans traitement pendant 4 semaines. (A) Les deux populations cellulaires (barres pleines pour les petites cellules et barres rayées pour les grandes cellules) ont été analysées par cytométrie en flux et déterminées sur la base des profils SSC::FSC après 4 semaines de récupération. (B) Les ARN des cellules ont été extraits et l'expression du marqueur épithélial *cdh1* (E-cadhérine) et du marqueur mésenchymateux *fn1* (Fibronectine) a été évalué par RT-qPCR après 4 semaines de récupération. (C) Le marqueur extracellulaire E-cadhérine a été quantifié dans la population de petites cellules par cytométrie en flux suite au marquage des cellules avec l'anticorps anti-E-cadhérine. Les histogrammes représentent le rapport d'intensité de fluorescence moyenne/nombre total de petites cellules rapporté au témoin. Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  la SEM (erreur standard de la moyenne) de 3 expériences indépendantes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativement différent du contrôle. (D) Les protéines totales ont été extraites et les niveaux des protéines de E-cadhérine et Vimentine ont été analysés par Western Blot. Les quantifications sont présentées selon le ratio « Protéine d'intérêt/actine- $\beta$  » rapportée au contrôle. Les Westerns Blots sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

La transition épithélio-mésenchymateuse induite par les MWCNT était réversible.

## 2.6. Analyses transcriptomiques

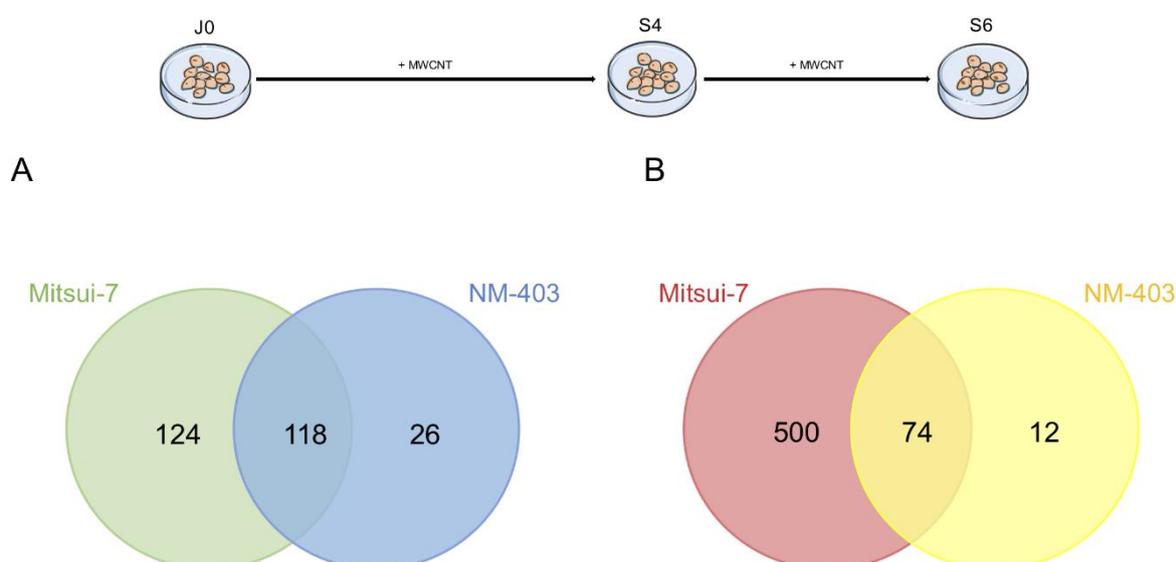
L'analyse du transcriptome des cellules BEAS-2B a été réalisée après 4 et 6 semaines de traitement avec 0,25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de Mitsui-7 et 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NM-403. Pour cela, les ARN ont été extraits puis marqués à la cyanine-3 avant d'être hybridés sur une puce à ADN composée de 60000 sondes ciblant des ARNm, des régions promotrices, des miRNA ainsi que des régions télomériques. Dans un premier temps, les listes de gènes différentiellement exprimés (DEG) ont été établies. Le traitement des cellules BEAS-2B avec le Mitsui-7 ou le NM-403 pendant 4 semaines a modifié, respectivement, l'expression de 242 et 144 DEG au total (Tableau 10).

**Tableau 10 : Gènes différentiellement exprimés dans les cellules BEAS-2B traitées avec des MWCNT.**

Après 4 ou 6 semaines de traitement avec le Mitsui-7 (0,25 µg/cm<sup>2</sup>) ou le NM-403 (0,5 µg/cm<sup>2</sup>), le transcriptome des cellules BEAS-2B a été analysé à l'aide de la technologie de puce d'expression de gènes humains SurePrint G3. Le tableau présente le nombre de gènes différentiellement exprimés, parmi lesquels sont distingués les gènes sur-exprimés et sous-exprimés au temps S4 et S6. FC > 1,5.

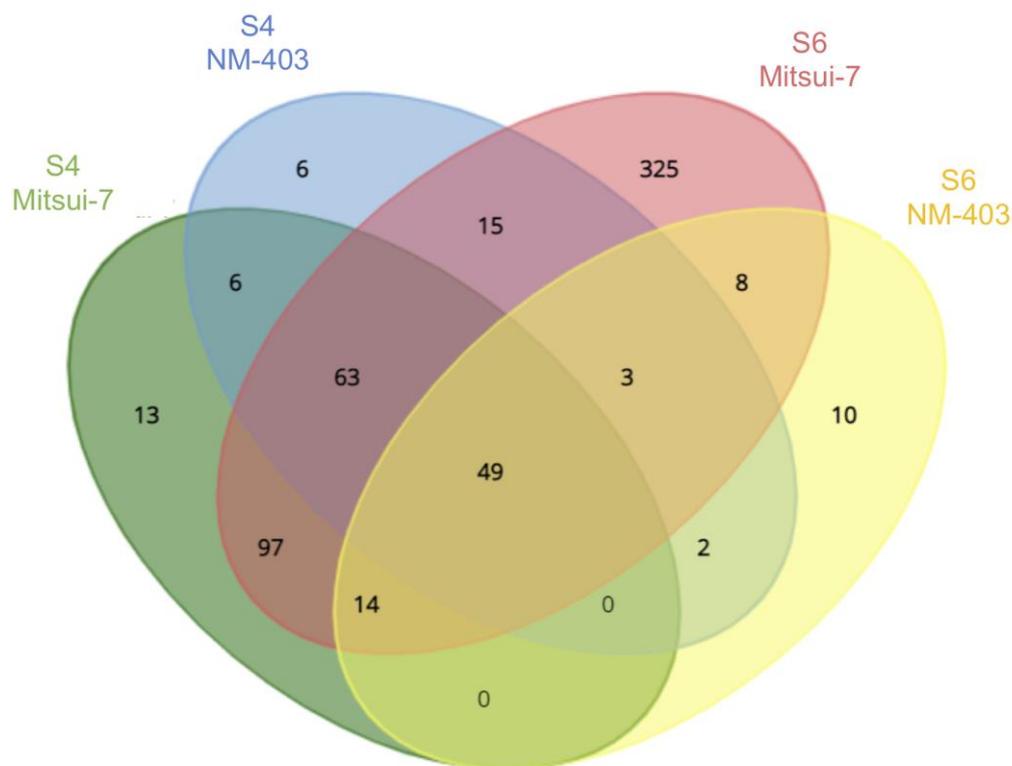
	Mitsui-7		NM-403	
	S4	S6	S4	S6
Gènes différentiellement exprimés	242	574	144	86
Gènes sur-exprimés	95	194	64	50
Gènes sous-exprimés	147	380	80	36

Parmi ces derniers, les gènes étaient principalement sous-régulés, 147/242 gènes pour les cellules traitées avec le Mitsui-7 et 80/144 pour les cellules traitées avec le NM-403. Le diagramme de Venn établi à partir de ces listes a mis en évidence 118 DEG communs aux deux MWCNT, tandis que 124 étaient spécifiques du Mitsui-7 et 26 du NM-403 (Figure 36A). Après 6 semaines de traitement, il y avait davantage de DEG qu'en S4 dans les cellules traitées au Mitsui-7 (574) avec une majorité de gènes sous-exprimés (380/574). Les cellules traitées avec le NM-403 ont montré, quant à elles, moins de DEG qu'en S4, avec une majorité de gènes sur-exprimés (50/86, Tableau 10).



Légende sur la page suivante.

C



**Figure 36 : Les MWCNT modulent le transcriptome des cellules BEAS-2B.**

Après 4 ou 6 semaines de traitement avec le Mitsui-7 ( $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ou le NM-403 ( $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), le transcriptome des cellules BEAS-2B a été analysé à l'aide de la technologie de puce d'expression de gènes humains SurePrint G3. Les diagrammes de Venn permettent de comparer le nombre de gènes différentiellement exprimés dans les cellules BEAS-2B après 4 (A) ou 6 (B) semaines de traitement avec les MWCNT. (C) Le diagramme de Venn permet de comparer le nombre de gènes différentiellement exprimés dans toutes les conditions testées. S : semaine.

Après 6 semaines de traitement, les cellules traitées avec les MWCNT partageaient 74 DEG (Figure 36B). Ces éléments soulignent la différence de réponse des cellules aux traitements avec ces deux MWCNT. La comparaison des deux MWCNT et des deux temps de traitement ont mis en évidence 49 DEG communs à toutes ces conditions (Figure 36C). L'analyse des listes de DEG a permis d'identifier les 10 principales voies de signalisation qui leur sont associées (Tableau 11). Ainsi, dans les cellules traitées avec le Mitsui-7 pendant 4 semaines il a été constaté que les voies de signalisation dérégulées étaient principalement impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse et le cancer (voies n°2, 4, 5, 6, 7, 9 et 10). Pour les cellules traitées avec le NM-403 pendant 4 semaines deux de ces voies de signalisation ont également été retrouvées (voies n°1 et 10). Ces premiers éléments coïncident avec la mise en place d'une transition épithélio-mésenchymateuse précédemment mise en évidence.

**Tableau 11 : Les voies de signalisations dérégulées par les MWCNT.**

Après 4 (A) ou 6 (B) semaines de traitement avec le Mitsui-7 (0,25 µg/cm<sup>2</sup>) ou le NM-403 (0,5 µg/cm<sup>2</sup>), le transcriptome des cellules BEAS-2B a été analysé. Les voies de signalisation ont été extraites à partir des listes de gènes insérées dans la base de données *Elsevier Pathway collection* (EnrichR) et ont été classées par ordre d'importance en fonction du nombre de gènes différentiellement exprimés.

A.	Mitsui-7	NM-403
1	Activation de la cascade du complément liée à la MBP ( <i>Mannose Biding Protein</i> )	La signalisation IL13/STAT6/ZEB1 favorise la progression métastatique du cancer
2	Transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	Protéines impliquées dans la thrombophilie
3	Protéines à expression altérée dans le mélanome	Cascade de coagulation
4	La signalisation IL13/STAT6/ZEB1 favorise la progression métastatique du cancer	Thrombophilie héréditaire
5	Protéines à expression altérée dans les métastases cancéreuses	Thrombophilie héréditaire et complications de la grossesse
6	Dédifférenciation et progression métastatique dans le mélanome	Activation des cellules endothéliales vasculaires par des facteurs de coagulation sanguine
7	WNT dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	Activation du complément dans la dégénérescence maculaire
8	Activation du complément dans la dégénérescence maculaire	Dédifférenciation et progression métastatique dans le mélanome
9	Mélanome	Lignée cellulaire hématopoïétique : cellule B
10	Famille TGFβ dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	Famille TGFβ dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer
B.	Mitsui-7	NM-403
1	Protéines à expression altérée dans les métastases cancéreuses	Activation du complément dans la dégénérescence maculaire
2	Transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	Transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer
3	Famille TGFβ dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	Protéines impliquées dans l'oligodendrome
4	Protéines à expression altérée dans le mélanome	Activation de la cascade du complément liée à la MBP ( <i>Mannose Biding Protein</i> )
5	WNT dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	Voie de signalisation du complément
6	Rôle du desmosome dans la cardiomyopathie dilatée	Stress oxydant dans le vitiligo
7	La signalisation IL13/STAT6/ZEB1 favorise la progression métastatique du cancer	Développement des glandes parathyroïdes (modèle de souris)
8	Assemblage desmosome	CD46/CD55/CD59 inhibent la lyse médiée par le complément des cellules cancéreuses
9	Protéines impliquées dans l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules endométriosiques	La signalisation IL13/STAT6/ZEB1 favorise la progression métastatique du cancer
10	Cornéodesmosomes dans la dermatite atopique	Phagocytose médiée par CR3 dans les neutrophiles et les macrophages

Après 6 semaines de traitement avec le Mitsui-7, davantage de voies de signalisation impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse (7/10) et le cancer ont été identifiées (voies n°1, 2, 3, 4, 5, 7 et 9). Concernant les cellules traitées avec le NM-403, deux voies seulement étaient impliquées dans ces processus (voies n°2 et 9). Les gènes différentiellement exprimés identifiés parmi les 5 premières voies de signalisation sont détaillés dans le Tableau 12. Certains de ces gènes ont été précédemment analysés par RT-qPCR. Les différences d'expression par rapport au contrôle ont été comparées entre les deux techniques (Tableau 13). Les différences d'expression de *cdh1*, *cldn1*, *vim* et *cdh2* sont du même ordre de grandeur entre les deux techniques.

**Tableau 12 : Liste des gènes identifiés dans les 5 premières voies de signalisation dérégulées par le traitement des cellules BEAS-2B avec des MWCNT.**

Après 4 ou 6 semaines de traitement avec du Mitsui-7 (A, 0,25 µg/cm<sup>2</sup>) ou du NM-403 (B, 0,5 µg/cm<sup>2</sup>), le transcriptome des cellules BEAS-2B a été analysé. Les gènes impliqués dans les 5 premières voies de signalisation ont été identifiés. S : semaine.

A.

S4	Mitsui-7	
1	Activation de la cascade du complément liée à la MBP ( <i>Mannose Biding Protein</i> )	<i>C3, C1S, C1R, MBP</i>
2	Transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	<i>JAG2, ZEB1, CDH2, CDH1, VIM, IL6ST, CRB3, FGFR1</i>
3	Protéines à expression altérée dans le mélanome	<i>CDH2, CDH1, MMP1, LAMC2, VIM, FGFR1</i>
4	La signalisation IL13/STAT6/ZEB1 favorise la progression métastatique du cancer	<i>ZEB1, CDH2, CDH2, VIM</i>
5	Protéines à expression altérée dans les métastases cancéreuses	<i>FOXQ1, ZEB1, CDH2, CDH1, MMP1, EPCAM, VIM, FGFR1</i>
S6	Mitsui-7	
1	Protéines à expression altérée dans les métastases cancéreuses	<i>DSP, MMP1, CLDN1, FGF2, FOXQ1, ZEB1, CCND1, CDH2, CDH1, EPCAM, CFL1, CLDN7, VIM, FGFR1</i>
2	Transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	<i>DSP, JAG2, ZEB1, CDH2, CDH1, CLDN7, VIM, IL6ST, CLDN1, FGF2, CRB3, FGFR1</i>
3	Famille TGFβ dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	<i>SMAD1, BMP2, ZEB1, CDH2, CDH1, CLDN7, TSC2, VIM, CLDN1, CRB3</i>
4	Protéines à expression altérée dans le mélanome	<i>SYK, DST, MMP1, F2R, PRKCA, SOD2, FGF2, SERPINB5, TBX2, EFNB2, NRAS, HHAT, CDH3, CCND1, CDH2, CDH1, TLR2, FGFR1</i>
5	WNT dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	<i>ZEB1, CDH2, CDH1, CLDN7, VIM, CLDN1, CRB3</i>

B.

S4		NM-403
1	La signalisation IL13/STAT6/ZEB1 favorise la progression métastatique du cancer	<i>ZEB1, CDH2, VIM</i>
2	Protéines impliquées dans la thrombophilie	<i>PROS1, F12, SAA1, TFPI</i>
3	Cascade de coagulation	<i>F12, PROS1, TFPI</i>
4	Thrombophilie héréditaire	<i>F12, PROS1, TFPI</i>
5	Thrombophilie héréditaire et complications de la grossesse	<i>F12, PROS1, TFPI</i>

S6		NM-403
1	Activation du complément dans la dégénérescence maculaire	<i>C1S, C1R, CLU</i>
2	Transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer	<i>JAG2, ZEB1, VIM, FGFR1</i>
3	Protéines impliquées dans l'oligodendrome	<i>DMBT1, IGFBP2</i>
4	Activation de la cascade du complément liée à la MBP ( <i>Mannose Biding Protein</i> )	<i>C1S, C1R</i>
5	Voie de signalisation du complément	<i>C1S, C1R</i>

**Tableau 13 : Comparatif des techniques de RT-qPCR et transcriptomiques pour l'étude de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.**

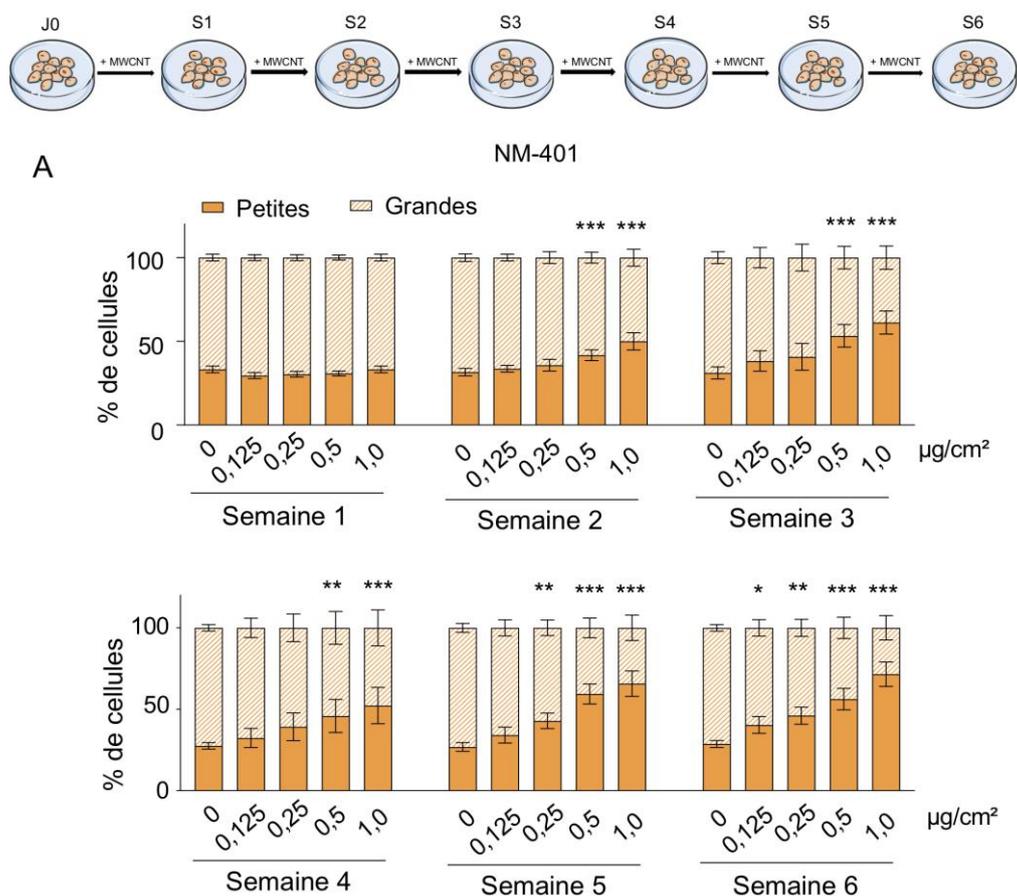
Les niveaux d'expression relatifs au contrôle des gènes *cdh1*, *cldn1*, *vim* et *cdh2* ont été étudiés par RT-qPCR et puce d'expression de gènes après 4 et 6 semaines de traitement avec le Mitsui-7 et le NM-403. Les variations d'expression des gènes par rapport au contrôle sont indiquées. S : semaine.

Gène	S4				S6			
	Mitsui-7		NM-403		Mitsui-7		NM-403	
	PCR	Puce	PCR	Puce	PCR	Puce	PCR	Puce
<i>cdh1</i>	- 0,2	- 1,6	- 0,2	- 1,2	- 0,3	- 1,7	- 0,4	- 1,1
<i>cldn1</i>	- 0,4	- 1,4	- 0,2	- 1,2	- 0,3	- 1,8	- 0,2	- 1,2
<i>vim</i>	+ 3,0	+ 2,1	+ 1,5	+ 1,9	+ 6,0	+ 3,5	+ 2,2	+ 1,9
<i>cdh2</i>	+ 1,6	+ 1,7	+ 1,0	+ 1,5	+ 2,1	+ 1,5	+ 1,0	+ 1,1

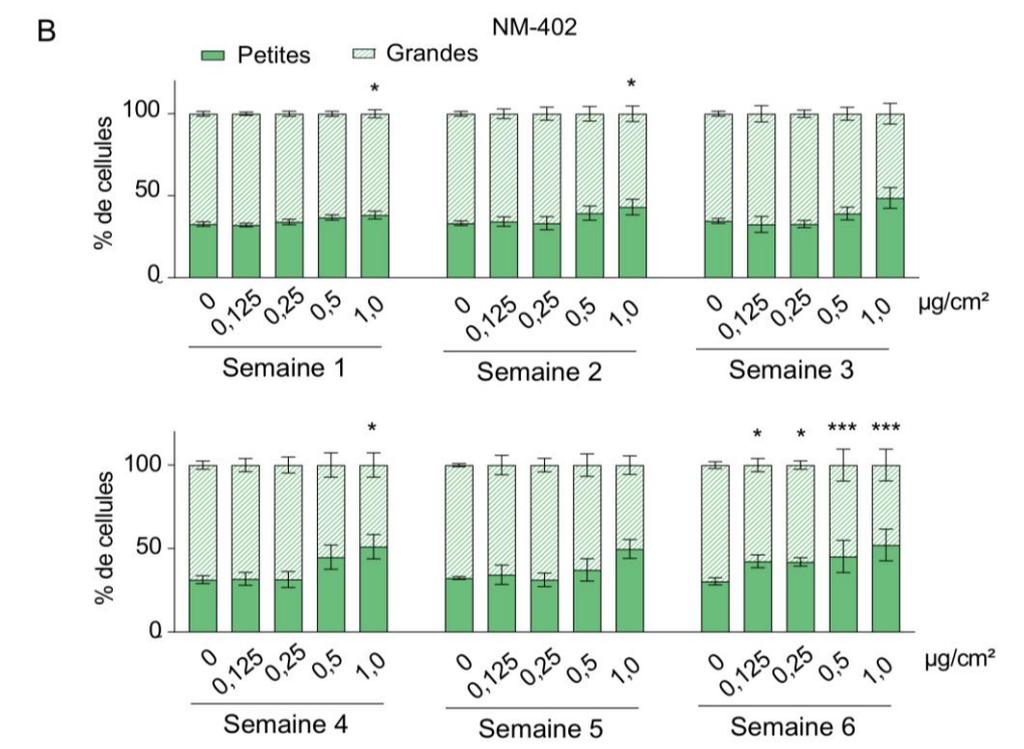
Les analyses transcriptomiques corroborent la mise en place d'une EMT dans les cellules traitées avec les MWCNT. Le Mitsui-7 a induit plus de gènes différentiellement exprimés que le NM-403.

## 2.7. Effet de la longueur et du diamètre sur l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse

Afin d'étendre l'analyse de l'effet de la longueur et du diamètre des MWCNT sur leur capacité à induire l'EMT, une étude préliminaire a été réalisée avec des MWCNT supplémentaires. Les cellules BEAS-2B ont été traitées selon le même schéma que précédemment décrit avec du NM-401 (0,125-1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dont les propriétés physiques ressemblent au Mitsui-7 et du NM-402 (0,125-1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dont les propriétés ressemblent davantage à celles du NM-403. L'analyse de la composition de la population cellulaire a été effectuée par cytométrie en flux. Une augmentation du pourcentage de petites cellules a été observée de façon dépendante de la concentration dans les cellules traitées avec le NM-401 dès la 2<sup>ème</sup> semaine de traitement (Figure 37A). Cette augmentation était croissante jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine, passant de 60% en S2 à 80% en S6. Le traitement des cellules avec le NM-402 a également conduit à une augmentation du pourcentage de petites cellules débutant à la 4<sup>ème</sup> semaine de traitement avec la plus forte concentration (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Figure 37B). Après 5 et 6 semaines de traitement, les concentrations les plus faibles (0,125-0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ont également induit une augmentation de la population de petites cellules pour représenter entre 50 et 60% de la population en S6.



Légende sur la page suivante.

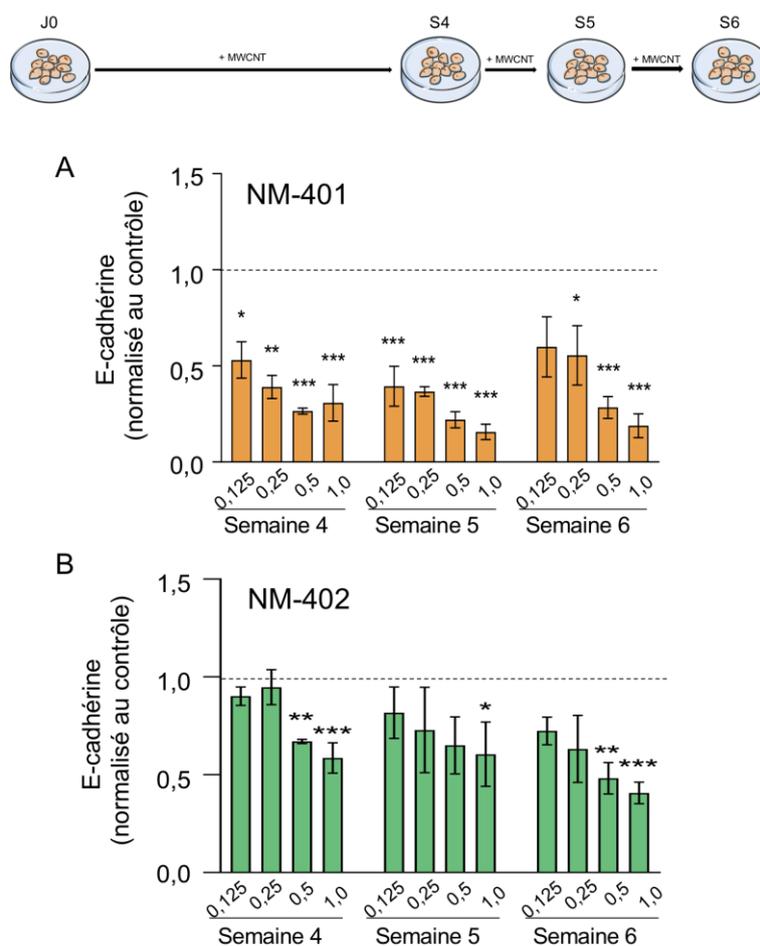


**Figure 37 : Populations cellulaires dans les cellules traitées avec le NM-401 et NM-402.**

Les cellules ont été traitées avec le NM-401 (A) ou le NM-402 (B) aux concentrations indiquées, leur taille et leur granulométrie ont été analysées par cytométrie en flux à partir des profils SSC::FSC. Deux populations cellulaires ont été mises en évidence : une population composée de cellules de petite taille et de faible granulométrie (barres pleines) et une population composée de cellules de grande taille et forte granulométrie (barres rayées). Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  la SEM (erreur standard à la moyenne) et sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativement différent du contrôle.

La E-cadhérine a été quantifiée dans la population de petites cellules par cytométrie en flux. Le traitement des cellules avec le NM-401 a diminué de façon dépendante de la concentration la quantité de la E-cadhérine de la S4 à la S6 (Figure 38A). L'effet du traitement avec le NM-401 a diminué de plus de moitié la quantité de E-cadhérine. De même, une diminution dépendante de la concentration de NM-402 a été constatée de la S4 à la S6 (Figure 38B).

D'autres MWCNT, de paramètres physiques comparables au Mitsui-7 et au NM-403, ont induit une transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules BEAS-2B.



**Figure 38 : Quantité de marqueur extracellulaire E-cadhérine dans les cellules traitées avec les NM-401 et NM-402.**

Le marqueur extracellulaire E-cadhérine a été quantifié dans la population de petites cellules par cytométrie en flux suite au marquage des cellules avec l'anticorps anti-E-cadhérine. Les histogrammes représentent le rapport d'intensité de fluorescence moyenne/nombre total des petites cellules rapporté au témoin. Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  la SEM (erreur standard à la moyenne) et sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativement différent du contrôle.

### 3. Étude de la toxicité des MWCNT *in vivo*

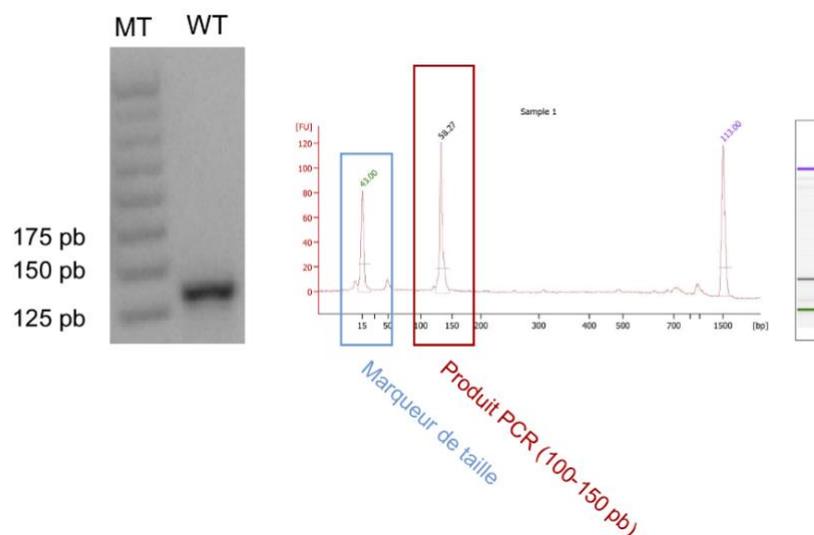
L'utilisation d'un modèle de rat OGM hétérozygote pour p53 ( $p53^{+/-}$ ) permettrait d'évaluer le potentiel cancérigène des MWCNT à l'aide d'un modèle alternatif dont les avantages sont notamment, la réduction du nombre d'animaux et le développement de tumeurs de façon plus précoce chez les rats OGM que chez les rats de génotype sauvage (WT). Les animaux WT et OGM  $p53^{+/-}$  ont été exposés aux MWCNT Mitsui-7 et NM-403 par instillation intra-trachéale (IT) à l'âge de 12 semaines selon le schéma suivant : 1 IT/semaine pendant 4 semaines à raison de 250  $\mu\text{g}/\text{IT}/\text{rat}$  pour une dose totale administrée de 1  $\text{mg}/\text{rat}$ . Un groupe contrôle a été exposé par IT avec du Pluronic qui était le milieu de dispersion des MWCNT. Un premier groupe

d'animaux a été mis à mort 3 jours post-exposition (J3) et un second groupe 8 mois post-exposition (M8), permettant d'évaluer la toxicité des MWCNT, respectivement, à court et à long terme.

### 3.1. Génotypage des animaux

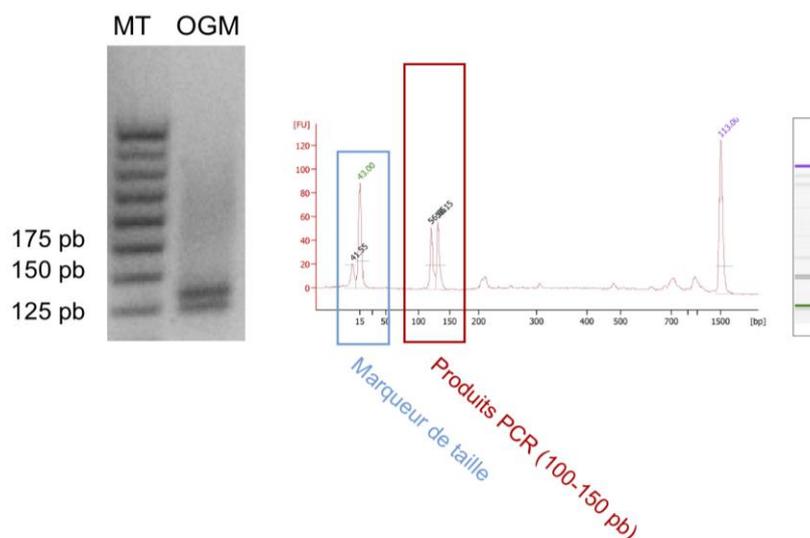
Afin de confirmer le génotype des animaux WT et des animaux OGM  $p53^{+/-}$ , un génotypage a été réalisé à partir d'un échantillon de sang prélevé à la queue de chaque rat. L'ADN a été extrait puis une PCR a été réalisée à l'aide d'amorces ciblant le gène *Tp53*. Les produits de PCR ont été migrés sur gel d'agarose afin d'identifier leurs tailles, parallèlement à une analyse par puce (Bioanalyser). La Figure 39A illustre un exemple de profil de gel d'agarose ainsi que de gels qui ont été réalisés au Bioanalyser pour un produit de PCR correspondant à un animal WT. Pour ces animaux, le produit de PCR était unique, d'une taille de 131 pb. La Figure 39B indique les profils provenant d'un animal OGM. Pour ces derniers il était possible de distinguer deux produits de PCR de tailles différentes, 131 pb et 120 pb, correspondant, respectivement, au gène sauvage et au gène tronqué de *Tp53*. Ces analyses ont permis de confirmer le statut WT ou OGM de chaque rat.

A



Légende sur la page suivante.

B



**Figure 39 : Résultats du génotypage des animaux WT et OGM.**

Une PCR ciblant le gène *Tp53* a été réalisée à partir des échantillons de sang des rats afin de vérifier leur génotype. Les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose, la taille a été identifiée grâce à la présence d'un marqueur de taille (25 pb). Les produits de PCR ont également été analysés par Bioanalyzer afin d'identifier le/les produits de PCR et leur taille. La figure représente un exemple du résultat du génotypage d'animaux WT (A) ou OGM (B). MT : marqueur de taille.

### 3.2. Transposition de la dose à une exposition réelle chez l'Homme

Dans notre étude, les rats ont été exposés par instillation intratrachéale à une dose cumulée de 1 mg par rat. Afin de rapporter cette dose d'exposition chez l'animal à exposition par inhalation de salariés aux MWCNT, la méthodologie décrite par Oberdörster a été utilisée (Oberdorster *et al.*, 2015). Elle repose sur l'équivalence des doses retenues pulmonaires (exprimées en quantité par surface de poumon) entre les deux espèces et fait appelle à différents ajustement allométriques (au niveau de la surface pulmonaire et des paramètres respiratoires, notamment) et à la connaissance des fractions déposées dans l'arbre respiratoire. Ces dépôts dépendent des caractéristiques des aérosols auxquels sont exposés les individus (rats ou salariés) et à la géométrie de leurs arbres respiratoires, ils sont estimés à l'aide du modèle mathématique MPPD (*Multiple-Path Dosimetry Model*) (Anjilvel and Asgharian, 1995, Asgharian and Anjilvel, 1998, Gangwal *et al.*, 2011). Dans un premier temps, la quantité totale de MWCNT administrée a été rapportée à la surface alvéolaire du poumon de rat (0,4 m<sup>2</sup>), puis adaptée à la surface alvéolaire du poumon de l'Homme (102 m<sup>2</sup>) :

$$1 \text{ mg}/0,4 \text{ m}^2 \text{ (de poumon de rat)} = 1/0,4 = 2,5 \text{ mg/m}^2$$

$$2,5 \text{ mg/m}^2 \times 102 \text{ m}^2 \text{ (de poumon d'Homme)} = 255 \text{ mg de MWCNT dans un poumon d'Homme.}$$

Les pourcentages des MWCNT déposés dans les poumons (somme des fractions alvéolaire et trachéo-bronchique) ont été estimés (à l'aide de MPPD) à 3% pour le NM-403 et à environ 15% pour le Mitsui-7 (Gaté *et al.*, 2021, Cosnier *et al.*, 2021). Cela permet de calculer les quantités inhalées :

Si 255 mg = 3% (de NM-403),  $100\% = 255 \times 100 / 3 = 8500$  mg de NM-403.

Si 255 mg = 15% (de Mitsui-7),  $100\% = 255 \times 100 / 15 = 1700$  mg de Mitsui-7.

En considérant un débit respiratoire de 15 L/min, un homme respire tout au long d'une carrière de 45 ans (à raison de 1600 heures de travail par an) -64800000 L ou 64800 m<sup>3</sup> d'air (= 4320000 min  $\times$  15 L/min) soit environ 65000 m<sup>3</sup>. La quantité de MWCNT inhalée a donc été rapportée au volume respiré pendant une carrière de 45 ans :

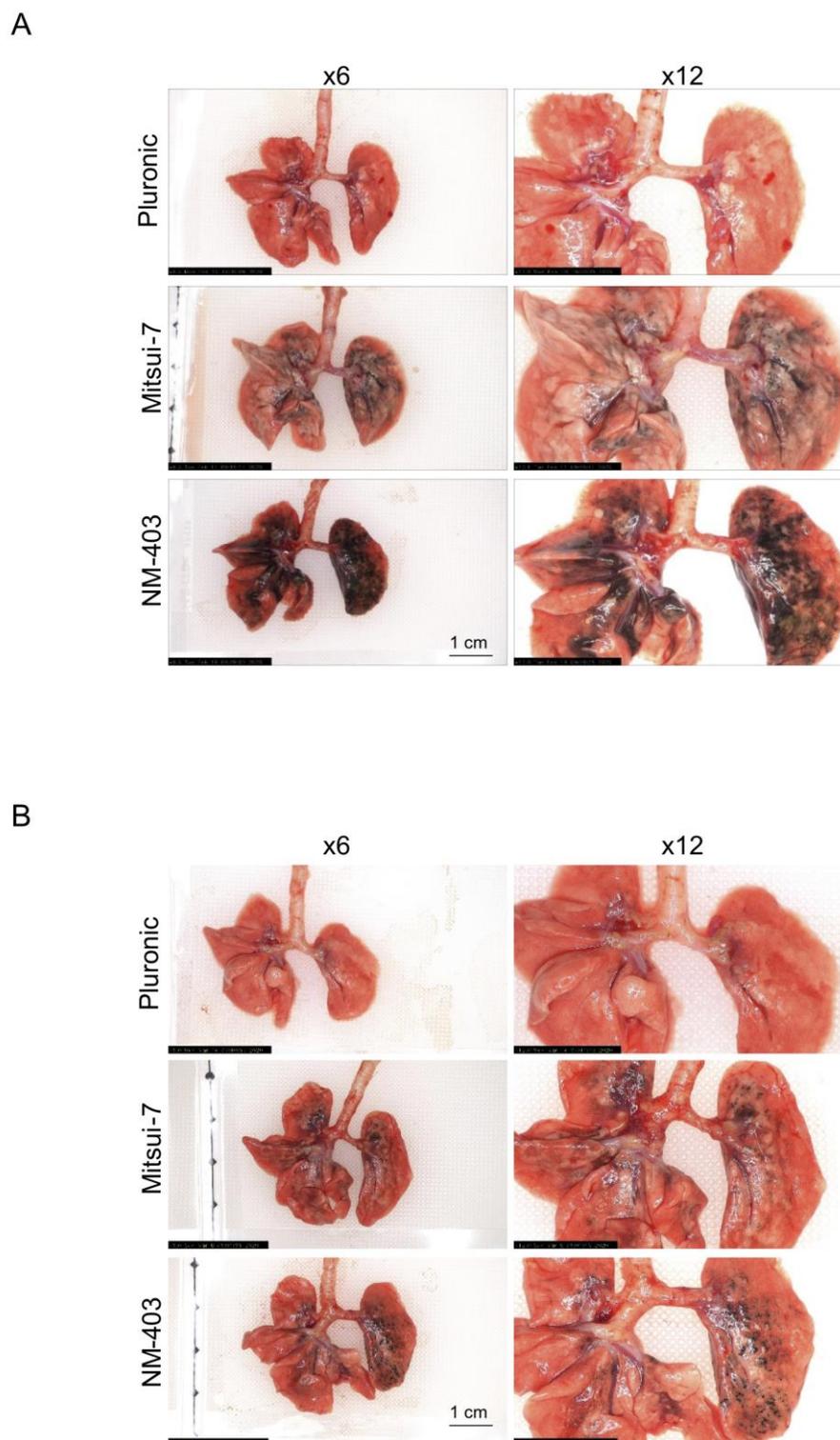
$8500 \text{ mg de NM-403} / 65\,000 \text{ m}^3 = 0,131 \text{ mg/m}^3 = 131 \text{ }\mu\text{g/m}^3$

$1700 \text{ mg de Mitsui-7} / 65\,000 \text{ m}^3 = 0,026 \text{ mg/m}^3 = 26 \text{ }\mu\text{g/m}^3$

D'après ces calculs, la dose d'exposition des animaux WT et OGM peut être comparée pour les deux MWCNT. Ainsi, la dose déposée de NM-403 est environ 5 fois supérieure à celle du Mitsui-7 pour l'Homme. Ce calcul comprend un certain nombre d'incertitudes comme l'absence de mécanisme de clairance ou la prise en compte des caractéristiques granulométriques des particules, toutefois, il permet d'estimer la dose déposée entre les deux MWCNT chez l'Homme.

### 3.3. Distribution des nanotubes de carbone dans les poumons

Les observations macroscopiques des poumons des rats WT et OGM p53<sup>+/-</sup> exposés au Mitsui-7 et au NM-403 3 jours et 8 mois post-exposition n'ont pas montré de différences morphologiques significatives de l'organe entre les groupes. De plus, des différences de distribution des MWCNT n'ont pas été constatées entre les groupes WT et OGM ainsi qu'entre les animaux exposés au Mitsui-7 ou au NM-403. Les deux MWCNT se sont déposés dans tous les lobes pulmonaires (Figure 40A). Les MWCNT étaient toujours visibles à l'échelle macroscopique à 8 mois post-exposition (Figure 40B).

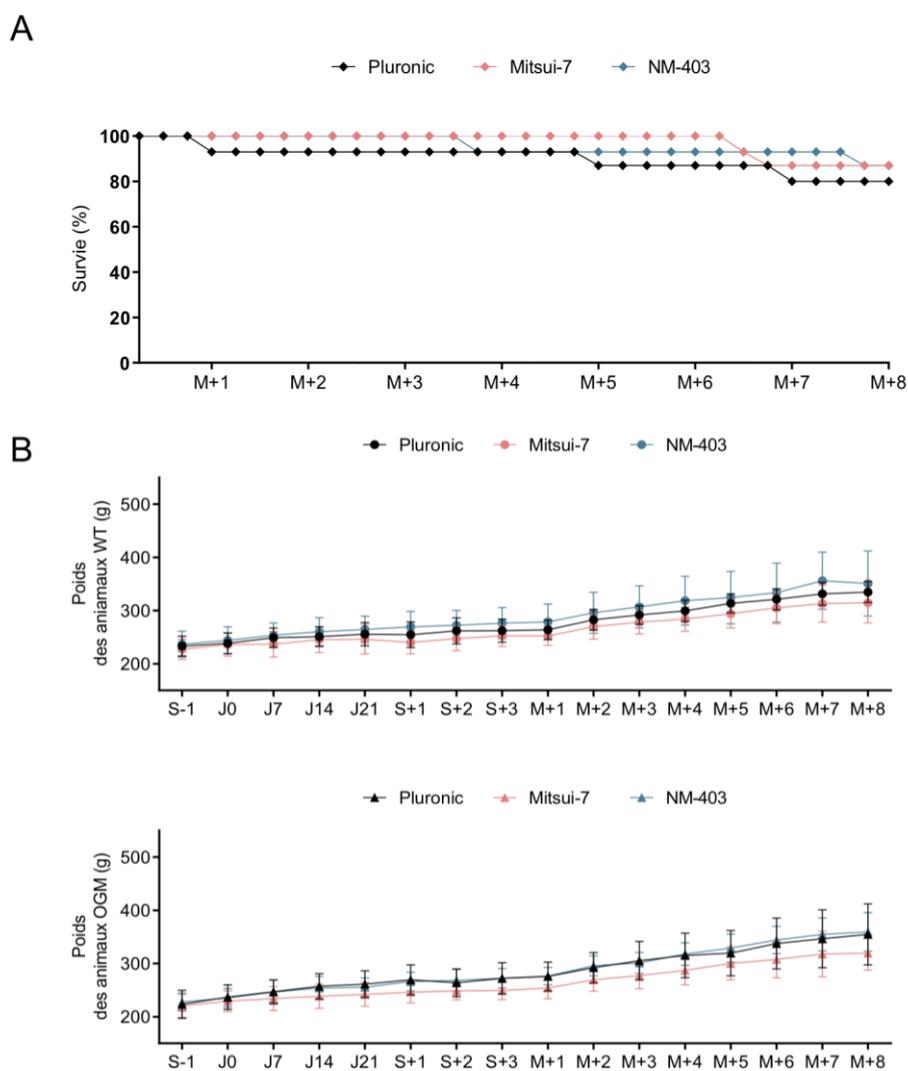


**Figure 40 : Observation macroscopique des poumons des rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 et au NM-403.**

Les rats ont été exposés au Mitsui-7, au NM-403 ou au contrôle Pluronic à raison de 1 IT/semaine pendant 4 semaines. Les poumons ont été prélevés 3 jours post-exposition (A) et 8 mois post-exposition (B). La morphologie du poumon ainsi que la distribution des MWCNT dans cet organe ont été observés macroscopiquement à l'aide d'une caméra numérique aux grossissements x6 et x12. Échelle : 1 cm.

### 3.4. Suivi des animaux et biométrie

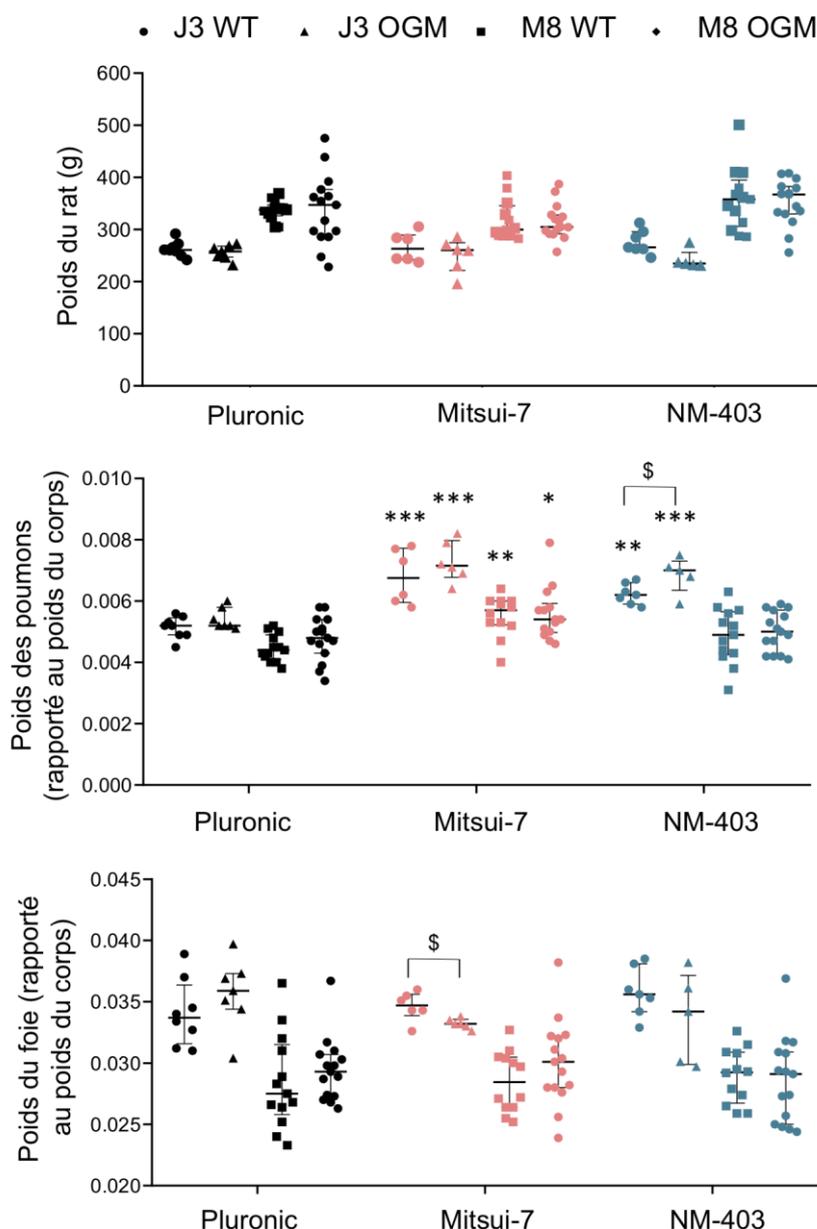
Les animaux ont été suivis jusqu'à 8 mois post-exposition. Seuls quelques animaux OGM ont atteint un point limite au cours du suivi. Trois animaux contrôles, 2 animaux exposés au Mitsui-7 et 2 animaux exposés au NM-403 ont ainsi été mis à mort. Le pourcentage de survie des animaux à 8 mois était donc de 80% sans effet de l'exposition (Figure 41A). De même, aucune différence significative du poids des animaux n'a été constatée entre les groupes témoins *versus* exposés chez les rats WT et OGM (Figure 41B).



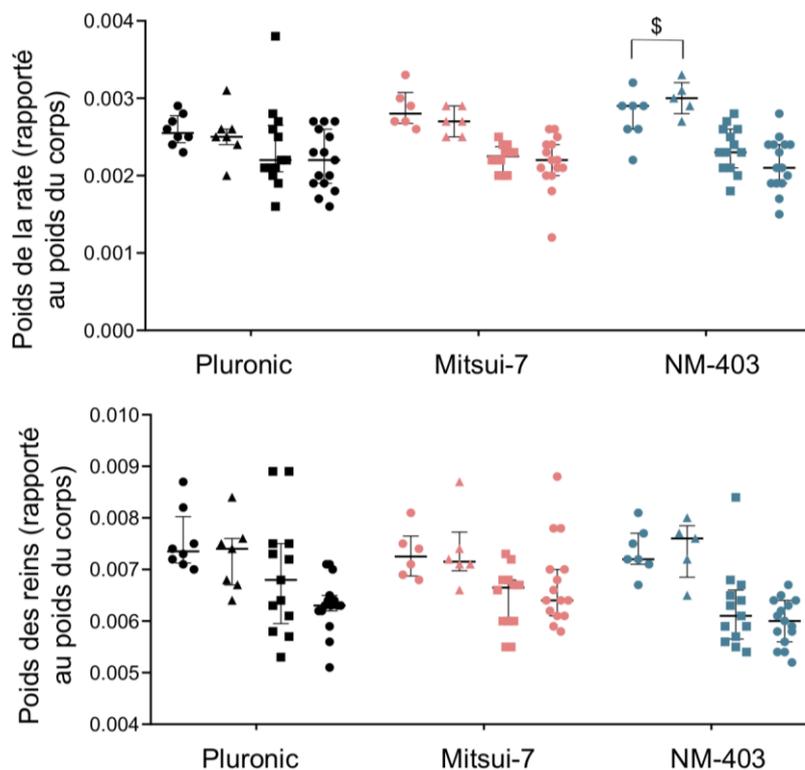
**Figure 41 : Taux de survie et suivi du poids des animaux exposés aux MWCNT.**

Les rats WT et OGM ont été exposés au Mitsui-7, au NM-403 ou au contrôle Pluronic à raison de 1 IT/semaine pendant 4 semaines. (A) Le taux de survie (%) a été établi durant les 8 mois de suivi des animaux. (B) Les animaux WT et OGM de chaque groupe ont été pesés une semaine avant les IT (S-1), avant chaque IT (J0, J7, J14 et J21), puis une fois par semaine ou une fois par mois après la dernière IT (S+/M+) pendant les 8 mois post-exposition. IT : instillation intra-trachéale J : jour, S : semaine, M : mois.

Les paramètres biométriques ont été déterminés pour les animaux WT et OGM exposés au Mitsui-7 et au NM-403 à 3 jours et 8 mois post-exposition. Le poids du poumon, du foie, de la rate et des reins a été rapporté au poids corporel de chaque animal. Le poids des animaux ainsi que le rapport du poids du foie, de la rate et des reins/poids corporel étaient stables entre les groupes témoins et exposés chez les animaux WT et OGM. La mesure du poids des poumons a montré une augmentation significative de celui-ci 3 jours après exposition aux deux MWCNT chez les rats WT et OGM par rapport à leur contrôle Pluronic respectif. Cette augmentation a persisté jusqu'à 8 mois après l'exposition au Mitsui-7 alors qu'elle n'était plus présente chez les rats exposés au NM-403 (Figure 42).



Légende sur la page suivante.



**Figure 42 : Données biométriques des organes des rats exposés au Mitsui-7 et au NM-403.**

Les rats WT et OGM ont été exposés au Mitsui-7, au NM-403 ou au contrôle Pluronic à raison de 1 IT/semaine pendant 4 semaines. Aux temps 3 jours (J3) et 8 mois (M8), les rats ont été pesés puis mis à mort. Les différents organes ont été prélevés puis pesés. Le poids du poumon, du foie, de la rate et des reins a été rapporté au poids de l'animal. Les diagrammes représentent la médiane et les quartiles Q1 et Q3. Les valeurs individuelles sont présentées pour chaque groupe, n=7 à 14 rats/groupe. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativement différents du contrôle pour chaque génotype. \$  $p < 0,05$  significativement différent des animaux WT. J3 rats WT : rond, J3 rats OGM : triangle, M8 rats WT : carré, M8 rats OGM : losange.

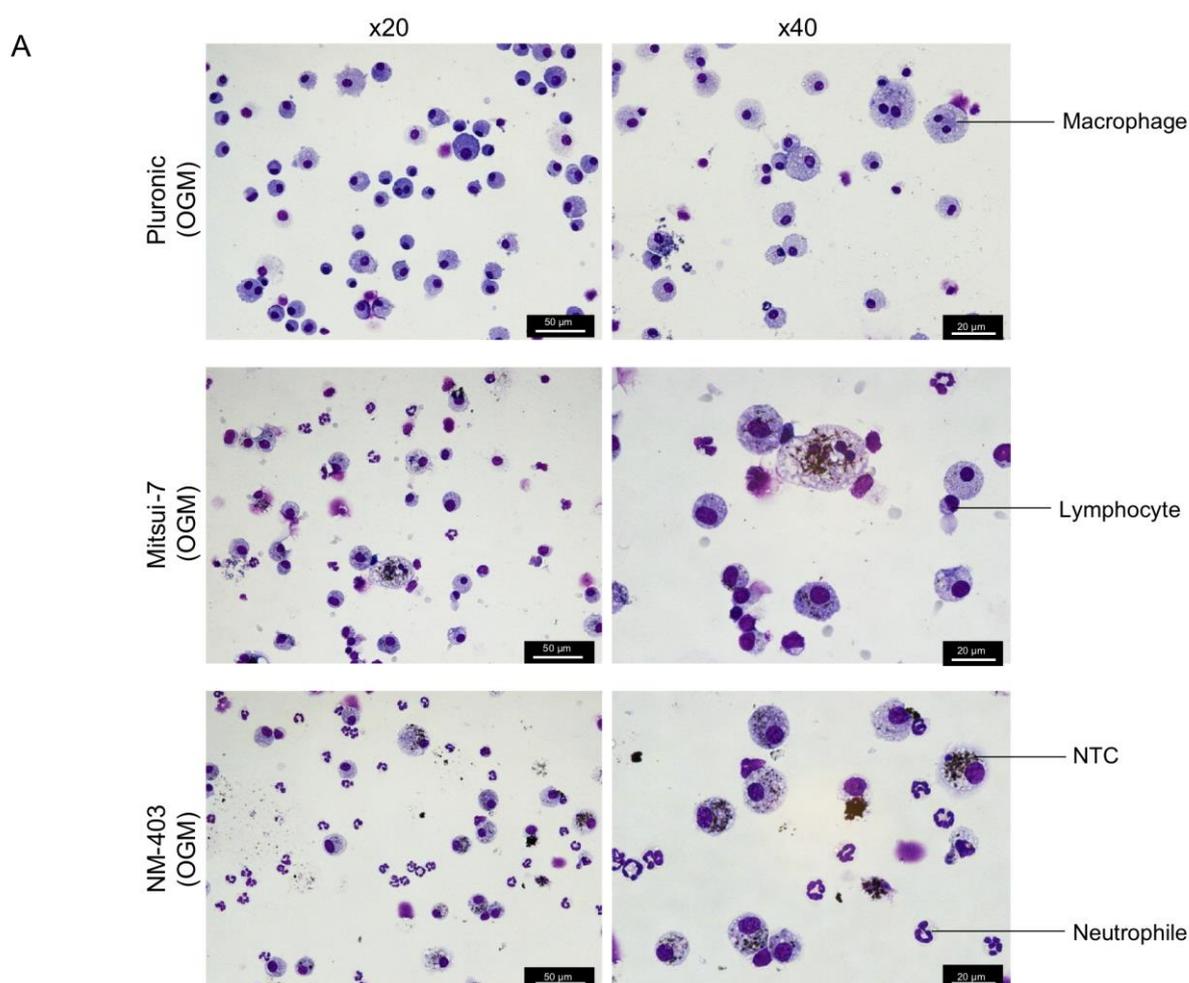
Une légère différence de poids des poumons et de la rate a été constatée à J3 après exposition des animaux au NM-403, et du foie après exposition des animaux au Mitsui-7 entre les animaux OGM et les animaux WT.

Les MWCNT induisent une augmentation du poids des poumons à J3, persistante à 8 mois chez les rats exposés au Mitsui-7.

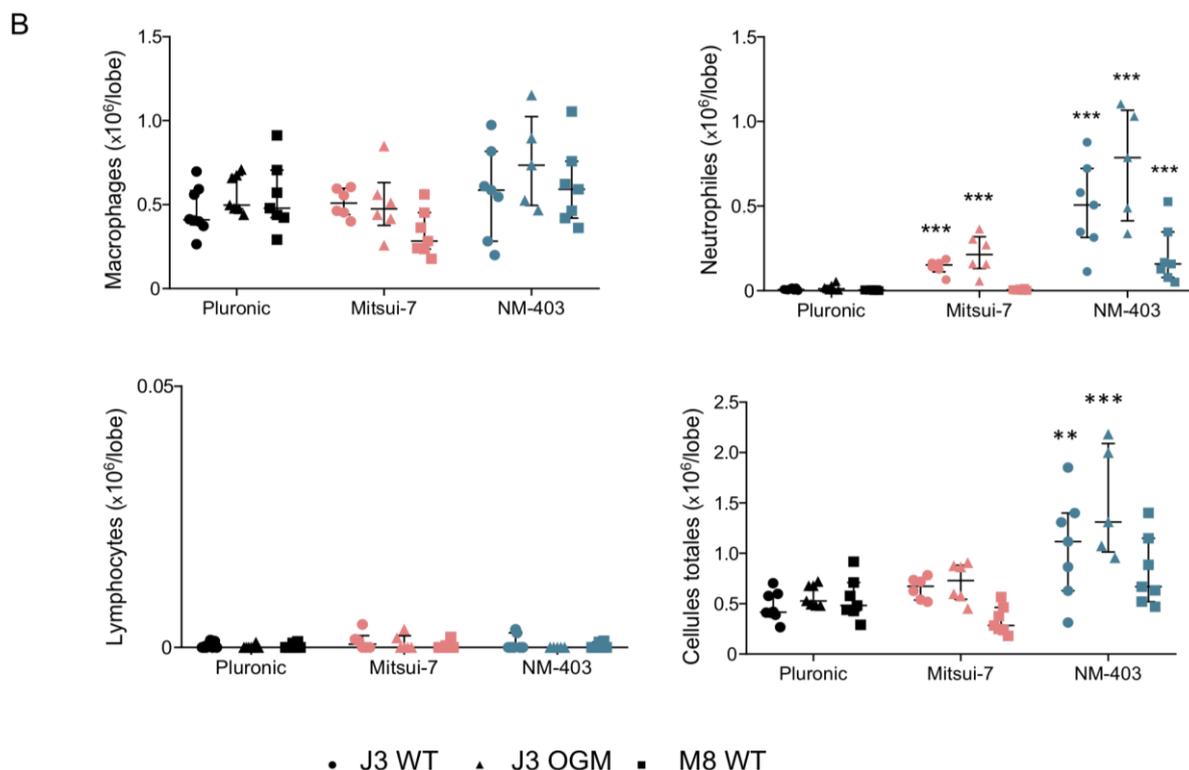
### 3.5. Analyses du lavage broncho-alvéolaire

#### 3.5.1. Analyse cytologique

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) a permis l'échantillonnage de l'espace alvéolaire. La cytologie du LBA a été réalisée chez les animaux WT et OGM des groupes contrôles et exposés au Mitsui-7 et NM-403 3 jours post-exposition et uniquement des rats WT 8 mois post-exposition. Suite à une coloration de May-Grünwald Giemsa, les différents types cellulaires (macrophages, lymphocytes et polynucléaires neutrophiles) ont été identifiés et comptés. L'observation des lames a permis d'identifier des MWCNT à proximité ou dans les macrophages en grande quantité (Figure 43A).



Légende sur la page suivante.



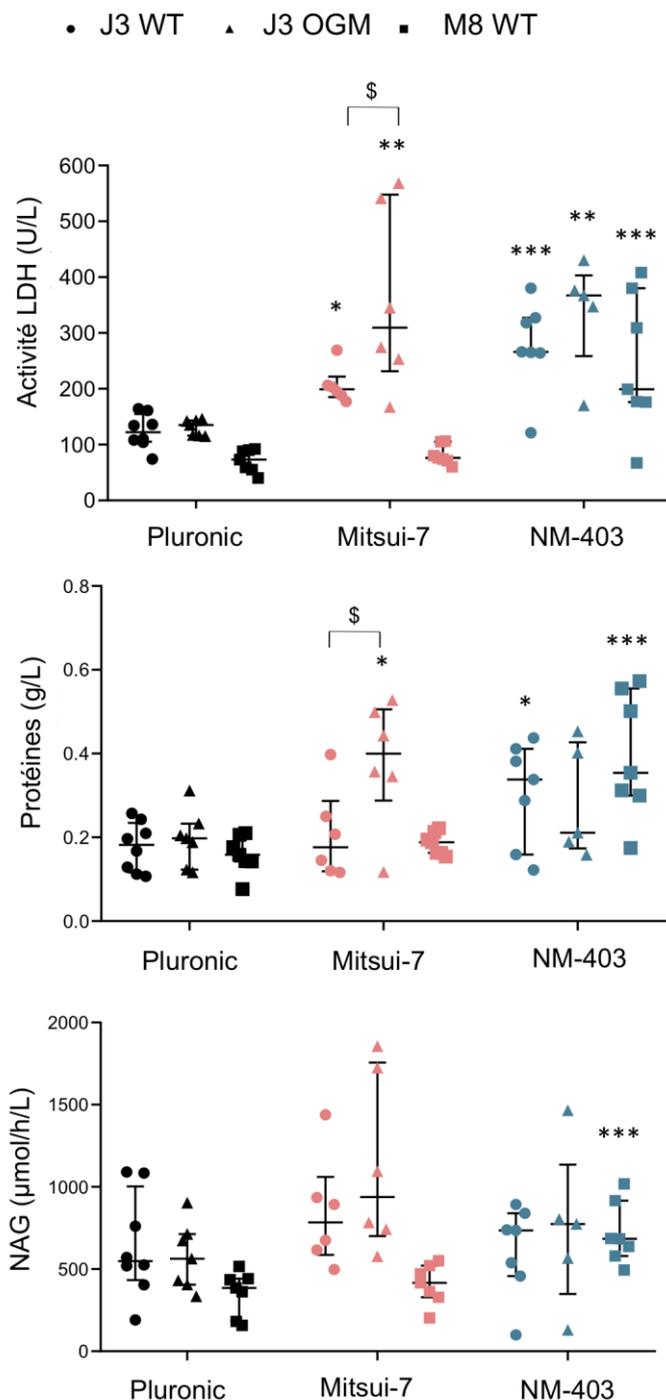
**Figure 43 : Cytologie du lavage broncho-alvéolaire des animaux exposés aux MWCNT.**

Les rats WT et OGM ont été exposés au Mitsui-7, au NM-403 ou au contrôle Pluronic à raison de 1 IT/semaine pendant 4 semaines. Le LBA a été réalisé sur le poumon gauche des animaux 3 jours (animaux WT et OGM) et 8 mois post-exposition (animaux WT). Les cellules ont été colorées par la méthode de May-Grünwald Giemsa puis observées au microscope optique. (A) Les photos sont représentatives de la population cellulaire dans le LBA des animaux OGM contrôles et exposés à J3. Échelles : 50 et 20  $\mu\text{m}$ . (B) Le nombre de macrophages, de polynucléaires neutrophiles, de lymphocytes ainsi que le nombre total de cellules a été déterminé pour chaque animal. Les diagrammes représentent la médiane et les quartiles Q1 et Q3. Les valeurs individuelles sont présentées pour chaque groupe,  $n=7$  à 14 rats/groupe. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativement différents du contrôle pour chaque génotype. J3 rats WT : rond, J3 rats OGM : triangle, M8 rats WT : carré.

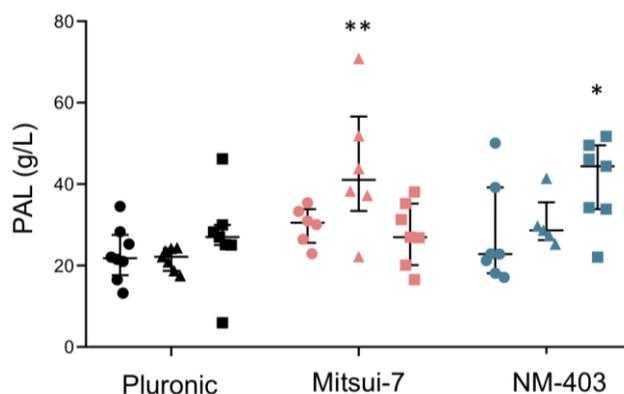
L'analyse cytologique du LBA a mis en évidence une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles à J3 chez les rats WT et OGM exposés aux MWCNT en comparaison à leur groupe contrôle respectif (Figure 43B). Or, l'influx de neutrophiles est considéré comme un évènement caractéristique de l'inflammation. À 8 mois post-exposition, l'augmentation des neutrophiles était persistante uniquement chez les animaux exposés au NM-403. Aucune différence significative n'a été constatée entre les animaux WT et OGM.

3.5.2. Analyses biochimiques

Conformément à l'inflammation observée précédemment, l'exposition des rats aux MWCNT a induit une augmentation de l'activité LDH dans le LBA. Cette augmentation a été observée à J3 chez les rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 et au NM-403. Alors que le niveau d'activité de la LDH était revenue à un niveau basal chez les rats WT 8 mois après exposition au Mitsui-7, il était resté augmenté dans les échantillons de LBA de rats exposés au NM-403 (Figure 44).



Légende sur la page suivante.



**Figure 44 : Analyses biochimiques du lavage broncho-alvéolaire des rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 et au NM-403.**

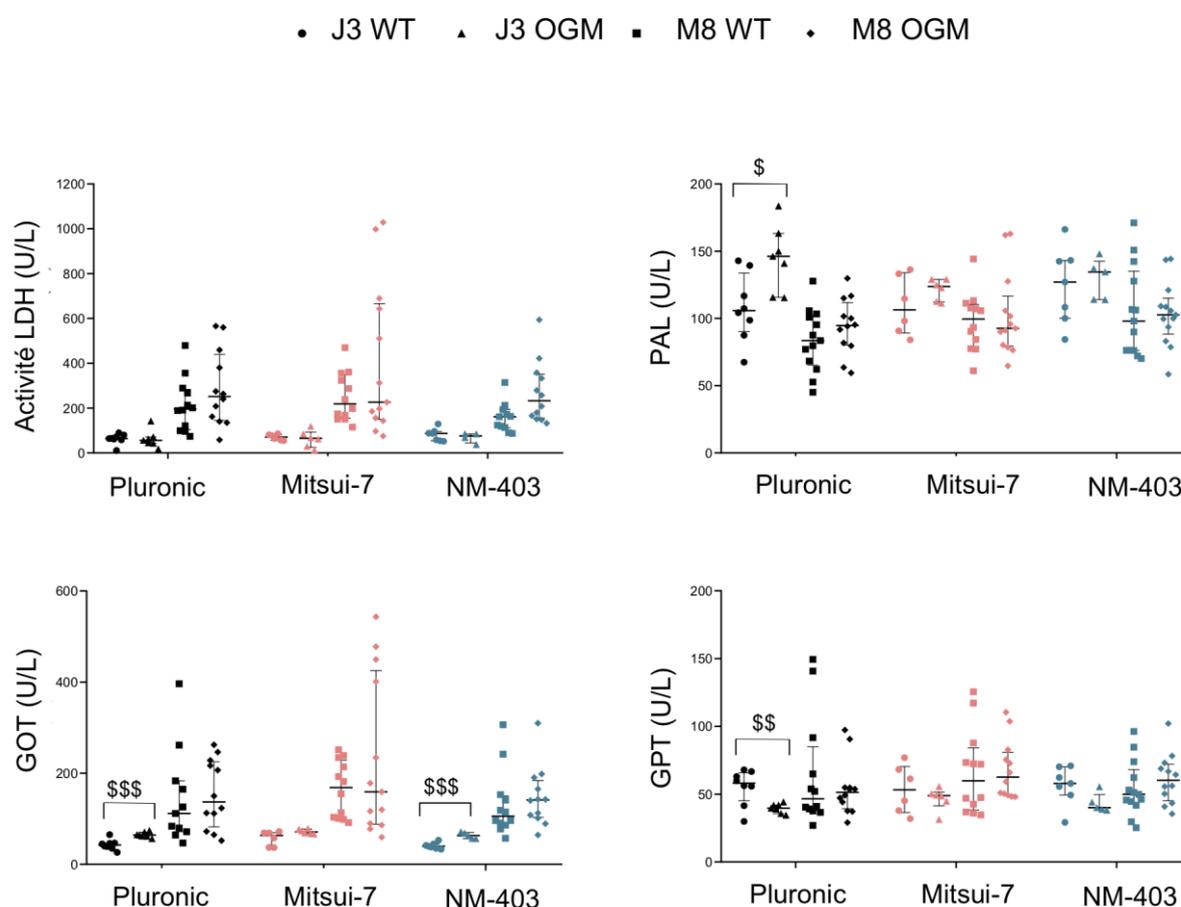
Les rats WT et OGM ont été exposés au Mitsui-7, au NM-403 ou au contrôle Pluronic à raison de 1 IT/semaine pendant 4 semaines. Le LBA a été collecté 3 jours post-exposition (J3) chez les animaux WT et OGM et 8 mois post-exposition (M8) chez les animaux WT. L'activité enzymatique de la lactate deshydrogénase (LDH), de la phosphatase alcaline (PAL) et de la N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) a été mesurée dans le LBA. Les diagrammes représentent la médiane et les quartiles Q1 et Q3. Les valeurs individuelles sont présentées pour chaque groupe, n=7 à 14 rats/groupe. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 significativement différents du contrôle pour chaque génotype. \$ p < 0,05 significativement différent des animaux WT. J3 rats WT : rond, J3 rats OGM : triangle, M8 rats WT : carré.

La concentration de protéines totales a suivi la même tendance, c'est-à-dire, une augmentation significative à J3 chez les animaux exposés au Mitsui-7 (OGM) et au NM-403 (WT). Cependant, 8 mois post-exposition, l'augmentation de la concentration protéique chez les animaux WT exposés au NM-403 était persistante, alors que la concentration était au même niveau que les témoins chez les animaux exposés au Mitsui-7. Par ailleurs, peu d'effets des expositions ont été observés sur la N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) et la phosphatase alcaline (PAL), enzymes hépatiques intervenant dans la détoxification hépatique. Seules les expositions des rats OGM au Mitsui-7 ont induit une légère augmentation de la PAL à J3. L'exposition au NM-403 a induit une augmentation de la PAL et de la NAG 8 mois post-exposition (Figure 44). La comparaison des deux modèles WT et OGM a montré une différence significative uniquement à J3 chez les animaux exposés au Mitsui-7. Ces différences concernaient l'activité de la LDH et la concentration protéique qui étaient plus élevées chez les animaux OGM.

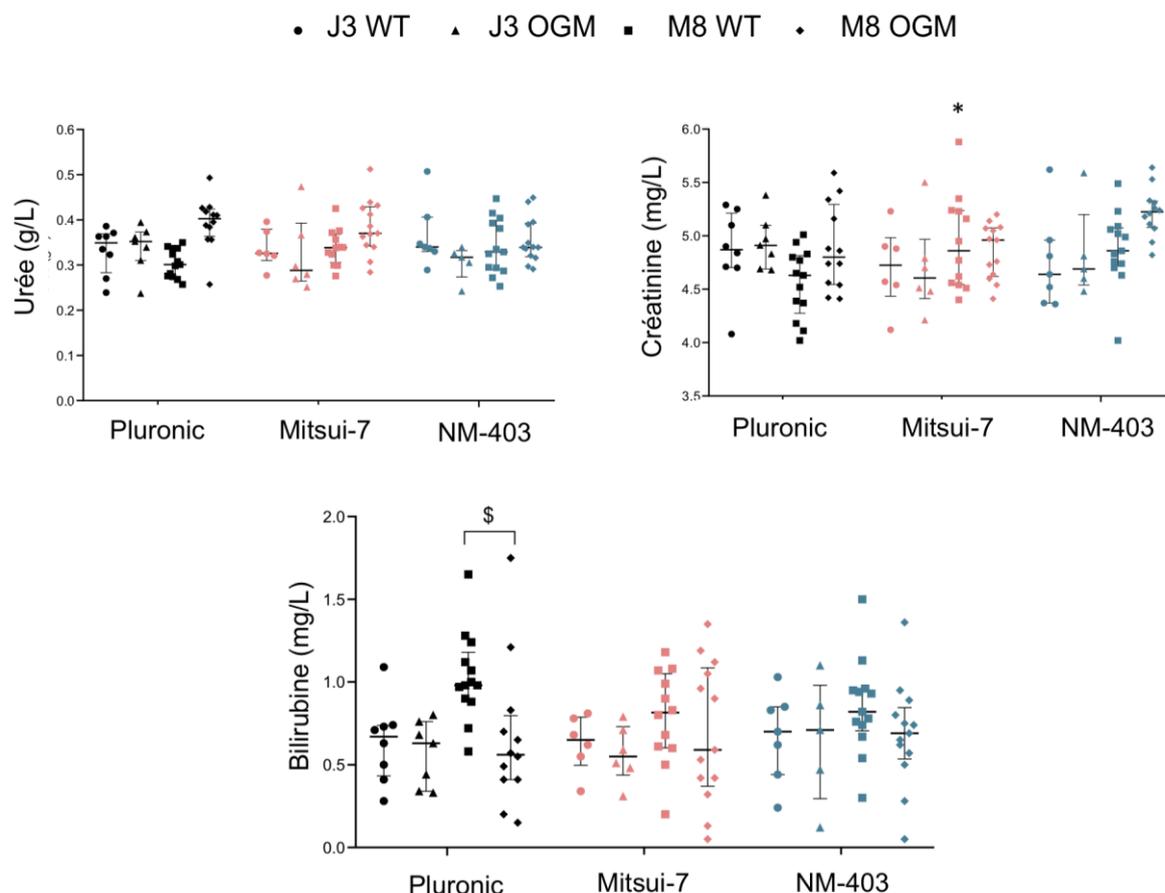
L'exposition aux MWCNT a induit une inflammation et une toxicité pulmonaire à J3 qui était persistante chez les animaux exposés au NM-403.

### 3.6. Analyse des marqueurs de cytotoxicité dans le plasma

Les analyses dans le plasma des animaux WT et OGM exposés aux MWCNT ont été réalisées à J3 et M8. Dans le plasma, l'activité LDH, tout comme l'activité enzymatique de la PAL, de la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), de la glutamate pyruvate transaminase (GPT), et la concentration d'urée, de bilirubine et de créatinine n'ont pas montré d'augmentation significative chez les animaux exposés au Mitsui-7 ou au NM-403, indiquant l'absence d'une toxicité systémique chez les animaux WT et OGM (Figure 45).



Légende sur la page suivante.



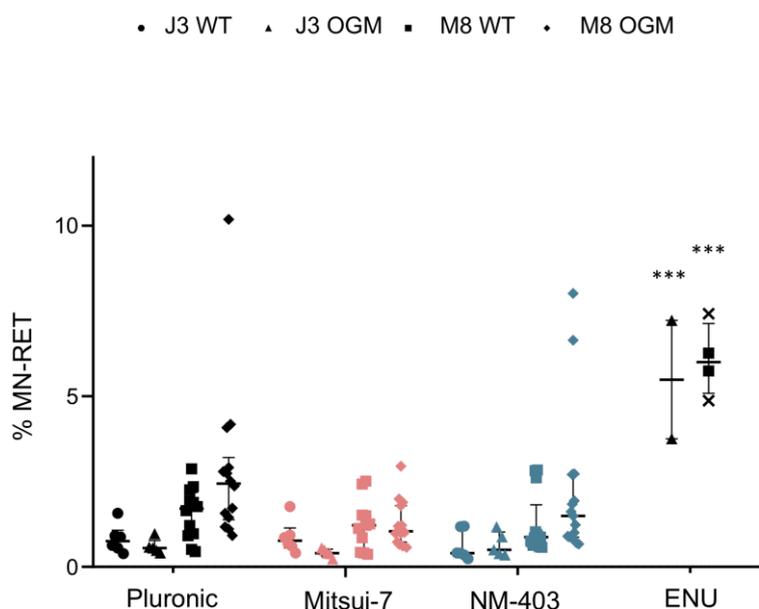
**Figure 45 : Analyses biochimiques du plasma des rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 et au NM-403.**

Les rats WT et OGM ont été exposés au Mitsui-7, au NM-403 ou au contrôle Pluronic à raison de 1 IT/semaine pendant 4 semaines. Le plasma a été collecté 3 jours (J3) et 8 mois post-exposition (M8) chez les animaux WT et OGM. L'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH), de la phosphatase alcaline (PAL), de la glutamate oxyloacétate transaminase (GOT), de la glutamate pyruvate transaminase (GPT) et le taux d'urée, de bilirubine et de créatinine ont été mesurés dans le plasma. Les diagrammes représentent la médiane et les quartiles Q1 et Q3. Les valeurs individuelles sont présentées pour chaque groupe, n=7 à 14 rats/groupe. \*  $p < 0,05$  significativement différents du contrôle pour chaque génotype. \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$ , \$\$\$  $p < 0,001$  significativement différent des animaux WT. J3 rats WT : rond, J3 rats OGM : triangle, M8 rats WT : carré, M8 rats OGM : losange.

La comparaison des modèles WT et OGM ont mis en évidence une réponse significativement différente entre les deux groupes contrôle au temps J3. Les animaux OGM contrôles avaient une activité PAL supérieure, et une activité GOT et GPT inférieure, ainsi qu'un taux de bilirubine inférieur aux animaux contrôles WT. À M8, ces différences n'étaient plus visibles.

### 3.7. Test des micronoyaux

Le test des micronoyaux a été réalisé à partir du sang prélevé à la queue de l'animal. Les échantillons provenant de rats exposés par instillation au contrôle Pluronic, au Mitsui-7, au NM-403 et par gavage à l'ENU (N-nitroso-N-éthylurée) ont été analysés. Les résultats n'ont pas indiqué d'augmentation significative des micronoyaux chez les animaux exposés au Mitsui-7 et au NM-403 à J3 et M8 en comparaison avec les rats contrôles exposés au Pluronic (Figure 46).



**Figure 46 : Les MWCNT n'ont pas induit de micronoyaux chez les animaux WT et OGM.**

Les rats WT et OGM  $p53^{+/-}$  ont été exposés au Mitsui-7, au NM-403 ou au contrôle Pluronic à raison de 1 IT/semaine pendant 4 semaines. Des rats ont été exposés à l'ENU à 48h et 24h avant la mise à mort à une dose respectivement de 50 mg/kg et 25 mg/kg et constituent un contrôle positif. Le test des micronoyaux a été réalisé à partir du sang prélevé à la queue de l'animal à partir des animaux suivis 3 jours (J3) et 8 mois (M8) post-exposition. Les diagrammes représentent la médiane et les quartiles Q1 et Q3. Les valeurs individuelles sont présentées pour chaque groupe,  $n=6$  à 14 rats/groupe. \*\*\*  $p < 0,001$  significativement différents du contrôle. J3 rats WT : rond, J3 rats OGM : triangle, M8 rats WT : carré, M8 rats OGM : losange.

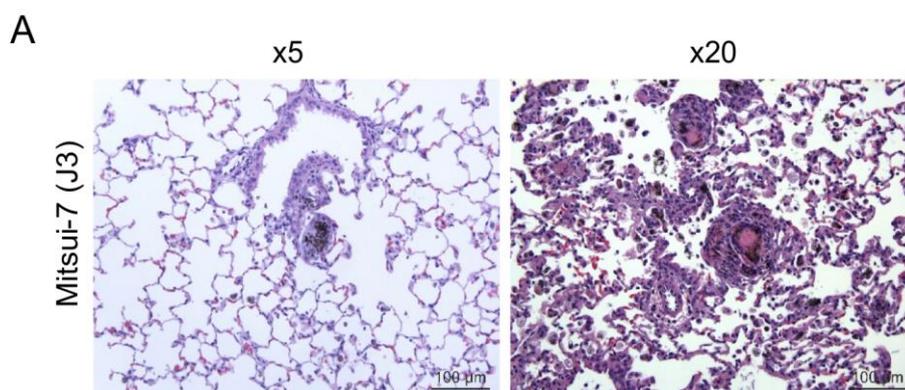
Les rats exposés à l'ENU ont constitué un contrôle positif de cette expérience. Leur pourcentage de micronoyaux était augmenté de 6 fois par rapport au contrôle. Aucune différence significative n'a été constatée entre les animaux WT et OGM.

L'exposition aux MWCNT n'a pas induit de toxicité systémique.

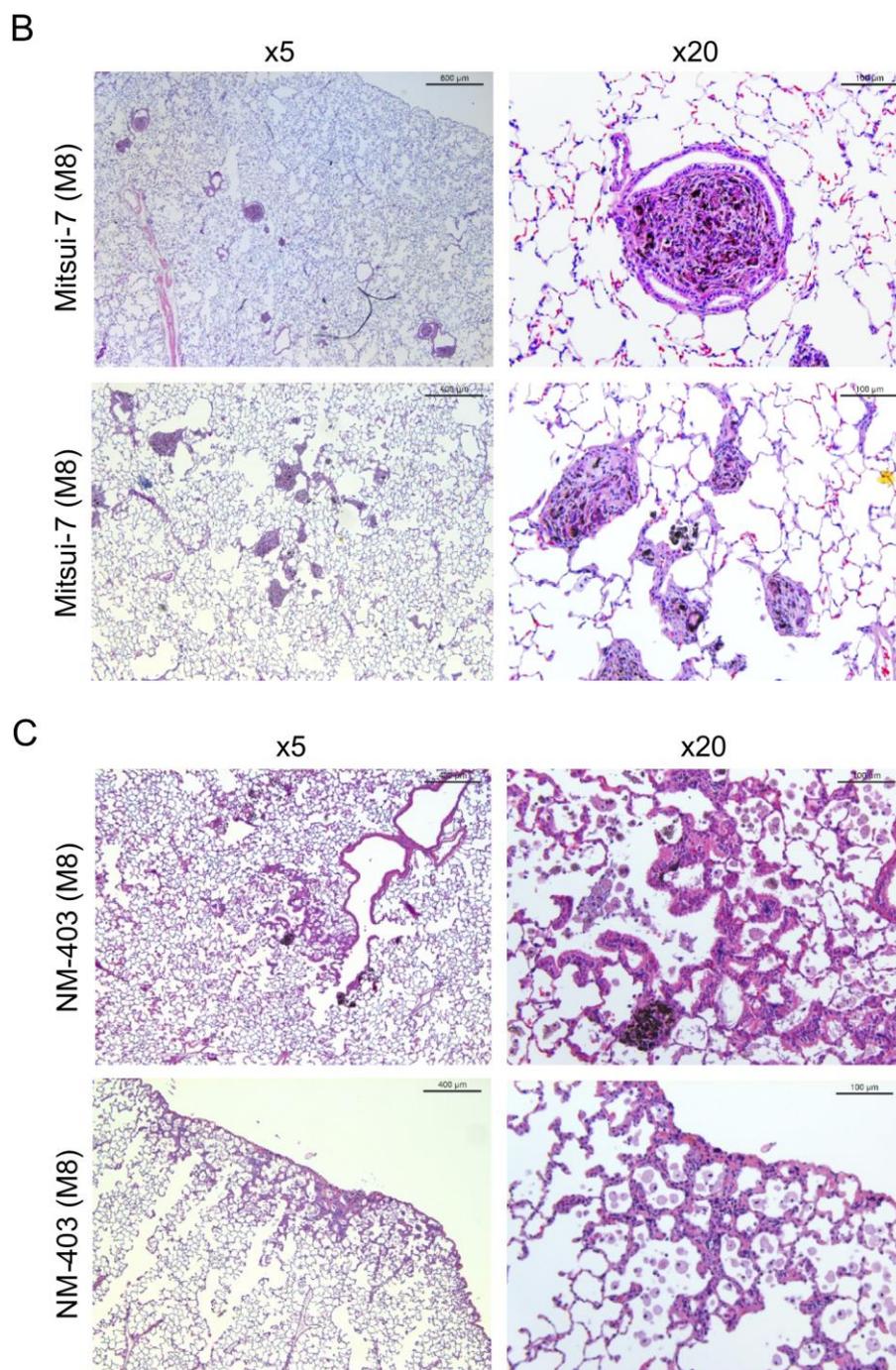
### 3.8. Analyses histopathologiques

Des analyses histopathologiques ont été conduites à J3 à partir du lobe caudal des rats OGM et à M8 à partir du lobe caudal des rats WT et des poumons entiers des rats OGM. Pour cela, les poumons ont été prélevés, inclus en paraffine puis colorés à l'hématoxyline et à l'éosine. Les analyses histopathologiques ont été réalisées par Dr. Henrik Wolf (Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki). L'analyse au temps J3 n'a pas mis en évidence de fibrose interstitielle dans les poumons des animaux exposés au Mitsui-7 ou au NM-403.

Un dépôt de collagène a été identifié dans les poumons de tous les animaux exposés au Mitsui-7 (6/6 rats OGM) à J3. Ce dépôt de collagène était accompagné d'un épaissement de la paroi alvéolaire visible chez tous les animaux exposés à M8 (13/13 rats OGM et 6/6 rats WT). Du Mitsui-7 a été observé sous forme libre à J3 (6/6 rats OGM) et n'a plus été identifié à M8 (0/13 rats OGM et 0/6 rats WT). Par ailleurs, les animaux exposés au Mitsui-7 ont développé des granulomes contenant des MWCNT, des cellules géantes, des cellules épithéliales visibles à J3 (6/6 rats OGM) et à M8 (13/13 rats OGM et 6/6 rats WT, Figure 47). De manière surprenante, du NM-403 sous forme libre n'a pas été constaté à J3 mais a été retrouvé dans les poumons de rats WT (3/6 rats) et OGM (13/14 rats) à M8. Des granulomes ont été identifiés à J3 (3/5 rats OGM) et à M8 (14/14 rats OGM et 6/6 rats WT) des rats exposés au NM-403. Un dépôt de collagène a été identifié dans une moindre mesure chez les animaux exposés au NM-403 à J3 (1/5 rats OGM) et à M8 (8/14 rats OGM et 2/6 WT) en comparaison aux animaux exposés au Mitsui-7.



Légende sur la page suivante.



**Figure 47 : Analyses histologiques des rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 ou au NM-403.**

Les rats WT et OGM ont été exposés au Mitsui-7, au NM-403 ou au contrôle Pluronic à raison de 1 IT/semaine pendant 4 semaines. Les poumons ont été prélevés, inclus en paraffine puis colorés à l'hématoxyline et à l'éosine. Les analyses histopathologiques ont été réalisées par Dr. Henrik Wolf (Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki). Coupes histologiques de poumons de rats OGM : (A) exposés au Mitsui-7 au temps J3, (B) au temps M8, les images indiquent la présence de granulomes et (C) exposés au NM-403 au temps M8, les images indiquent une métaplasie broncho-alvéolaire et un dépôt de collagène. J3 : 3 jours post-exposition, M8 : 8 mois post-exposition.

Plus particulièrement, les rats exposés au NM-403 ont développé une importante métaplasie autour des bronches terminales 8 mois post-exposition (14/14 rats OGM et 3/6 rats WT) contrairement aux rats exposés au Mitsui-7 (3/13 rats OGM et 0/6 rats WT). Les effets semblaient plus importants chez les animaux OGM que chez les rats WT exposés au NM-403.

Les MWCNT ont induit un dépôt de collagène associé aux granulomes à long terme. Le NM-403 a induit le développement d'une métaplasie broncho-alvéolaire contrairement au Mitsui-7.

# V. Discussion

## 1. Étude de la toxicité des MWCNT dans la lignée BEAS-2B

### 1.1. Choix du modèle *in vitro* et des conditions de traitement avec les MWCNT

Chez l'Homme, la prédiction de la toxicité d'une substance est majoritairement basée sur des expérimentations animales. Afin de comprendre le mécanisme d'action toxique d'une substance dans un organisme, l'utilisation des modèles animaux est difficilement remplaçable. Cependant, pour des raisons éthiques et morales, la communauté scientifique a porté une attention particulière au développement de stratégies alternatives utilisant des modèles *in vitro*. De manière générale, il a été recommandé d'appliquer les lignes directrices établies par l'ECHA et l'OCDE concernant les produits chimiques pour l'étude du potentiel toxique et/ou cancérigène des nanoparticules. Bien qu'il n'existe à ce jour aucune ligne directrice spécifique des NTC, depuis 2011, l'ECHA a augmenté ses activités pour mieux protéger la santé humaine et l'environnement contre les risques liés aux nanomatériaux et adapter la réglementation REACH (*Registration, Evaluation and Autorization of Chemicals*). De même, l'OCDE a précisé des lignes directrices ainsi que des recommandations appliquées aux nanomatériaux incluant notamment l'utilisation de modèles animaux et de lignées cellulaires. Les tests de toxicité *in vitro* font partie intégrante des lignes directrices établies par ces organismes. Les lignées cellulaires embryonnaires de souris immortalisées BALB/3T3 A31 ou Bhas 42 ont été recommandées pour la réalisation de tests de cancérogénicité (Reg. EC 440/2008, OCDE 2015). Parallèlement, le choix de la lignée cellulaire pour la réalisation de tests de toxicité cellulaire peut être orienté vers le tissu ou l'organe cible. L'inhalation est la principale voie d'exposition des salariés aux MWCNT, ce qui fait du poumon l'organe cible de ces nanomatériaux. Plus particulièrement, l'épithélium bronchique constitue la première ligne de contact avec les MWCNT. Par conséquent, pour réaliser des tests de toxicité pulmonaire, d'autres lignées cellulaires telles que les petites cellules épithéliales des voies respiratoires humaines (SAEC), les cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) ou les cellules tumorales de poumons humaines (A549) ont été utilisées (Siegrist *et al.*, 2014a, Wang *et al.*, 2014a, Ventura *et al.*, 2020a). La lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B a été établie en 1989 et ne présente pas de caractéristique tumorale (Reddel *et al.*, 1988). C'est pourquoi nous l'avons sélectionnée pour réaliser nos travaux. Les cellules BEAS-2B sont utilisées depuis 2007 pour la réalisation de tests de transformation cellulaire et l'évaluation de la toxicité de composants chimiques ou nanoparticulaires. Par exemple, à l'aide de cette lignée, Gliga *et al.*

ont étudié la toxicité des nanoparticules d'argent et Vales *et al.* le potentiel transformant de MWCNT (Vales *et al.*, 2016, Gliga *et al.*, 2018).

Il existe une grande variabilité des méthodes de culture des cellules BEAS-2B. Selon l'ATCC, il est recommandé d'utiliser un milieu de culture spécifique à ces cellules ne contenant pas de sérum de veau fœtal (SVF) mais des facteurs de croissance adaptés aux cellules épithéliales bronchiques (ATCC, CRL-9609™, (Lechner *et al.*, 1984). Dans la littérature, ces cellules ont été cultivées dans un milieu adapté tels que le BEGM ou le LHC-9 sans SVF (He *et al.*, 2011, Louro *et al.*, 2016, Vales *et al.*, 2016), ou dans un milieu complet supplémenté en SVF (Siegrist *et al.*, 2014a, Siegrist *et al.*, 2014b, Polimeni *et al.*, 2016, Lucas *et al.*, 2021). La diversité des méthodes de culture des cellules BEAS-2B, et notamment la présence/absence de SVF, a amené Zhao et Klimecki à étudier l'impact du SVF sur ces cellules (Zhao and Klimecki, 2015). Cette étude a mis en évidence que la présence de SVF dans le milieu de culture peut modifier la morphologie des cellules BEAS-2B et altérer l'expression de gènes impliqués dans la cancérogenèse et le métabolisme énergétique (Zhao and Klimecki, 2015). Des études de cytotoxicité ont révélé que les cellules BEAS-2B cultivées pendant 8 semaines en présence de 5% de SVF étaient 5 fois plus sensibles à la cytotoxicité de l'arsenic que les mêmes cellules cultivées sans SVF (Zhao and Klimecki, 2015). De même, Malm *et al.* ont montré que la présence de SVF augmentait l'expression des facteurs de transcription responsables de la régulation de l'EMT (Malm *et al.*, 2018). Par ailleurs, il a été mis en évidence que la présence de SVF dans le milieu de culture peut altérer la composition des protéines membranaires des cellules BEAS-2B et influencer la réponse biologique, notamment l'endocytose des MWCNT (Haniu *et al.*, 2013). Ainsi, afin d'éviter toute interférence des conditions de culture sur les résultats de notre étude, nous avons favorisé l'utilisation d'un milieu de culture sans SVF, le milieu LHC-9.

L'évaluation de la toxicité d'une substance s'effectue généralement par des traitements de courte durée et à des concentrations croissantes afin d'observer une réponse dépendante de la dose. Nous pouvons retrouver des protocoles de traitement utilisant des concentrations de 10 µg/mL (Haniu *et al.*, 2011), 30 µg/mL (Tsukahara and Haniu, 2011) ou 5,5-44 µg/mL (Polimeni *et al.*, 2016) pendant des temps allant de 48h à 96h (Haniu *et al.*, 2011, Tsukahara and Haniu, 2011, Polimeni *et al.*, 2016). Des études ont également été menées avec des concentrations plus faibles, c'est notamment le cas de Siegrist *et al.* qui ont traité des cellules BEAS-2B avec 0,0024-24 µg/cm<sup>2</sup> de MWCNT pendant 24h (Siegrist *et al.*, 2014a, Siegrist *et*

*al.*, 2019) et Lucas *et al.* qui ont traité ces cellules avec 5 µg/mL pendant 72h (Lucas *et al.*, 2021). Les temps de traitement courts cités précédemment peuvent corrélérer avec l'utilisation de SVF dans le milieu de culture qui a notamment pour conséquence la diminution du temps de doublement des cellules. En effet, les cellules BEAS-2B se divisent environ toutes les 32h lorsqu'elles sont cultivées en absence de SVF et toutes les 8-10h en présence de SVF (Sargent *et al.*, 2009). Cela n'exclut pas le fait que d'autres études aient utilisé des milieux de culture sans sérum pour réaliser des tests courts. Par exemple, ces cellules ont été traitées avec des concentrations comprises entre 2-200 µg/mL (He *et al.*, 2011) ou 25-140 µg/cm<sup>2</sup> (Louro *et al.*, 2016) jusqu'à 48h. Un traitement de courte durée peut être adapté à l'étude de marqueurs de cytotoxicité ou de génotoxicité, alors que certaines modifications cellulaires nécessitent davantage de temps pour se mettre en place. En effet, une transformation pré-néoplasique a été observée dans des cellules après plusieurs semaines de traitement avec des MWCNT. Vales *et al.* ont traité des cellules BEAS-2B avec 1-20 µg/mL de NM-403 pendant 4 semaines avant de mettre en évidence le potentiel transformant de ce MWCNT dans un milieu sans SVF (Vales *et al.*, 2016). Stueckle *et al.* l'ont montré après 10 semaines de traitement de cellules SAEC (Stueckle *et al.*, 2017) et Phuyal *et al.* après 6 mois de traitement de cellules HBEC-3KT (Cellules épithéliales bronchiques humaines, (Phuyal *et al.*, 2017, Stueckle *et al.*, 2017). Pour ces raisons, nous avons choisi de traiter les cellules BEAS-2B de façon répétée pendant plusieurs semaines.

Dans cette étude, nous avons sélectionné un temps de traitement de 6 semaines tout en conservant des concentrations de traitement faibles (0,125-1 µg/cm<sup>2</sup>). L'utilisation de faibles concentrations présente l'avantage d'être peu cytotoxiques permettant ainsi un traitement consécutif de plusieurs semaines. Lors de la mise en place de la cinétique, nous avons constaté que les concentrations supérieures à 1 µg/cm<sup>2</sup> induisaient une cytotoxicité ne permettant pas un traitement de 6 semaines consécutives. La durée de la cinétique présente l'avantage d'obtenir des informations relatives à la toxicité des MWCNT dans un délai court en comparaison aux études de plusieurs mois réalisées dans la littérature et constitue un modèle d'exposition sub-chronique (Phuyal *et al.*, 2017, Stueckle *et al.*, 2017).

Les cellules ont été traitées avec deux MWCNT de propriétés physiques différentes : le Mitsui-7 (long et épais) et le NM-403 (court et fin). Le Mitsui-7 a été classé comme cancérigène possible pour l'Homme par le CIRC (Grosse *et al.*, 2014, IARC, 2017). Kasai *et al.* ont montré que l'exposition de rats par inhalation à 0,02-2 mg/m<sup>3</sup> de Mitsui-7 était responsable du

développement d'une hyperplasie, de fibrose et de carcinomes pulmonaires principalement broncho-alvéolaires (Kasai *et al.*, 2016). Le NM-403, quant à lui, a été indiqué comme étant transformant *in vitro* (Vales *et al.*, 2016). En effet, le traitement répété des cellules BEAS-2B était responsable de la formation de colonies, traduisant la perte d'indépendance d'ancrage des cellules, caractéristique des cellules pré-néoplasiques.

## 1.2. Effets du traitement des cellules BEAS-2B avec les MWCNT

Après 4 semaines de traitement, les deux MWCNT testés, Mitsui-7 et NM-403, étaient responsables de l'augmentation du nombre de mitoses anormales monopolaires et multipolaires. Ces résultats sont en accord avec Siegrist *et al.* qui avaient montré une augmentation de 35 à 40% de mitoses anormales suite au traitement de cellules BEAS-2B pendant 24h avec des MWCNT (Siegrist *et al.*, 2014a). En comparaison à l'induction observée dans notre étude (5-20%), Siegrist *et al.* ont montré une induction beaucoup plus importante qui pourrait s'expliquer par l'utilisation d'un milieu de culture supplémenté avec 10% de SVF, dont les avantages et inconvénients ont été détaillés précédemment. Il a été montré que les mitoses monopolaires ou multipolaires peuvent conduire à des altérations du nombre de chromosomes et favoriser l'instabilité chromosomique (Castedo *et al.*, 2004, Fukasawa, 2005). Ces mitoses anormales peuvent également être responsables de dommages à l'ADN (Maiato and Logarinho, 2014). C'est pourquoi le test des micronoyaux a permis d'évaluer davantage l'effet génotoxique des MWCNT. En accord avec l'augmentation du pourcentage de mitoses anormales, les cellules traitées avec les MWCNT ont montré une augmentation significative des cellules présentant un micronoyau. Nos résultats corrélaient avec ceux observés dans la littérature (Tavares *et al.*, 2014, Visalli *et al.*, 2015, Vales *et al.*, 2016). Cependant, les résultats des études de génotoxicité restent à ce jour très contradictoires selon le modèle, la durée et les concentrations de traitement utilisés (Moller *et al.*, 2021). Dans notre étude, l'induction de mitoses anormales et de micronoyaux était indépendante de la concentration et du temps de traitement pour les deux MWCNT, suggérant que la taille des MWCNT n'a pas d'influence sur cet effet *in vitro*. Il a été montré que le Mitsui-7 pouvait interagir avec les filaments d'actine et de tubuline, entraînant un blocage de la cytodivision et pouvait également interagir avec les cellules par internalisation ou par interactions avec la périphérie cellulaire (Snyder-Talkington *et al.*, 2013a, Siegrist *et al.*, 2014a). De plus, nous avons observé des MWCNT à proximité des cellules en division. Nous suggérons, par conséquent, que les effets génotoxiques pourraient

être la conséquence de l'interaction des MWCNT avec la cellule et plus particulièrement avec le cytosquelette.

La génotoxicité induite par les MWCNT peut conduire à une toxicité cellulaire. En étudiant la prolifération et la toxicité cellulaire pendant les 6 semaines de traitement, nous avons mis en évidence que les cellules traitées avec le Mitsui-7 ont subi un choc cytotoxique pendant la 1<sup>ère</sup> semaine puis lors de la 5<sup>ème</sup> semaine de traitement, alors que les cellules traitées avec le NM-403 n'ont subi un choc cytotoxique qu'à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine, indiquant un retard d'effet entre les deux MWCNT. Avec ces observations ainsi que les effets antiprolifératifs observés, nous suggérons que les MWCNT seraient responsables de la sélection d'une population cellulaire au cours du traitement. Les cellules qui ont survécu au traitement se seraient adaptées et auraient acquis des propriétés nouvelles. Cette hypothèse est appuyée par l'observation du retour à une prolifération normale et l'absence de cytotoxicité après chaque choc cytotoxique. De plus, l'émergence d'une population de petites cellules traduit la perte progressive de la morphologie épithéliale (grandes cellules cuboïdes dont la croissance s'effectue en monocouche) au profit d'une morphologie dite « en forme d'aiguille » (petites cellules allongées dont la croissance est désorganisée). La modification de la morphologie cellulaire observée lors des traitements reflète la capacité des cellules à s'adapter à un environnement stressant. De manière intéressante, de telles modifications ont également été observées auparavant. En effet, une morphologie « en forme de fuseau » évoluant vers une morphologie fibroblastique suite au traitement des cellules BEAS-2B avec des MWCNT a été constatée dans d'autres travaux (Polimeni *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2021). Dans notre étude, le traitement avec les MWCNT a également diminué l'expression des marqueurs épithéliaux E-cadhérine et Claudine-1, ce qui est une des caractéristiques de l'EMT (Thiery *et al.*, 2009, Sciacovelli and Frezza, 2017). L'expression des marqueurs mésenchymateux N-cadhérine, Vimentine et Fibronectine a été augmentée suite aux traitements, ce qui soutient la mise en œuvre de ce processus (Thiery *et al.*, 2009, Sciacovelli and Frezza, 2017). En accord avec nos résultats, Chen *et al.* et Polimeni *et al.* ont montré une perte de marqueurs cellulaires épithéliaux en faveur d'un gain de marqueurs mésenchymateux dans cette même lignée cellulaire (Polimeni *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2019). L'étude des DEG par le traitement avec les MWCNT a été réalisée de façon ciblée par RT-qPCR et globale par analyse transcriptomique. D'une part, les modifications de l'expression des gènes impliqués dans l'EMT identifiés par RT-qPCR étaient du même ordre que celles identifiées dans l'analyse transcriptomique. D'autre part, l'identification des DEG ainsi que l'analyse des voies de signalisation dans lesquelles ces gènes

étaient impliqués a mis en avant des voies relatives à l'EMT et au développement de pathologies tels que la fibrose, le cancer ou le développement de métastases. En utilisant un modèle analogue au notre, les cellules FE1 (cellules épithéliales de poumons de souris), Poulsen *et al.* avaient identifié des voies de signalisation impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire, le cancer, et la fibrose après le traitement avec 12,5 à 100  $\mu\text{g/mL}$  de Mitsui-7 pendant 24h (Poulsen *et al.*, 2013). Lors des traitements des cellules BEAS-2B, nous avons constaté que cette transition a eu lieu plus tôt et avec une amplitude plus élevée dans les cellules traitées avec le Mitsui-7 que dans les cellules traitées avec le NM-403. Par ailleurs, le Mitsui-7 a modifié l'expression de plus de gènes impliqués dans l'EMT que le NM-403, aux deux temps de traitement (S4 et S6). Par exemple, le Mitsui-7 a dérégulé 12 gènes impliqués dans la voie de signalisation « Transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer » alors que le NM-403 n'en a induit que 4 après 6 semaines de traitement. Il a été montré que les longs MWCNT entraînaient la perte de la E-cadhérine et l'augmentation de l'expression de la Fibronectine, induisant ainsi l'EMT (Wang *et al.*, 2015). Chen *et al.* ont montré que le traitement pendant 72h avec 1 à 16  $\mu\text{g/cm}^2$  de long MWCNT était responsable d'une baisse de l'expression de la protéine E-cadhérine, contrairement aux MWCNT courts qui n'avaient pas d'effet (Chen *et al.*, 2014). Avec ces éléments, il est possible de suggérer que la longueur du MWCNT pourrait influencer la mise en place d'une EMT. Les traitements avec les MWCNT ont modifié l'expression de 49 gènes communs aux temps et aux traitements, parmi lesquels les gènes impliqués dans l'EMT faisaient partie. Bien qu'il ait été observé plus tardivement pour le NM-403 que le Mitsui-7 et de façon moins prononcée, la mise en place de l'EMT constitue un processus commun induit par les MWCNT. En accord avec cette observation, Polimeni *et al.* avaient montré que le traitement des cellules BEAS-2B avec 5,5-44  $\mu\text{g/mL}$  de MWCNT courts et épais pendant 96h était responsable de l'activation de la voie de signalisation AKT/GSK3 $\beta$  et de l'induction de la transcription du facteur SNAIL-1, tous deux impliqués dans l'EMT (Polimeni *et al.*, 2016). Il est donc évident que les MWCNT courts peuvent également induire l'EMT et que la longueur peut avoir un impact sur l'amplitude de la réponse et le délai de mise en place de l'EMT.

Les résultats obtenus avec le Mitsui-7 et le NM-403 suggèrent que les MWCNT longs et épais auraient des effets plus toxiques que les MWCNT courts et fins. Afin de conforter ces différences, nous avons traité les cellules avec deux MWCNT supplémentaires : le NM-401 qui s'apparente au Mitsui-7 et le NM-402 qui s'apparente au NM-403. Le NM-401 a induit l'émergence d'une population cellulaire exprimant moins de marqueur épithélial E-cadhérine

plus rapidement et de façon plus prononcée que le NM-402. Ces similitudes soulignent l'influence de la longueur et du diamètre sur la capacité des MWCNT à induire l'EMT dans les cellules BEAS-2B et appuient ceux obtenus avec le Mitsui-7 et le NM-403. Dans la littérature, les MWCNT longs et épais tels que le Mitsui-7 ou le NM-401 ont été jugés plus cytotoxiques que les MWCNT courts et fins (Fraser *et al.*, 2020). Hiraku *et al.* et Rezazadeh *et al.*, en utilisant des cellules A549, ont également souligné que les MWCNT les plus longs sont les plus toxiques (Hiraku *et al.*, 2016, Rezazadeh Azari *et al.*, 2019). Di Ianni *et al.* ont comparé le potentiel toxique de 7 MWCNT différents dans la lignée A549 et ont indiqué que le NM-401 et le Mitsui-7 induisent les effets pro-inflammatoire les plus forts (Di Ianni *et al.*, 2021). De plus, Allegri *et al.* ont traité des cellules A549 pendant 24 à 72h et ont souligné que le diamètre peut également influencer la toxicité des MWCNT (Allegri *et al.*, 2016). L'ensemble de ces éléments indique que la longueur et le diamètre influencent le potentiel toxique des MWCNT, notamment l'induction de l'EMT. Cependant, d'autres différences structurelles, y compris la surface spécifique ou la présence d'impuretés catalytiques sont à considérer (Lindberg *et al.*, 2009, JRC, 2014). Les impuretés catalytiques (tels que le fer, le magnésium ou l'aluminium) présentes dans les MWCNT sont principalement des cofacteurs métalliques. En culture cellulaire ou dans un organisme, ces impuretés catalytiques peuvent être relarguées des NTC et potentialiser leur effet toxique (Meng *et al.*, 2013, Vitkina *et al.*, 2016). En comparant les proportions d'impuretés catalytiques dans le Mitsui-7, le NM-401, le NM-402 et le NM-403 nous avons constaté que le Mitsui-7 et le NM-401 partageaient des impuretés catalytiques similaires comprenant du phosphore (P), du fer (Fe), du calcium (Ca) et du magnésium (Mg) tout comme le NM-402 et le NM-403 partageaient la présence d'aluminium (Al) et de magnésium (Mg). L'absence et/ou la plus faible quantité de Fe et d'autres impuretés catalytiques pourrait participer à la différence des effets toxiques observés entre le Mitsui-7 et le NM-403. En effet, il a été montré que la présence de métaux de transition tel que le Fe est liée au potentiel inflammatoire du MWCNT (Lee *et al.*, 2020). Or, le Mitsui-7, qui contient du Fe, a montré des effets plus rapides et plus prononcés que le NM-403, qui en contient beaucoup moins (Vitkina *et al.*, 2016, Lee *et al.*, 2020). Nous pouvons suggérer que la présence de Fe dans le MWCNT, ou relargué par le MWCNT dans le milieu, peut participer à l'induction d'effets plus cytotoxiques et d'une EMT plus précoce.

La réversibilité des effets induits par une substance peut être évaluée par une période de récupération après traitement. Il a été souligné que l'induction d'une EMT est susceptible d'être transitoire suite à un stress (Li *et al.*, 2020, Ricci *et al.*, 2021). Cependant, Li *et al.* ont montré

que bien qu'une restauration du phénotype épithélial ait eu lieu après le traitement de cellules NSLCC avec de l'IL-1 $\beta$ , ces cellules présentaient une « EMT-mémoire », c'est-à-dire une susceptibilité à induire une EMT plus rapidement lors d'un traitement supplémentaire (Li *et al.*, 2020). Dans ce cas, la récupération n'est que partielle. À notre connaissance, aucune étude de récupération n'a été réalisée sur les cellules BEAS-2B suite à un traitement avec des MWCNT. C'est pourquoi nous avons cultivé les cellules pendant 4 semaines supplémentaires après traitement. Nos résultats ont montré que pendant la période de récupération, les cellules ont retrouvé progressivement leur morphologie épithéliale et suivaient probablement une transition du statut de cellule mésenchymateuse à cellule épithéliale. Après 4 semaines de récupération, le retour à un phénotype épithélial normal a été total pour les cellules traitées avec le NM-403 et partiel pour les cellules traitées avec le Mitsui-7. En effet, les petites cellules restantes montraient toujours une diminution de la protéine E-cadhérine et la présence de Vimentine dans les cellules traitées avec le Mitsui-7.

## 2. Étude de la toxicité pulmonaire des MWCNT chez le rat

### 2.1. Le choix du modèle d'exposition *in vivo* et des conditions d'exposition

Les protocoles de cancérogenèse ont été décrits de façon réglementaire par l'OCDE et l'Institut national de la santé publique et de l'environnement des Pays-Bas (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*, RIVM). Ainsi, l'OCDE a adopté le 27 juin 2018 la ligne directrice n°451 pour les essais de produits chimiques « Études de cancérogenèse » (OCDE, 2018). Cette ligne directrice indique qu'il convient d'utiliser la voie d'administration se rapprochant au plus près des conditions réelles d'exposition de l'Homme afin d'évaluer de potentiels effets cancérogènes. Un test de cancérogenèse qui fait intervenir des rats de génotype sauvage dure en moyenne plus de deux ans. Il s'agit d'un test long et coûteux, nécessitant l'utilisation d'un grand nombre d'animaux : 50 animaux/groupe et par sexe, un groupe témoin et trois groupes traités avec des doses croissantes. La ligne directrice préconise l'utilisation de l'espèce rat, bien que l'utilisation d'autres espèces soit possible. En effet, les rats ont une durée de vie relativement courte et ils sont fréquemment employés en cancérologie car il s'agit d'une espèce sensible à l'induction des tumeurs. Aujourd'hui, pour des raisons éthiques, l'utilisation de modèles animaux alternatifs dans le cadre de la recherche scientifique est privilégiée. La connaissance du rôle clé de la protéine p53 dans le processus de cancérogenèse a permis l'émergence de modèles d'études *in vivo* plus sensibles au développement tumoral. Des

rongeurs génétiquement modifiés pour le gène *Tp53* constituent une alternative intéressante. Le RIVM a publié en 2004 un rapport portant sur l'utilisation d'animaux transgéniques comme alternative aux tests de cancérogénicité originaux. Ce rapport fait notamment référence aux souris transgéniques p53 mises en avant par Jacobson-Kram *et al.* en 2004 (Jacobson-Kram *et al.*, 2004). De par leur sensibilité, la durée de suivi des animaux transgéniques est réduite de 2 ans, comme préconisé par l'OCDE n°451, à 6 mois. L'utilisation d'animaux transgéniques réduit également le nombre total d'animaux utilisés. En effet, le RIVM préconise 15 animaux par sexe et par traitement incluant deux groupes (un groupe traité et un groupe non traité) d'animaux sauvages et deux groupes d'animaux transgéniques. L'utilisation d'un modèle de rat transgénique permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études de toxicologie et de répondre à la règle éthique des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner » (Russell and Burch, 1959, RIVM, 2012). Le modèle de souris hétérozygotes pour le gène *Tp53* a déjà été utilisé pour l'étude du potentiel cancérogène des MWCNT. En effet, le groupe Takagi *et al.* ont exposé des souris p53<sup>+/-</sup> au Mitsui-7 par injection intrapéritonéale et ont constaté la mise en place d'une réponse inflammatoire, le développement de mésothéliomes et d'hyperplasie après 1 an de suivi des animaux (Takagi *et al.*, 2008, Takagi *et al.*, 2012). Plus récemment, Duke *et al.* ont exposé des souris p53<sup>+/-</sup> à des MWCNT par aspiration pharyngée et n'ont pas constaté de tumeur après 11 mois de suivi. Cependant les souris ont développé des granulomes accompagnés d'une hyperplasie (Duke *et al.*, 2018). À l'heure actuelle, aucune étude portant sur le potentiel cancérogène des MWCNT n'a été menée dans un modèle de rat transgénique. McCoy *et al.* ont créé en 2013 un modèle de rat hétérozygote pour le gène *Tp53* par l'utilisation d'une nucléase à doigt de zinc (McCoy *et al.*, 2013). Cette méthode a permis la délétion de 11 paires de bases dans l'exon 3 du gène *Tp53* aboutissant au décalage du cadre de lecture et à l'apparition d'un codon STOP prématuré dans la séquence de son gène. La protéine p53 n'est alors plus produite car son ARNm est dégradé. Des analyses portées sur ces animaux ont démontré qu'ils ont une durée de vie sans pathologie de 252 jours. De plus, les tumeurs spontanées qu'ils développent touchent principalement le système nerveux central, les os et les organes épithéliaux. Aucun cancer pulmonaire n'a été constaté. Le modèle de rat hétérozygote pour le gène *Tp53* mis au point par McCoy *et al.* a été suggéré comme modèle potentiel pour le criblage de molécules pharmacologiques et pour la réalisation d'essais toxicologiques (McCoy *et al.*, 2013). Nous avons évalué la pertinence de l'utilisation de ce modèle pour l'étude du potentiel cancérogène et de la toxicité pulmonaire des MWCNT.

L'INRS a conduit des études *in vivo* portant sur l'effet toxique de nanoparticules suite à leur inhalation (Gate *et al.*, 2012, Gate *et al.*, 2017, Chezeau *et al.*, 2018, Cosnier *et al.*, 2021). Les expositions par inhalation font intervenir un grand nombre d'animaux et des besoins humains conséquents. S'agissant d'une étude pilote, la voie d'exposition par instillation intra-trachéale a été privilégiée car elle nécessite moins d'installation technique et moins de besoin humain pour sa mise en place mais aussi car elle permet de déposer les MWCNT directement dans les poumons. Les rats de génotype sauvage (WT) ou hétérozygotes pour  $p53^{+/-}$  (OGM) ont été exposés au Mitsui-7 et au NM-403 par instillation intra-trachéale (IT) à l'âge de 12 semaines selon le schéma suivant : 1 IT/semaine pendant 4 semaines à raison de  $250 \mu\text{g}/\text{IT}/\text{rat}$  (dose totale administrée :  $1 \text{ mg}/\text{rat}$ ). Un groupe contrôle a été exposé par IT avec le milieu de dispersion des MWCNT, le Pluronic. Un premier groupe d'animaux a été mis à mort 3 jours post-exposition (J3), un second groupe 8 mois post-exposition (M8), ceci ayant permis d'évaluer la toxicité des MWCNT, respectivement, à court et à long terme.

L'inhalation est la voie principale d'entrée des MWCNT dans l'organisme, c'est pourquoi des méthodes d'estimation de dose déposée ont été développées pour les voies respiratoires. Le modèle MPPD (*Multiple-Path Dosimetry Model*) permet ainsi d'estimer la rétention alvéolaire en NTC des employés à leur contact (Anjilvel and Asgharian, 1995, Asgharian, 2001). Afin de rapporter la dose administrée aux animaux à une valeur d'exposition des salariés aux MWCNT, le modèle MPPD et la méthode décrite par Oberdörster *et al.* ont été utilisés (Gangwal *et al.*, 2011, Oberdorster *et al.*, 2015). Cette méthode a permis de déterminer que la dose d'exposition de  $1 \text{ mg}$  de NM-403 correspond à une exposition de  $131 \mu\text{g}/\text{m}^3$  et  $1 \text{ mg}$  de Mitsui-7 correspond à une exposition de  $26 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , soit 5 fois plus de NM-403 que de Mitsui-7. Aux États-Unis, le NIOSH a proposé en 2013 une VLEP pondérée sur 10h par jour et 40h par semaine de  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour les MWCNT (NIOSH, 2013). La valeur d'exposition calculée est donc largement supérieure à celle indiquée par le NIOSH. Cependant, la plupart des mesures effectuées sur les lieux de production indiquent des valeurs supérieures à  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Dans une installation commerciale de nanotechnologie produisant des NTC par arc électrique, Yeganeh *et al.* ont signalé des concentrations de particules de  $50$  à  $125 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Yeganeh *et al.*, 2008). Dans une étude sur le terrain de douze installations permettant la manipulation des nanomatériaux carbonés, Methner *et al.* ont signalé que la masse inhalable de concentration de carbone total dans les échantillons variait entre  $64$  et  $1094 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , tandis que celle des échantillons d'air spécifiques à la source variait entre  $12$  et  $1839 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Methner *et al.*, 2010). La concentration en NTC la plus élevée a été mesurée dans des échantillons prélevés lors du séchage et du

prélèvement manuel de NTC (1839 et 1729  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , respectivement). Les doses d'exposition des animaux rapportées à l'Homme sont largement supérieures à la VLEP indiquée par le NIOSH. Toutefois, des concentrations élevées de MWCNT ont été constatées lors de mesures effectuées en entreprise. En ayant conscience qu'il ne s'agisse pas de l'exposition la plus majoritaire, les doses sélectionnées n'en demeurent pas moins réalistes des potentielles expositions des salariés au contact des MWCNT lors d'étapes clés de leur production (Guseva Canu *et al.*, 2016).

## 2.2. Effets de l'exposition des rats WT et OGM aux MWCNT

L'effet génotoxique des MWCNT peut être évalué à travers différentes approches : le test des comètes, le marquage  $\gamma\text{H2AX}$ , la quantification de la 8-oxoguanine ou encore le test des micronoyaux. Les MWCNT sont susceptibles d'être présents dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons, ce qui suggère qu'ils pourraient entrer dans la circulation lymphatique et être distribués dans la circulation systémique (Porter *et al.*, 2010, Kato *et al.*, 2013). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de réaliser le test des micronoyaux à partir des cellules sanguines. Ce test a été effectué chez les rats WT et OGM exposés au Mitsui-7 ou au NM-403 aux temps J3 et M8. Cette analyse n'a pas mis en évidence de potentiel génotoxique des MWCNT, indépendamment du temps de suivi ou du type de MWCNT en comparaison au contrôle. Nos résultats appuient ceux de Ema *et al.* qui n'ont pas observé de cellules présentant un micronoyau chez la souris exposée par gavage au Mitsui-7 (Ema *et al.*, 2012). De même, Kim *et al.* n'ont pas observé de micronoyaux dans les érythrocytes de souris exposées aux MWCNT par administration intrapéritonéale (Kim *et al.*, 2010). Avec ces observations, ainsi que les résultats des analyses biochimiques du sang, nous suggérons que la toxicité des MWCNT n'est pas systémique.

L'exposition des rats WT et OGM au Mitsui-7 ou au NM-403 a induit une augmentation de l'activité de l'enzyme LDH et du nombre de neutrophiles polynucléaires dans le LBA à J3. Ces événements sont caractéristiques de la mise en place d'une réponse inflammatoire. L'augmentation significative du poids du poumon à J3 a permis d'émettre l'hypothèse de la formation d'un œdème pulmonaire lié à cette inflammation. Asio *et al.* ont exposé des rats au Mitsui-7 par IT et ont constaté la mise en place d'une réponse inflammatoire évaluée par l'activité enzymatique de la LDH et la cytologie du LBA. Une réponse inflammatoire aiguë a également été mise en évidence 24h après exposition par IT de rats ou aspiration pharyngée de souris au Mitsui-7 (Thompson *et al.*, 2016, Mandler *et al.*, 2017, Dong and Ma, 2018). La

présence de granulomes, structures caractéristiques d'une défense immunitaire, a été observée chez les rats OGM exposés au Mitsui-7 à J3. Cette observation est en accord avec de nombreuses études qui ont mis en évidence le potentiel inflammatoire et l'apparition de granulomes après une exposition à des MWCNT à court ou à long terme (Annexe 1, Annexe 2). En effet, des granulomes ont été identifiés à J3 et J7 chez des rats exposés aux MWCNT, respectivement, par IT ou intra-péritonéale (Morimoto *et al.*, 2012, Francis *et al.*, 2015). Lim *et al.* ont également montré une réponse inflammatoire aiguë 1 jour post-exposition de souris au Mitsui-7 par aspiration pharyngée et la présence de granulomes 28 jours post-exposition (Lim *et al.*, 2020). Par ailleurs, nous avons observé du Mitsui-7 sous forme libre à J3 dans les coupes histologiques de tous les animaux exposés. Cette observation coïncide avec celle de Mercer *et al.* qui avaient constaté une distribution des MWCNT dans les bronchioles et alvéoles pulmonaires (Mercer *et al.*, 2013b). À M8, l'activité de la LDH était à un niveau similaire au contrôle, et la cytologie du LBA n'avait pas révélé d'augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles. L'inflammation précédemment observée semblait être résorbée. De façon intéressante, le Mitsui-7 n'était plus présent sous forme libre, ce qui peut expliquer l'absence d'inflammation à ce temps. Cependant, des granulomes accompagnés d'un dépôt de collagène étaient présents. Nos observations sont en accord avec les observations de Van Berlo *et al.* et Morimoto *et al.* qui ont mis en évidence une hyperplasie pulmonaire accompagnée de granulomes, respectivement, à 2 mois chez la souris et à 6 mois chez le rat post-exposition aux MWCNT (Morimoto *et al.*, 2012, van Berlo *et al.*, 2014). À plus long terme, le développement de granulomes, d'hyperplasie bronchique et le dépôt de collagène ont été constatés entre 11 mois et 2 ans après exposition au Mitsui-7 (Thompson *et al.*, 2018, Abdelgied *et al.*, 2019). Contrairement aux études de Sargent *et al.* et Kasai *et al.* qui avaient montré le développement de carcinomes pulmonaires après 1,5 et 2 ans d'exposition de rats WT, et celles de Nagai *et al.* et Takagi *et al.* qui avaient montré ce résultat après 1 an de suivi de souris p53<sup>+/-</sup> exposées au Mitsui-7, aucun carcinome n'a été identifié dans notre étude (Nagai *et al.*, 2011, Takagi *et al.*, 2012, Sargent *et al.*, 2014, Kasai *et al.*, 2016). Ces résultats sont en désaccord avec Rittinghausen *et al.* qui avaient mis en évidence le potentiel cancérigène et fibrotique du Mitsui-7 (Rittinghausen *et al.*, 2014). Cependant, Knudsen *et al.* ont également mis en évidence la persistance de granulomes et l'absence de fibrose et de cancer dans les poumons de souris 1 an après exposition au Mitsui-7 (Knudsen *et al.*, 2019). De plus, nos résultats coïncident avec les travaux de Duke *et al.* qui ont exposé des souris p53<sup>+/-</sup> par aspiration pharyngée au Mitsui-7 et n'ont pas observé de tumeur après 11 mois de suivi mais la persistance de granulomes accompagnés d'une hyperplasie (Duke *et al.*, 2018). Bien qu'aucune fibrose n'ait été clairement

identifiée, le dépôt de collagène constitue un évènement clé du développement de fibrose pulmonaire. En effet, l'augmentation globale et le dépôt anarchique du collagène désorganise les structures d'échanges gazeux et la mécanique pulmonaire.

Concernant les animaux exposés au NM-403, une inflammation pulmonaire a été observée à J3 tout comme chez les rats exposés Mitsui-7. Cependant, aucun MWCNT sous forme libre n'a été observé et seulement 3/5 animaux présentaient des granulomes. L'inflammation induite par le NM-403 semble être moins importante que celle induite par le Mitsui-7. De manière surprenante, la cytologie du LBA présentant un nombre encore élevé de neutrophiles polynucléaires et l'augmentation de l'activité enzymatique de la LDH ont indiqué que cette inflammation était persistante à M8. L'injection intra-pleurale de NM-403 chez la souris n'a pas induit d'inflammation à 1 et 90 jours post-exposition (Wils *et al.*, 2021). Cependant, l'exposition de rats par inhalation ou IT de NM-403 a été responsable de l'induction d'une inflammation persistante jusqu'à 180 jours post-exposition (Gate *et al.*, 2019). En effet, l'inhalation de NM-403 chez le rat a montré une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le LBA ainsi que l'augmentation de l'activité de la LDH aux temps J3 et J180 post-exposition (Gate *et al.*, 2019). À M8, des granulomes, un dépôt de collagène mais surtout une métaplasie broncho-alvéolaire étaient présents chez la quasi-totalité des animaux WT et OGM exposés au NM-403. La présence de NM-403 sous forme libre à M8 suggère qu'ils aient pu être relâchés des granulomes précédemment formés favorisant ainsi une réponse inflammatoire chronique. Ce microenvironnement, propice au développement de pathologies, corrobore avec l'apparition d'épaississement de la paroi alvéolaire, le dépôt de collagène, et la mise en place d'une métaplasie pulmonaire. Knudsen *et al.* ont montré que l'IT de NM-403 chez des souris était responsable de l'infiltration de macrophages et du développement de granulomes 1 an après exposition (Knudsen *et al.*, 2019). Les différences observées entre ces études et nos résultats pourraient être dues aux doses et à la durée d'exposition sélectionnées ainsi qu'aux différents temps de suivi des animaux post-exposition.

Avec ces observations, bien que le Mitsui-7 ait induit une forte toxicité à court terme, il semble que le NM-403 soit le plus toxique à long terme. Ce résultat pourrait s'expliquer par la différence de surface spécifique entre les deux MWCNT, celle du NM-403 est 5 fois supérieure à celle du Mitsui-7. Il a été montré que la surface spécifique était un bon prédicteur de l'inflammation pulmonaire induite par les MWCNT, quelle que soit leur longueur ou leur diamètre (Poulsen *et al.*, 2016, Cosnier *et al.*, 2021). Dans notre protocole, les MWCNT ont été

instillés à masse égale, ainsi la surface spécifique déposée était plus importante pour le NM-403 que pour le Mitsui-7. Il a été montré que la réponse inflammatoire, notamment le pourcentage de polynucléaires neutrophiles, est proportionnelle à la surface déposée dans le poumon (Gate *et al.*, 2019, Cosnier *et al.*, 2021). Il n'est donc pas incohérent d'observer une réponse inflammatoire plus prononcée avec le NM-403 qu'avec le Mitsui-7. L'analyse macroscopique des poumons laisse supposer qu'il y aurait plus de NM-403 que de Mitsui-7 retenu à M8. Cependant, ces hypothèses pourraient être confirmées en mesurant la quantité réelle de MWCNT retenus dans les poumons aux temps J3 et M8.

L'élimination des MWCNT peut être différente selon le MWCNT et ses propriétés physico-chimiques. Dans la littérature, les MWCNT courts et fins ont été observés sous forme d'agglomérats dans le tissu pulmonaire 1 an après exposition de souris, alors que des MWCNT plus épais et plus longs ont été détectés sous forme de fibres simples, suggérant une biopersistence des deux types de MWCNT (Knudsen *et al.*, 2019). Par ailleurs, des études d'inhalation sub-chroniques chez des rats exposés à différents MWCNT courts (1-10  $\mu\text{m}$ ) et fins (10 nm) ont souligné une inflammation pulmonaire qui a persisté jusqu'à 26 semaines après exposition et une fibrose pulmonaire a été identifiée dans toutes les études (Ma-Hock *et al.*, 2009, Pauluhn, 2010, Pothmann *et al.*, 2015). Nos observations, ainsi que les éléments décrits dans la littérature suggèrent que le temps de suivi post-exposition que nous avons choisi (8 mois), bien qu'il était 2 mois plus long que recommandé par le RIVM (6 mois), n'était peut-être pas suffisamment long pour permettre le développement d'une pathologie chez les rats OGM. Le modèle de rats OGM ne semble donc pas adapté à l'étude du potentiel cancérigène des MWCNT, sa susceptibilité attendue n'a pas été vérifiée après 8 mois post-exposition aux MWCNT. Cependant, le dépôt de collagène et la mise en place d'une métaplasie broncho-alvéolaire mettent en évidence des signes précoces du développement de fibrose pulmonaire susceptible d'apparaître à plus long terme.

### 3. Relations entre l'EMT induite *in vitro* et la toxicité pulmonaire induite *in vivo* par les MWCNT

Les MWCNT inhalés se déposent principalement dans les poumons, mais peuvent être transportés vers la plèvre, les muscles respiratoires, le foie, les reins, le cœur et le cerveau (Mercer *et al.*, 2010). Cependant, nous n'avons pas constaté de toxicité systémique dans les analyses sanguines réalisées chez les animaux WT et OGM exposés aux MWCNT. Une toxicité

cellulaire a uniquement été mise en évidence dans les analyses du LBA et nous avons observé un effet génotoxique sur les cellules en culture. Ces résultats sont en accord avec ceux de Catalan *et al.* qui ont montré des effets génotoxiques dans le LBA des animaux exposés au MWCNT et non pas dans les cellules sanguines (Catalan *et al.*, 2016). Nous suggérons ainsi que l'effet génotoxique était uniquement localisé au niveau pulmonaire.

*In vivo*, la toxicité pulmonaire observée à long terme peut être expliquée par la biopersistance des MWCNT. Il a été montré que ces derniers sont capables de s'accumuler dans les ganglions lymphatiques plus d'un an après l'exposition des animaux (Mercer *et al.*, 2010). Dans notre étude, une inflammation chronique suite à l'exposition des animaux exposés au NM-403 peut être favorisée par la présence de MWCNT sous forme libre dans les poumons et ainsi permettre le développement d'une métaplasie broncho-alvéolaire. Par ailleurs, la biopersistance des MWCNT peut être conditionnée par l'efficacité de leur élimination par les macrophages. En effet, de nombreuses études ont été effectuées dans des lignées de macrophages car ces derniers participent à l'élimination des MWCNT dans l'organisme. La taille est un élément pouvant favoriser ou non le processus de phagocytose. Ainsi, Westphal *et al.* ont montré que le NM-401 avait des effets plus prononcés que le NM-403 sur la migration cellulaire et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Westphal *et al.*, 2019). Di Cristo *et al.* ont également suggéré que la forme et la longueur des MWCNT influenceraient leur toxicité en comparant les effets du NM-400, NM-401 et NM-402 (Di Cristo *et al.*, 2019). Les différences de réponses observées *in vivo* entre les animaux exposés au Mitsui-7 et au NM-403 suggèrent que ces MWCNT ne seraient pas éliminés avec la même efficacité notamment par les macrophages. De façon surprenante, à M8, c'est le NM-403 qui induit le plus d'effets délétères, alors que *in vitro*, c'était le Mitsui-7 qui avait les effets les plus forts et les plus précoces. *In vivo*, les MWCNT se trouvent au contact d'un environnement complexe, composé d'une grande diversité de cellules et de signaux extracellulaires qui influencent la réponse induite par les MWCNT. Le modèle cellulaire *in vitro*, quant à lui, vise à étudier l'impact des MWCNT sur un seul type cellulaire précis, ce qui peut expliquer ces différences.

L'EMT est impliquée dans le développement de pathologies tels que la fibrose pulmonaire. Nous avons montré l'induction de cette transition *in vitro* et l'analyse du transcriptome de ces cellules a permis de mettre en évidence une augmentation conséquente de l'expression des gènes codant les collagènes de type V et VI (*Col5A1* et *Col6A1*). Or, la fibrose pulmonaire résulte d'une accumulation, d'une différenciation et de l'activation de fibroblastes ainsi qu'un

dépôt excessif de composants de la matrice extracellulaire et plus particulièrement de collagène (Deng *et al.*, 2020). En accord avec ces observations, des dépôts de collagène ont été observés à M8 chez les animaux exposés au Mitsui-7 et au NM-403. Bien qu'aucune fibrose n'ait été constatée *in vivo*, ces éléments suggèrent une potentielle mise en place de cette pathologie. Poulsen *et al.* ont comparé les DEG provenant de LBA de poumon d'animaux exposés aux MWCNT et provenant de cellules traitées avec des MWCNT. Ils ont constaté une réaction inflammatoire aiguë dans les poumons de souris et ont identifié des voies de signalisation impliquées dans la fibrose (Poulsen *et al.*, 2015). Dans leurs travaux *in vitro*, une grande variété de fonctions cellulaires étaient touchées dont le cycle cellulaire, la croissance et la prolifération cellulaire, la fibrose et l'inflammation (Poulsen *et al.*, 2015). Cependant, bien qu'ils aient observé des similitudes entre les deux modèles au niveau des voies de signalisation, les gènes spécifiquement modifiés étaient différents *in vitro* et *in vivo*, ce qui suggère que les mécanismes sous-jacents sont différents dans les cellules en culture et dans le tissu pulmonaire. Au regard de la littérature, nous avons toutefois identifié les gènes codant la *mmp1* (-2,6) et l'inhibiteur de métalloprotéase *timp4* (+1,5), protéines impliquées dans le remodelage tissulaire et la fibrose dans les cellules traitées pendant 6 semaines avec du Mitsui-7. Dans ces mêmes cellules, nous avons également identifié certains gènes impliqués dans la voie TGFβ qui ont été liés au développement de fibrose tels que *tgfb3l* (-2,5), *tnfrsf10a* (-1,5) et *smad1* (+1,5). Aussi, en utilisant les listes de gènes liés à la fibrose décrit par Poulsen *et al.* et Snyder-Talkington *et al.* nous avons identifié d'autres gènes impliqués dans le développement de cette pathologie tels que *epha2* (-1,4), *igals* (+1,2), *cxcl5* (-1,5), *c3* (+1,8), *cdl8* (-1,8), *mdk* (-1,7), *il6st* (+1,8), *col6A1* (+4,1) *itga7* (-2), *tgfb3l* (-2,5), *serpine2* (-1,9) et *pde3a* [(+1,7) (Poulsen *et al.*, 2013, Snyder-Talkington *et al.*, 2013b, Poulsen *et al.*, 2015, Snyder-Talkington *et al.*, 2015, Snyder-Talkington *et al.*, 2016a)]. L'ensemble des résultats suggèrent que l'EMT observée *in vitro* pourrait également être observée *in vivo* comme étant un marqueur précoce du développement de fibrose pulmonaire.



# VI. Conclusions et perspectives

À travers cette étude, nous avons identifié, par l'utilisation d'une cinétique de traitement de cellules épithéliales bronchiques humaines, que les MWCNT étaient responsables de l'induction de mitoses anormales et de la formation de micronoyaux, quels que soient leur longueur et leur diamètre. Il a été suggéré que les MWCNT interagiraient avec la tubuline (Dong and Ma, 2015). Nous pourrions suggérer d'étudier l'internalisation des MWCNT dans les cellules et leur localisation dans les compartiments cellulaires. Il existe peu de méthodes d'observation des MWCNT par microscopie. Il n'existe pas de moyen de marquage fluorescent des MWCNT qui ne modifierait pas leurs propriétés de surface. Une approche de marquage fluorescent des membranes cellulaires puis une analyse par microscopie confocale couplée à la technique de FLIM (*Fluorescent LifeTime Imaging*) permettrait de répondre à cette problématique et a été appliquée pour l'observation de MWCNT fonctionnalisés dans la lignée A549 (Rubio *et al.*, 2015). L'intérêt de cette approche est de déterminer la durée de demi-vie de l'état d'excitation des photons qui sont renvoyés par le MWCNT après sa stimulation par une impulsion laser. En effet, la durée de demi-vie de l'état d'excitation des photons renvoyés par une cellule, ou du matériel biologique, est appelé « déclin » et suit une courbe identique et reconnaissable. D'autres matériaux, non biologiques, sont susceptibles de posséder leur propre signature. C'est notamment le cas des MWCNT fonctionnalisés qui ont été observés par FLIM et dont la durée de demi-vie a été déterminée (Rubio *et al.*, 2015). Il serait intéressant de déterminer la durée de demi-vie des photons renvoyés par différents MWCNT pour ensuite les observer au contact des cellules. Cette approche permettrait de répondre à l'hypothèse de l'interaction des MWCNT avec les cellules.

*In vitro*, nous avons également mis en évidence que l'EMT constitue un processus clé du mécanisme d'action toxique des MWCNT. Nous avons constaté des modifications progressives de la morphologie cellulaire et des marqueurs de l'EMT lors des traitements puis la réversibilité partielle de ces marqueurs. Les effets étaient apparus plus tôt et à une concentration de traitement plus faible avec le Mitsui-7 et le NM-401 (longs et épais) qu'avec le NM-403 et le NM-402 (courts et fins). La réversibilité de l'EMT dépendait également de la longueur et/ou du diamètre, puisqu'elle a démarré plus tôt avec le NM-403 qu'avec le Mitsui-7. Ces observations suggèrent un effet plus important des MWCNT longs et épais en comparaison aux MWCNT courts et fins. Nos résultats ont montré que bien que leurs effets aient été moins prononcés, il est important de noter que les MWCNT plus courts et plus fins induisent également l'EMT. Des expériences supplémentaires avec un plus grand panel de NTC de différentes longueurs et diamètres sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ces

paramètres sur l'induction de l'EMT dans les cellules BEAS-2B. Outre les paramètres comme la longueur et le diamètre, la rigidité est également à prendre en considération. En effet, la rigidité est susceptible d'influencer la réactivité des MWCNT au contact de la cellule.

D'autres caractéristiques sont à prendre en considération afin d'évaluer la toxicité des MWCNT. Par exemple, la formation de bio-corona, due à l'adsorption de biomolécules sur la surface des NTC dans un environnement physiologique, peut conduire à une « identité » biologique modifiée, contribuant à la modification de leur biocompatibilité et de leur toxicité (Shannahan *et al.*, 2013, Nicoletti *et al.*, 2018). Il a été montré que les MWCNT s'associent avec un jeu de protéines comprenant l'albumine et des apolipoprotéines. Il serait alors intéressant d'étudier la composition de la corona présente autour des MWCNT utilisés dans cette étude. La présence de contaminants métalliques est également susceptible d'influencer le potentiel toxique des MWCNT. En cause, la réaction de Fenton due à la présence de métaux de transition, dont le Fe, est susceptible d'induire des ROS. Il serait alors pertinent d'évaluer l'induction de ROS suite au traitement des cellules. Par ailleurs, la fonctionnalisation des MWCNT peut également modifier leur toxicité. En effet, la présence de groupements carboxyles ou amines peut influencer la composition de la corona. Il a été montré que les MWCNT-COOH lient plus de protéines que les MWCNT non fonctionnalisés (Shannahan *et al.*, 2013). La fonctionnalisation peut ainsi modifier la bioactivité des MWCNT *in vitro* et *in vivo*. Il a été mis en évidence que la carboxylation rend les MWCNT moins toxiques *in vitro* et *in vivo*. Chez l'animal, les MWCNT carboxylés se sont distribués librement dans le poumon et ont induit moins de dommages cellulaires (Liu *et al.*, 2015, Hamilton *et al.*, 2018b). De plus, il été montré que la fonctionnalisation en fait des matériaux relativement inertes au regard de leur potentiel inflammatoire (Hamilton *et al.*, 2013, Hamilton *et al.*, 2018a, Hamilton *et al.*, 2018b). De façon contradictoire, des études menées *in vivo* ont montré que des MWCNT fonctionnalisés pouvaient amplifier une réponse inflammatoire de par la présence de groupements réactifs à leur surface (Poulsen *et al.*, 2016). Il a également été montré que les MWCNT-COOH, MWCNT-OH et MWCNT-NH<sub>2</sub> sont davantage génotoxiques que les MWCNT non fonctionnalisés dans les lignées cellulaires A549 et BEAS-2B (Ursini *et al.*, 2012, Chatterjee *et al.*, 2014). Les modifications de surface des MWCNT ont un impact sur leur état d'agglomération et leur capacité à interagir avec les membranes lipidiques, augmentant leur potentiel inflammatoire (Ursini *et al.*, 2016). De façon générale, les propriétés de surface des MWCNT peuvent avoir un impact sur leur effet toxique (Stueckle *et al.*, 2017). Le nombre d'études comparatives croît d'année en année car l'identification des propriétés physico-

chimiques responsables de leur toxicité permettrait d'identifier les MWCNT les plus dangereux et de développer des approches « safe-by-design » afin de produire des MWCNT moins toxiques. C'est pourquoi il serait intéressant d'utiliser la cinétique de traitement des cellules BEAS-2B en tant que test de criblage pour identifier les caractéristiques physico-chimiques des MWCNT, dont la fonctionnalisation, qui sont susceptibles d'avoir des effets toxiques plus ou les moins délétères.

Nous avons observé une réversibilité des effets après 4 semaines de récupération, il serait alors pertinent d'étudier le transcriptome des cellules à la fin de cette période. Ainsi, cela permettrait de déterminer si cette réversibilité est complète ou si des gènes restent toujours dérégulés après récupération. En effet, les cellules pourraient avoir acquis une « EMT-mémoire » et être davantage susceptibles à de nouveaux agents stressants. Pour aller plus loin, nous proposons de traiter les cellules une nouvelle fois, après la période de récupération, afin de déterminer si les cellules sont capables d'induire cette transition plus rapidement et/ou plus fortement que lors du premier traitement. Parallèlement, la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'établissement de l'EMT est largement documentée et fait intervenir des mécanismes épigénétiques. Par exemple, des marques épigénétiques d'acétylation et de méthylation des histones sont impliquées dans l'expression de *Cdh1* codant la E-cadhérine (Peinado *et al.*, 2004, Markouli *et al.*, 2021). De plus, le lncRNA H19 joue également un rôle prédominant dans les régulations épigénétiques de la E-cadhérine et nous avons constaté une induction de son expression (+2,8) dans les cellules traitées pendant 6 semaines avec du Mitsui-7 (Gao *et al.*, 2019, Ghafouri-Fard *et al.*, 2020). Par ailleurs, Sierra *et al.* ont identifié 755 ilots CpG touchés par une hypométhylation de l'ADN après exposition des animaux aux MWCNT (Sierra *et al.*, 2017). Récemment, des altérations des profils d'expression globale des ARNm et des ARNnc ont été identifiés dans le sang de salariés exposés aux MWCNT (Shvedova *et al.*, 2016). Ces observations suggèrent qu'une exposition aux MWCNT peut avoir d'importants effets sur l'épigénome à long terme. Afin de comprendre la mise en œuvre de l'EMT après le traitement des cellules avec des MWCNT, nous suggérons de comparer les profils épigénétiques des cellules témoins et des cellules traitées. Étant donné que les marques épigénétiques peuvent être stables au fil des générations, il serait également approprié de les étudier après 4 semaines de récupération.

Dans nos travaux, nous avons également étudié la pertinence de l'utilisation du modèle de rats hétérozygotes  $p53^{+/-}$  pour l'évaluation du potentiel cancérigène des MWCNT. Bien que

l'exposition au Mitsui-7 ou au NM-403 ait induit une inflammation aiguë à court terme et le développement de granulomes, de dépôt de collagène et de métaplasie broncho-alvéolaire à plus long terme, aucune pathologie n'a été mise en évidence. Nous n'avons pas observé de développement de tumeur ni de fibrose chez les rats exposés. De plus, les animaux OGM ont présenté peu de différences avec les animaux WT. Nous avons conclu que le modèle de rats hétérozygotes  $p53^{+/-}$  n'est pas adapté à l'étude du potentiel cancérigène des MWCNT et que le temps de suivi n'était pas suffisamment long pour permettre le développement de pathologies. Cependant, nous avons mis en avant des effets différents entre le Mitsui-7 et le NM-403, notamment des événements favorisant le développement d'une fibrose à plus long terme.

Compte tenu de la croissance exponentielle de l'utilisation des MWCNT en milieu industriel, le nombre de salariés exposés devrait s'accroître au cours des prochaines années. De par la grande diversité des MWCNT produits mondialement, le potentiel toxique d'un MWCNT n'est pas applicable à l'ensemble d'entre eux. Il est donc nécessaire d'améliorer nos connaissances sur les propriétés toxicologiques de ces derniers et de mettre en œuvre des mesures de prévention adaptées à leur manipulation. Aujourd'hui, il est recommandé d'appliquer le niveau d'exposition le plus bas possible à ces nanomatériaux.

Cette étude a permis d'apporter un outil supplémentaire pour l'analyse du potentiel toxique des MWCNT *in vitro*. Les résultats placent l'EMT comme processus biologique au cœur du mécanisme d'action toxique des MWCNT. L'étude de la réversibilité des effets, complète ou partielle, ainsi que les observations *in vivo*, soulèvent des questionnements quant aux effets délétères visibles à plus long terme.



# Bibliographie

- Abdelgied, M., El-Gazzar, A.M., Alexander, D.B., Alexander, W.T., Numano, T., Iigou, M., Naiki-Ito, A., Takase, H., Abdou, K.A., Hirose, A., Taquahashi, Y., Kanno, J., Abdelhamid, M., Tsuda, H. & Takahashi, S., 2019. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. *Arch Toxicol*, 93, 909-920.
- Aghasafari, P., George, U. & Pidaparti, R., 2019. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflamm Res*, 68, 59-74.
- Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. & Fukushima, S., 2010. Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. *Ind Health*, 48, 783-95.
- Aldieri, E., Fenoglio, I., Cesano, F., Gazzano, E., Gulino, G., Scarano, D., Attanasio, A., Mazzucco, G., Ghigo, D. & Fubini, B., 2013. The role of iron impurities in the toxic effects exerted by short multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) in murine alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A*, 76, 1056-71.
- Allegri, M., Perivoliotis, D.K., Bianchi, M.G., Chiu, M., Pagliaro, A., Koklioti, M.A., Trompeta, A.A., Bergamaschi, E., Bussolati, O. & Charitidis, C.A., 2016. Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicol Rep*, 3, 230-243.
- Andujar, P., Lacourt, A., Brochard, P., Paireon, J.C., Jaurand, M.C. & Jean, D., 2016. Five years update on relationships between malignant pleural mesothelioma and exposure to asbestos and other elongated mineral particles. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 19, 151-172.
- Anjilvel, S. & Asgharian, B., 1995. A multiple-path model of fiber deposition in the rat lung. *Toxicol Sci*, 44, 80-6.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Voeltzel, T., Selmi, A., Valsesia-Wittmann, S., Caron De Fromentel, C. & Puisieux, A., 2008. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*, 14, 79-89.
- Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. & Fukushima, S., 2010. Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. *J Occup Health*, 52, 155-66.
- Asgharian, B. & Anjilvel, S., 1998. A multiple-path model of fiber deposition in the rat lung. *Toxicol Sci*, 44, 80-6.
- Asgharian, B., Hofmann, W., Bergmann, R., 2001. Particle deposition in a multiple-path model of the human lung. *Aerosol Sci. Technol*, 34, 332-339.
- Barcellos-Hoff, M.H., Lyden, D. & Wang, T.C., 2013. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 13, 511-8.
- Beltran, M., Puig, I., Pena, C., Garcia, J.M., Alvarez, A.B., Pena, R., Bonilla, F. & De Herreros, A.G., 2008. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev*, 22, 756-69.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. & Kroemer, G., 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825-37.
- Catalan, J., Siivola, K.M., Nymark, P., Lindberg, H., Suhonen, S., Jarventaus, H., Koivisto, A.J., Moreno, C., Vanhala, E., Wolff, H., Kling, K.I., Jensen, K.A., Savolainen, K. &

- Norppa, H., 2016. In vitro and in vivo genotoxic effects of straight versus tangled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, 10, 794-806.
- Chatterjee, N., Yang, J., Kim, H.M., Jo, E., Kim, P.J., Choi, K. & Choi, J., 2014. Potential toxicity of differential functionalized multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) in human cell line (BEAS2B) and *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health A*, 77, 1399-408.
- Chen, P., Tian, K., Tu, W., Zhang, Q., Han, L. & Zhou, X., 2019. Sirtuin 6 inhibits MWCNTs-induced epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells via inactivating TGF-beta1/Smad2 signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 374, 1-10.
- Chen, T., Nie, H., Gao, X., Yang, J., Pu, J., Chen, Z., Cui, X., Wang, Y., Wang, H. & Jia, G., 2014. Epithelial-mesenchymal transition involved in pulmonary fibrosis induced by multi-walled carbon nanotubes via TGF-beta/Smad signaling pathway. *Toxicol Lett*, 226, 150-62.
- Chezeau, L., Sebillaud, S., Safar, R., Seidel, C., Dembele, D., Lorcin, M., Langlais, C., Grossmann, S., Nunge, H., Michaux, S., Dubois-Pot-Schneider, H., Rihn, B., Joubert, O., Binet, S., Cosnier, F. & Gate, L., 2018. Short- and long-term gene expression profiles induced by inhaled TiO<sub>2</sub> nanostructured aerosol in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol*, 356, 54-64.
- Chopra, S., Ramanadham, V., Vullengala, S.P., Tiwari, S., Lad, K., Deshmukh, K.A. & Peshwe, D.R., 2019. Outcome of using olive oils for MWCNT functionalization and the influence of -OH modified MWCNTs on PA and PBT nano-composites. *Materials Today: Proceedings*, 2214-7853.
- Chortarea, S., Barosova, H., Clift, M.J.D., Wick, P., Petri-Fink, A. & Rothen-Rutishauser, B., 2017. Human Asthmatic Bronchial Cells Are More Susceptible to Subchronic Repeated Exposures of Aerosolized Carbon Nanotubes At Occupationally Relevant Doses Than Healthy Cells. *ACS Nano*, 11, 7615-7625.
- Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrossi, F. & Salmon, E.D., 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol*, 153, 517-27.
- Cimini, D., Moree, B., Canman, J.C. & Salmon, E.D., 2003. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J Cell Sci*, 116, 4213-25.
- Cosnier, F., Seidel, C., Valentino, S., Schmid, O., Bau, S., Vogel, U., Devoy, J. & Gate, L., 2021. Retained particle surface area dose drives inflammation in rat lungs following acute, subacute, and subchronic inhalation of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol*, 18, 29.
- Coussens, L.M. & Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-7.
- Cveticanin, J., Joksic, G., Leskovac, A., Petrovic, S., Sobot, A.V. & Neskovic, O., 2010. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology*, 21.
- Deng, Z., Fear, M.W., Suk Choi, Y., Wood, F.M., Allahham, A., Mutsaers, S.E. & Prele, C.M., 2020. The extracellular matrix and mechanotransduction in pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 126, 105802.
- Di Cristo, L., Bianchi, M.G., Chiu, M., Taurino, G., Donato, F., Garzaro, G., Bussolati, O. & Bergamaschi, E., 2019. Comparative in Vitro Cytotoxicity of Realistic Doses of Benchmark Multi-Walled Carbon Nanotubes towards Macrophages and Airway Epithelial Cells. *Nanomaterials (Basel)*, 9.
- Di Giorgio, M.L., Di Bucchianico, S., Ragnelli, A.M., Aimola, P., Santucci, S. & Poma, A., 2011. Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat Res*, 722, 20-31.

- Di Ianni, E., Erdem, J.S., Moller, P., Sahlgren, N.M., Poulsen, S.S., Knudsen, K.B., Zienolddiny, S., Saber, A.T., Wallin, H., Vogel, U. & Jacobsen, N.R., 2021. In vitro-in vivo correlations of pulmonary inflammogenicity and genotoxicity of MWCNT. *Part Fibre Toxicol*, 18, 25.
- Diao, G., Li, H., Ivanenko, I. & Dontsova, T., 2020. Nickel and cobalt effect on properties of MWCNT-based anode for Li-ion batteries. *Applied Nanoscience*, 10, 4839-4845.
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G. & Alexander, A., 2006. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci*, 92, 5-22.
- Donaldson, K., Poland, C.A., Murphy, F.A., Macfarlane, M., Chernova, T. & Schinwald, A., 2013. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, 2078-86.
- Dong, J. & Ma, Q., 2015. Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity. *Nanotoxicology*, 9, 658-76.
- Dong, J. & Ma, Q., 2018. Macrophage polarization and activation at the interface of multi-walled carbon nanotube-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Nanotoxicology*, 12, 153-168.
- Dong, J., Porter, D.W., Batteli, L.A., Wolfarth, M.G., Richardson, D.L. & Ma, Q., 2015. Pathologic and molecular profiling of rapid-onset fibrosis and inflammation induced by multi-walled carbon nanotubes. *Arch Toxicol*, 89, 621-33.
- Duke, K.S., Thompson, E.A., Ihrle, M.D., Taylor-Just, A.J., Ash, E.A., Shipkowski, K.A., Hall, J.R., Tokarz, D.A., Cesta, M.F., Hubbs, A.F., Porter, D.W., Sargent, L.M. & Bonner, J.C., 2018. Role of p53 in the chronic pulmonary immune response to tangled or rod-like multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, 1-17.
- Dunnigan, J., 1984. Biological effects of fibers: Stanton's hypothesis revisited. *Environ Health Perspect*, 57, 333-7.
- Dymacek, J.M., Snyder-Talkington, B.N., Raese, R., Dong, C., Singh, S., Porter, D.W., Ducatman, B., Wolfarth, M.G., Andrew, M.E., Battelli, L., Castranova, V., Qian, Y. & Guo, N.L., 2018. Similar and Differential Canonical Pathways and Biological Processes Associated With Multiwalled Carbon Nanotube and Asbestos-Induced Pulmonary Fibrosis: A 1-Year Postexposure Study. *Int J Toxicol*, 37, 276-284.
- Eatemadi, A., Daraee, H., Karimkhanloo, H., Kouhi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., Abasi, M., Hanifehpour, Y. & Joo, S.W., 2014. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Research Letters*, 9.
- El-Gazzar, A.M., Abdelgied, M., Alexander, D.B., Alexander, W.T., Numano, T., Iigo, M., Naiki, A., Takahashi, S., Takase, H., Hirose, A., Kannno, J., Elokke, O.S., Nazem, A.M. & Tsuda, H., 2018. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats. *Arch Toxicol*.
- Ema, M., Imamura, T., Suzuki, H., Kobayashi, N., Naya, M. & Nakanishi, J., 2012. Evaluation of genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in a battery of in vitro and in vivo assays. *Regul Toxicol Pharmacol*, 63, 188-95.
- Enrhes, 2009. ENRHES – Engineered nanoparticles: review of health and environmental safety. *ENRHES*.
- Fan, J., Chen, Y., Yang, D., Shen, J. & Guo, X., 2020. Multi-walled carbon nanotubes induce IL-1beta secretion by activating hemichannels-mediated ATP release in THP-1 macrophages. *Nanotoxicology*, 14, 929-946.
- Fang, H., Cui, Y., Wang, Z. & Wang, S., 2018. Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes combined with nonylphenol in male mice. *PLoS One*, 13, e0200238.

- Francis, A.P., Ganapathy, S., Palla, V.R., Murthy, P.B., Ramaprabhu, S. & Devasena, T., 2015. One time nose-only inhalation of MWCNTs: Exploring the mechanism of toxicity by intermittent sacrifice in Wistar rats. *Toxicol Rep*, 2, 111-120.
- Fraser, K., Kodali, V., Yanamala, N., Birch, M.E., Cena, L., Casuccio, G., Bunker, K., Lersch, T.L., Evans, D.E., Stefaniak, A., Hammer, M.A., Kashon, M.L., Boots, T., Eye, T., Hubczak, J., Friend, S.A., Dahm, M., Schubauer-Berigan, M.K., Siegrist, K., Lowry, D., Bauer, A.K., Sargent, L.M. & Erdely, A., 2020. Physicochemical characterization and genotoxicity of the broad class of carbon nanotubes and nanofibers used or produced in U.S. facilities. *Part Fibre Toxicol*, 17, 62.
- Fukasawa, K., 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett*, 230, 6-19.
- Gangwal, S., Brown, J.S., Wang, A., Houck, K.A., Dix, D.J., Kavlock, R.J. & Hubal, E.A., 2011. Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential. *Environ Health Perspect*, 119, 1539-46.
- Gao, L.M., Xu, S.F., Zheng, Y., Wang, P., Zhang, L., Shi, S.S., Wu, T., Li, Y., Zhao, J., Tian, Q., Yin, X.B. & Zheng, L., 2019. Long non-coding RNA H19 is responsible for the progression of lung adenocarcinoma by mediating methylation-dependent repression of CDH1 promoter. *J Cell Mol Med*, 23, 6411-6428.
- Gate, L., Disdier, C., Cosnier, F., Gagnaire, F., Devoy, J., Saba, W., Brun, E., Chalansonnet, M. & Mabondzo, A., 2017. Biopersistence and translocation to extrapulmonary organs of titanium dioxide nanoparticles after subacute inhalation exposure to aerosol in adult and elderly rats. *Toxicol Lett*, 265, 61-69.
- Gate, L., Knudsen, K.B., Seidel, C., Berthing, T., Chezeau, L., Jacobsen, N.R., Valentino, S., Wallin, H., Bau, S., Wolff, H., Sebillaud, S., Lorcin, M., Grossmann, S., Viton, S., Nunge, H., Darne, C., Vogel, U. & Cosnier, F., 2019. Pulmonary toxicity of two different multi-walled carbon nanotubes in rat: Comparison between intratracheal instillation and inhalation exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 375, 17-31.
- Gate, L., Micillino, J.C., Sebillaud, S., Langlais, C., Cosnier, F., Nunge, H., Darne, C., Guichard, Y. & Binet, S., 2012. Genotoxicity of styrene-7,8-oxide and styrene in Fisher 344 rats: a 4-week inhalation study. *Toxicol Lett*, 211, 211-9.
- Germolec, D.R., Shipkowski, K.A., Frawley, R.P. & Evans, E., 2018. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol*, 1803, 57-79.
- Ghafouri-Fard, S., Esmaili, M. & Taheri, M., 2020. H19 lncRNA: Roles in tumorigenesis. *Biomed Pharmacother*, 123, 109774.
- Ghosh, M., Oner, D., Poels, K., Tabish, A.M., Vlaanderen, J., Pronk, A., Kuijpers, E., Lan, Q., Vermeulen, R., Bekaert, B., Hoet, P.H. & Godderis, L., 2017. Changes in DNA methylation induced by multi-walled carbon nanotube exposure in the workplace. *Nanotoxicology*, 11, 1195-1210.
- Gliga, A.R., Di Bucchianico, S., Lindvall, J., Fadeel, B. & Karlsson, H.L., 2018. RNA-sequencing reveals long-term effects of silver nanoparticles on human lung cells. *Sci Rep*, 8, 6668.
- Gonzalez, D.M. & Medici, D., 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 7, re8.
- Greten, F.R. & Grivnickov, S.I., 2019. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 51, 27-41.
- Grosse, Y., Loomis, D., Guyton, K.Z., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., Straif, K. & International Agency for Research on Cancer Monograph Working, G., 2014. Carcinogenicity of

- fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol*, 15, 1427-1428.
- Gulati, N. & Gupta, H., 2012. Two faces of carbon nanotube: toxicities and pharmaceutical applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 29, 65-88.
- Guseva Canu, I., Bateson, T.F., Bouvard, V., Debia, M., Dion, C., Savolainen, K. & Yu, I.J., 2016. Human exposure to carbon-based fibrous nanomaterials: A review. *Int J Hyg Environ Health*, 219, 166-75.
- Hadrup, N., Knudsen, K.B., Carriere, M., Mayne-L'hermite, M., Bobyk, L., Allard, S., Miserque, F., Pibaleau, B., Pinault, M., Wallin, H. & Vogel, U., 2021. Safe-by-design strategies for lowering the genotoxicity and pulmonary inflammation of multiwalled carbon nanotubes: Reduction of length and the introduction of COOH groups. *Environ Toxicol Pharmacol*, 87, 103702.
- Halappanavar, S., Van Den Brule, S., Nymark, P., Gate, L., Seidel, C., Valentino, S., Zhernovkov, V., Høgh Danielsen, P., De Vizcaya, A., Wolff, H., Stoger, T., Boyadziev, A., Poulsen, S.S., Sorli, J.B. & Vogel, U., 2020. Adverse outcome pathways as a tool for the design of testing strategies to support the safety assessment of emerging advanced materials at the nanoscale. *Part Fibre Toxicol*, 17, 16.
- Hamilton, R.F., Jr., Buford, M., Xiang, C., Wu, N. & Holian, A., 2012. NLRP3 inflammasome activation in murine alveolar macrophages and related lung pathology is associated with MWCNT nickel contamination. *Inhal Toxicol*, 24, 995-1008.
- Hamilton, R.F., Jr., Wu, Z., Mitra, S., Shaw, P.K. & Holian, A., 2013. Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on in vitro and in vivo toxicity, inflammation and lung pathology. *Part Fibre Toxicol*, 10, 57.
- Hamilton, R.F., Tsuruoka, S., Wu, N.Q., Wolfarth, M., Porter, D.W., Bunderson-Schelvan, M. & Holian, A., 2018a. Length, but Not Reactive Edges, of Cup-stack MWCNT Is Responsible for Toxicity and Acute Lung Inflammation. *Toxicol Pathol*, 46, 62-74.
- Hamilton, R.F., Wu, Z., Mitra, S. & Holian, A., 2018b. The Effects of Varying Degree of MWCNT Carboxylation on Bioactivity in Various In Vivo and In Vitro Exposure Models. *Int J Mol Sci*, 19.
- Han, J.H., Lee, E.J., Lee, J.H., So, K.P., Lee, Y.H., Bae, G.N., Lee, S.B., Ji, J.H., Cho, M.H. & Yu, I.J., 2008. Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhal Toxicol*, 20, 741-9.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Haniu, H., Saito, N., Matsuda, Y., Kim, Y.A., Park, K.C., Tsukahara, T., Usui, Y., Aoki, K., Shimizu, M., Ogihara, N., Hara, K., Takanashi, S., Okamoto, M., Ishigaki, N., Nakamura, K. & Kato, H., 2011. Effect of dispersants of multi-walled carbon nanotubes on cellular uptake and biological responses. *Int J Nanomedicine*, 6, 3295-307.
- Haniu, H., Saito, N., Matsuda, Y., Tsukahara, T., Maruyama, K., Usui, Y., Aoki, K., Takanashi, S., Kobayashi, S., Nomura, H., Okamoto, M., Shimizu, M. & Kato, H., 2013. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicol In Vitro*, 27, 1679-85.
- Hao, Y., Baker, D. & Ten Dijke, P., 2019. TGF-beta-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*, 20.
- Hardy, P.A. & Zacharias, H., 2005. Reappraisal of the Hanseman-Boveri hypothesis on the origin of tumors. *Cell Biol Int*, 29, 983-92.
- He, X., Young, S.H., Schwegler-Berry, D., Chisholm, W.P., Fernback, J.E. & Ma, Q., 2011. Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF-kappaB signaling, and promoting fibroblast-to-myofibroblast transformation. *Chem Res Toxicol*, 24, 2237-48.

- Hiraku, Y., Guo, F., Ma, N., Yamada, T., Wang, S., Kawanishi, S. & Murata, M., 2016. Multi-walled carbon nanotube induces nitrative DNA damage in human lung epithelial cells via HMGB1-RAGE interaction and Toll-like receptor 9 activation. *Part Fibre Toxicol*, 13, 16.
- Hirano, S., Fujitani, Y., Furuyama, A. & Kanno, S., 2010. Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 249, 8-15.
- Hol, E.M. & Capetanaki, Y., 2017. Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Horie, M., Tabei, Y., Sugino, S., Fukui, H., Nishioka, A., Hagiwara, Y., Sato, K., Yoneda, T., Tada, A. & Koyama, T., 2019. Comparison of the effects of multiwall carbon nanotubes on the epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology*, 13, 861-878.
- Huang, X., Tian, Y., Shi, W., Chen, J., Yan, L., Ren, L., Zhang, X. & Zhu, J., 2020. Role of inflammation in the malignant transformation of pleural mesothelial cells induced by multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, 14, 947-967.
- Hussain, S., Sangtian, S., Anderson, S.M., Snyder, R.J., Marshburn, J.D., Rice, A.B., Bonner, J.C. & Garantziotis, S., 2014. Inflammasome activation in airway epithelial cells after multi-walled carbon nanotube exposure mediates a profibrotic response in lung fibroblasts. *Part Fibre Toxicol*, 11, 28.
- Iarc, 2017. Some Nanomaterials and Some Fibres. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 111, 35-214.
- Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56-57.
- Invernizzi, R., Lloyd, C.M. & Molyneaux, P.L., 2020. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology*, 160, 171-182.
- Ircp, 1994. Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. *Publication 66*, 24, 1-3.
- Iso13794, 2019. Ambient air — Determination of asbestos fibres — Indirect-transfer transmission electron microscopy method. *13.040.20*.
- Jackson, P., Kling, K., Jensen, K.A., Clausen, P.A., Madsen, A.M., Wallin, H. & Vogel, U., 2015. Characterization of genotoxic response to 15 multiwalled carbon nanotubes with variable physicochemical properties including surface functionalizations in the FE1-Muta(TM) mouse lung epithelial cell line. *Environ Mol Mutagen*, 56, 183-203.
- Jacobson-Kram, D., Sistare, F.D. & Jacobs, A.C., 2004. Use of transgenic mice in carcinogenicity hazard assessment. *Toxicol Pathol*, 32 Suppl 1, 49-52.
- Jessop, F., Hamilton, R.F., Jr., Rhoderick, J.F., Fletcher, P. & Holian, A., 2017. Phagolysosome acidification is required for silica and engineered nanoparticle-induced lysosome membrane permeabilization and resultant NLRP3 inflammasome activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 318, 58-68.
- Jrc, 2014. Multi-walled carbon nanotubes, NM-400, NM-401, NM-402, NM-403, characterisation and physico-chemical properties. *JRC Science and Policy Report*.
- Ju, L., Zhang, G.L., Zhang, X., Jia, Z.Y., Gao, X.J., Jiang, Y., Yan, C.L., Duerksen-Hughes, P.J., Chen, F.F., Li, H.J., Zhu, X.Q. & Yang, J., 2014. Proteomic Analysis of Cellular Response Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes Exposure in A549 Cells. *Plos One*, 9.
- Julien, S., Puig, I., Caretti, E., Bonaventure, J., Nelles, L., Van Roy, F., Dargemont, C., De Herreros, A.G., Bellacosa, A. & Larue, L., 2007. Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene*, 26, 7445-56.
- Kalluri, R. & Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119, 1420-8.

- Kasai, T., Umeda, Y., Ohnishi, M., Kondo, H., Takeuchi, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Matsumoto, M. & Fukushima, S., 2015. Thirteen-week study of toxicity of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology*, 9, 413-22.
- Kasai, T., Umeda, Y., Ohnishi, M., Mine, T., Kondo, H., Takeuchi, T., Matsumoto, M. & Fukushima, S., 2016. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. *Part Fibre Toxicol*, 13, 53.
- Kato, T., Totsuka, Y., Ishino, K., Matsumoto, Y., Tada, Y., Nakae, D., Goto, S., Masuda, S., Ogo, S., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., Watanabe, M. & Wakabayashi, K., 2013. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology*, 7, 452-61.
- Kim, J.E., Lim, H.T., Minai-Tehrani, A., Kwon, J.T., Shin, J.Y., Woo, C.G., Choi, M., Baek, J., Jeong, D.H., Ha, Y.C., Chae, C.H., Song, K.S., Ahn, K.H., Lee, J.H., Sung, H.J., Yu, I.J., Beck, G.R., Jr. & Cho, M.H., 2010. Toxicity and clearance of intratracheally administered multiwalled carbon nanotubes from murine lung. *J Toxicol Environ Health A*, 73, 1530-43.
- Kim, J.S., Song, K.S., Lee, J.K., Choi, Y.C., Bang, I.S., Kang, C.S. & Yu, I.J., 2012. Toxicogenomic comparison of multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) and asbestos. *Arch Toxicol*, 86, 553-62.
- Kim, K., Lu, Z. & Hay, E.D., 2002. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*, 26, 463-76.
- Kimura, M., Yoshioka, T., Saio, M., Banno, Y., Nagaoka, H. & Okano, Y., 2013. Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. *Cell Death Dis*, 4, e603.
- Kisin, E.R., Murray, A.R., Sargent, L., Lowry, D., Chirila, M., Siegrist, K.J., Schwegler-Berry, D., Leonard, S., Castranova, V., Fadeel, B., Kagan, V.E. & Shvedova, A.A., 2011. Genotoxicity of carbon nanofibers: Are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 252, 1-10.
- Knudsen, K.B., Berthing, T., Jackson, P., Poulsen, S.S., Mortensen, A., Jacobsen, N.R., Skaug, V., Szarek, J., Hougaard, K.S., Wolff, H., Wallin, H. & Vogel, U., 2018. Physicochemical predictors of Multi-Walled Carbon Nanotube-induced pulmonary histopathology and toxicity one year after pulmonary deposition of 11 different Multi-Walled Carbon Nanotubes in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
- Knudsen, K.B., Berthing, T., Jackson, P., Poulsen, S.S., Mortensen, A., Jacobsen, N.R., Skaug, V., Szarek, J., Hougaard, K.S., Wolff, H., Wallin, H. & Vogel, U., 2019. Physicochemical predictors of Multi-Walled Carbon Nanotube-induced pulmonary histopathology and toxicity one year after pulmonary deposition of 11 different Multi-Walled Carbon Nanotubes in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 124, 211-227.
- Kodali, V.K., Roberts, J.R., Shoeb, M., Wolfarth, M.G., Bishop, L., Eye, T., Barger, M., Roach, K.A., Friend, S., Schwegler-Berry, D., Chen, B.T., Stefaniak, A., Jordan, K.C., Whitney, R.R., Porter, D.W. & Erdely, A.D., 2017. Acute in vitro and in vivo toxicity of a commercial grade boron nitride nanotube mixture. *Nanotoxicology*, 11, 1040-1058.
- Köhler Ar, Som C, A, H. & F, G., 2008. Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. *Journal of Cleaner Production*, 16, 927-937.
- Korchevskiy, A., Rasmuson, J.O. & Rasmuson, E.J., 2019. Empirical model of mesothelioma potency factors for different mineral fibers based on their chemical composition and dimensionality. *Inhal Toxicol*, 31, 180-191.
- Krauss, S.W., Spence, J.R., Bahmanyar, S., Barth, A.I., Go, M.M., Czerwinski, D. & Meyer, A.J., 2008. Downregulation of protein 4.1R, a mature centriole protein, disrupts

- centrosomes, alters cell cycle progression, and perturbs mitotic spindles and anaphase. *Mol Cell Biol*, 28, 2283-94.
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T. & Kawakami, Y., 2009. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell*, 15, 195-206.
- Kumar, M. & Ando, Y., 2010. Chemical vapor deposition of carbon nanotubes: a review on growth mechanism and mass production. *J Nanosci Nanotechnol*, 10, 3739-58.
- Kurbatova, P., Bessonov, N., Volpert, V., Tiddens, H.A., Cornu, C., Nony, P., Caudri, D. & Group, C.R.W., 2015. Model of mucociliary clearance in cystic fibrosis lungs. *J Theor Biol*, 372, 81-8.
- Lecce, D.D., Andreotti, P., Boni, M., Gasparro, G., Rizzati, G., Hwang, J.-Y., Sun, Y.-K. & Hassoun, A.J., 2018. Multiwalled Carbon Nanotubes Anode in Lithium-Ion Battery with LiCoO<sub>2</sub>, Li[Ni<sub>1/3</sub>Co<sub>1/3</sub>Mn<sub>1/3</sub>]O<sub>2</sub>, and LiFe<sub>1/4</sub>Mn<sub>1/2</sub>Co<sub>1/4</sub>PO<sub>4</sub> Cathodes. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 6, 3225-3232.
- Lechner, J.F., Haugen, A., McClendon, I.A. & Shamsuddin, A.M., 1984. Induction of squamous differentiation of normal human bronchial epithelial cells by small amounts of serum. *Differentiation*, 25, 229-37.
- Lee, D.K., Jeon, S., Jeong, J., Yu, I.J., Song, K.S., Kang, A., Yun, W.S., Kim, J.S. & Cho, W.S., 2020. Potential Role of Soluble Metal Impurities in the Acute Lung Inflammogenicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanomaterials (Basel)*, 10.
- Lee, J.H., Lee, S.B., Bae, G.N., Jeon, K.S., Yoon, J.U., Ji, J.H., Sung, J.H., Lee, B.G., Lee, J.H., Yang, J.S., Kim, H.Y., Kang, C.S. & Yu, I.J., 2010. Exposure assessment of carbon nanotube manufacturing workplaces. *Inhal Toxicol*, 22, 369-81.
- Lee, Y.H., Albig, A.R., Regner, M., Schiemann, B.J. & Schiemann, W.P., 2008. Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis*, 29, 2243-51.
- Leiva-Jua Rez, M., Kolls, J. & Evans, S., 2016. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Nature*, 11, 21-34.
- Li, R., Ong, S.L., Tran, L.M., Jing, Z., Liu, B., Park, S.J., Huang, Z.L., Walser, T.C., Heinrich, E.L., Lee, G., Salehi-Rad, R., Crosson, W.P., Pagano, P.C., Paul, M.K., Xu, S., Herschman, H., Krysan, K. & Dubinett, S., 2020. Chronic IL-1beta-induced inflammation regulates epithelial-to-mesenchymal transition memory phenotypes via epigenetic modifications in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*, 10, 377.
- Liao, D., Wang, Q., He, J., Alexander, D.B., Abdelgied, M., El-Gazzar, A.M., Futakuchi, M., Suzui, M., Kanno, J., Hirose, A., Xu, J. & Tsuda, H., 2018. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol*, 31, 1025-1031.
- Lim, C.S., Porter, D.W., Orandle, M.S., Green, B.J., Barnes, M.A., Croston, T.L., Wolfarth, M.G., Battelli, L.A., Andrew, M.E., Beezhold, D.H., Siegel, P.D. & Ma, Q., 2020. Resolution of Pulmonary Inflammation Induced by Carbon Nanotubes and Fullerenes in Mice: Role of Macrophage Polarization. *Front Immunol*, 11, 1186.
- Lindberg, H.K., Falck, G.C., Singh, R., Suhonen, S., Jarventaus, H., Vanhala, E., Catalan, J., Farmer, P.B., Savolainen, K.M. & Norppa, H., 2013. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells in vitro. *Toxicology*, 313, 24-37.
- Lindberg, H.K., Falck, G.C., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalan, J., Savolainen, K. & Norppa, H., 2009. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett*, 186, 166-73.

- Liu, Z., Liu, Y. & Peng, D., 2015. Carboxylation of multiwalled carbon nanotube attenuated the cytotoxicity by limiting the oxidative stress initiated cell membrane integrity damage, cell cycle arrestment, and death receptor mediated apoptotic pathway. *J Biomed Mater Res A*, 103, 2770-7.
- Lo, H.W., Hsu, S.C., Xia, W., Cao, X., Shih, J.Y., Wei, Y., Abbruzzese, J.L., Hortobagyi, G.N. & Hung, M.C., 2007. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res*, 67, 9066-76.
- Long, J., Ma, W., Yu, Z., Liu, H. & Cao, Y., 2019. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) promoted lipid accumulation in THP-1 macrophages through modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress. *Nanotoxicology*, 13, 938-951.
- Lopez-Novoa, J.M. & Nieto, M.A., 2009. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med*, 1, 303-14.
- Louro, H., Pinhao, M., Santos, J., Tavares, A., Vital, N. & Silva, M.J., 2016. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. *Toxicol Lett*, 262, 123-134.
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z. & Hunter, T., 2003. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell*, 4, 499-515.
- Luanpitpong, S., Wang, L. & Rojanasakul, Y., 2014. The effects of carbon nanotubes on lung and dermal cellular behaviors. *Nanomedicine (Lond)*, 9, 895-912.
- Lucas, J.H., Wang, Q., Muthumalage, T. & Rahman, I., 2021. Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) Cause Cellular Senescence in TGF-beta Stimulated Lung Epithelial Cells. *Toxics*, 9.
- Ma-Hock, L., Treumann, S., Strauss, V., Brill, S., Luizi, F., Mertler, M., Wiench, K., Gamer, A.O., Van Ravenzwaay, B. & Landsiedel, R., 2009. Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. *Toxicol Sci*, 112, 468-81.
- Maiato, H. & Logarinho, E., 2014. Mitotic spindle multipolarity without centrosome amplification. *Nat Cell Biol*, 16, 386-94.
- Malm, S.W., Amouzougan, E.A. & Klimecki, W.T., 2018. Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line. *Toxicol In Vitro*, 50, 383-390.
- Mandler, W.K., Nurkiewicz, T.R., Porter, D.W. & Olfert, I.M., 2017. Thrombospondin-1 mediates multi-walled carbon nanotube induced impairment of arteriolar dilation. *Nanotoxicology*, 11, 112-122.
- Markouli, M., Strepkos, D., Basdra, E.K., Papavassiliou, A.G. & Piperi, C., 2021. Prominent Role of Histone Modifications in the Regulation of Tumor Metastasis. *Int J Mol Sci*, 22.
- Maynard, A.D., Baron, P.A., Foley, M., Shvedova, A.A., Kisin, E.R. & Castranova, V., 2004. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health A*, 67, 87-107.
- Mccoy, A., Besch-Williford, C.L., Franklin, C.L., Weinstein, E.J. & Cui, X., 2013. Creation and preliminary characterization of a Tp53 knockout rat. *Dis Model Mech*, 6, 269-78.
- Mcintosh, J.R., 2016. Mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- Mcpeek, M., Malur, A., Tokarz, D.A., Murray, G., Barna, B.P. & Thomassen, M.J., 2018. PPAR-gamma pathways attenuate pulmonary granuloma formation in a carbon nanotube induced murine model of sarcoidosis. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Medici, D., Hay, E.D. & Olsen, B.R., 2008. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell*, 19, 4875-87.

- Meng, J., Li, X., Wang, C., Guo, H., Liu, J. & Xu, H., 2015. Carbon nanotubes activate macrophages into a M1/M2 mixed status: recruiting naive macrophages and supporting angiogenesis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 7, 3180-8.
- Meng, L., Jiang, A., Chen, R., Li, C.Z., Wang, L., Qu, Y., Wang, P., Zhao, Y. & Chen, C., 2013. Inhibitory effects of multiwall carbon nanotubes with high iron impurity on viability and neuronal differentiation in cultured PC12 cells. *Toxicology*, 313, 49-58.
- Mercer, R.R., Hubbs, A.F., Scabilloni, J.F., Wang, L., Battelli, L.A., Friend, S., Castranova, V. & Porter, D.W., 2011. Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol*, 8, 21.
- Mercer, R.R., Hubbs, A.F., Scabilloni, J.F., Wang, L., Battelli, L.A., Schwegler-Berry, D., Castranova, V. & Porter, D.W., 2010. Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol*, 7, 28.
- Mercer, R.R., Scabilloni, J.F., Hubbs, A.F., Battelli, L.A., Mckinney, W., Friend, S., Wolfarth, M.G., Andrew, M., Castranova, V. & Porter, D.W., 2013a. Distribution and fibrotic response following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol*, 10, 33.
- Mercer, R.R., Scabilloni, J.F., Hubbs, A.F., Wang, L., Battelli, L.A., Mckinney, W., Castranova, V. & Porter, D.W., 2013b. Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol*, 10, 38.
- Methner, M., Hodson, L., Dames, A. & Geraci, C., 2010. Nanoparticle Emission Assessment Technique (NEAT) for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials--Part B: Results from 12 field studies. *J Occup Environ Hyg*, 7, 163-76.
- Migliore, L., Saracino, D., Bonelli, A., Colognato, R., D'errico, M.R., Magrini, A., Bergamaschi, A. & Bergamaschi, E., 2010. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. *Environ Mol Mutagen*, 51, 294-303.
- Mishra, A., Stueckle, T.A., Mercer, R.R., Derk, R., Rojanasakul, Y., Castranova, V. & Wang, L., 2015. Identification of TGF-beta receptor-1 as a key regulator of carbon nanotube-induced fibrogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 309, L821-33.
- Moinard, J., Yquel, R. & Manier, G., 2004. [Pulmonary gas exchange during exercise in healthy subjects]. *Rev Mal Respir*, 21, 950-60.
- Moller, P., Wils, R.S., Di Ianni, E., Gutierrez, C.a.T., Roursgaard, M. & Jacobsen, N.R., 2021. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotube reference materials in mammalian cells and animals. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 788, 108393.
- Mordorintelligence, 2020. Carbon nanotubes market - growth, trends, covid-19 impact, and forecasts (2021-2026) *MordorIntelligence*.
- Morimoto, Y., Hirohashi, M., Ogami, A., Oyabu, T., Myojo, T., Todoroki, M., Yamamoto, M., Hashiba, M., Mizuguchi, Y., Lee, B.W., Kuroda, E., Shimada, M., Wang, W.N., Yamamoto, K., Fujita, K., Endoh, S., Uchida, K., Kobayashi, N., Mizuno, K., Inada, M., Tao, H., Nakazato, T., Nakanishi, J. & Tanaka, I., 2012. Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intratracheal instillation. *Nanotoxicology*, 6, 587-99.
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B. & Lison, D., 2005. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 207, 221-31.
- Multhoff, G., Molls, M. & Radons, J., 2011. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*, 2, 98.
- Murphy, F.A., Schinwald, A., Poland, C.A. & Donaldson, K., 2012. The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages

- stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol*, 9, 8.
- Murray, A.R., Kisin, E., Leonard, S.S., Young, S.H., Kommineni, C., Kagan, V.E., Castranova, V. & Shvedova, A.A., 2009. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology*, 257, 161-71.
- Nagai, H., Okazaki, Y., Chew, S.H., Misawa, N., Yamashita, Y., Akatsuka, S., Ishihara, T., Yamashita, K., Yoshikawa, Y., Yasui, H., Jiang, L., Ohara, H., Takahashi, T., Ichihara, G., Kostarelos, K., Miyata, Y., Shinohara, H. & Toyokuni, S., 2011. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, E1330-8.
- Nahle, S., Safar, R., Grandemange, S., Foliguet, B., Lovera-Leroux, M., Doumandji, Z., Le Faou, A., Joubert, O., Rihn, B. & Ferrari, L., 2019. Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages. *J Appl Toxicol*, 39, 764-772.
- Nicoletti, M., Capodanno, C., Gambarotti, C. & Fasoli, E., 2018. Proteomic investigation on bio-corona of functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1862, 2293-2303.
- Niosh, 2013. Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers. *Current Intelligence bulletin* 65.
- Oberdorster, G., Castranova, V., Asgharian, B. & Sayre, P., 2015. Inhalation Exposure to Carbon Nanotubes (CNT) and Carbon Nanofibers (CNF): Methodology and Dosimetry. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 18, 121-212.
- Ocde, 2016. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.
- Ocde, 2018. Essai n° 451 : Études de cancérogénèse.
- Olmeda, D., Montes, A., Moreno-Bueno, G., Flores, J.M., Portillo, F. & Cano, A., 2008. Snai1 and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines. *Oncogene*, 27, 4690-701.
- Oshimori, N., Li, X., Ohsugi, M. & Yamamoto, T., 2009. Cep72 regulates the localization of key centrosomal proteins and proper bipolar spindle formation. *EMBO J*, 28, 2066-76.
- Pacheco, Y., Ponchon, M., Lebecque, S., Calender, A., Bernaudin, J.F., Valeyre, D., Iglarz, M., Strasser, D.S., Studer, R., Freti, D., Renno, T. & Bentaher, A., 2018. Granulomatous lung inflammation is nanoparticle type-dependent. *Exp Lung Res*, 44, 25-39.
- Pacurari, M., May, I. & Tchounwou, P.B., 2017. Effects of lipopolysaccharide, multiwalled carbon nanotubes, and the combination on lung alveolar epithelial cells. *Environ Toxicol*, 32, 445-455.
- Pauluhn, J., 2010. Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol Sci*, 113, 226-42.
- Pauluhn, J. & Rosenbruch, M., 2015. Lung burdens and kinetics of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes) are highly dependent on the disaggregation of aerosolized MWCNT. *Nanotoxicology*, 9, 242-52.
- Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A., 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7, 415-28.
- Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A., 2004. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*, 48, 365-75.
- Petry, S., 2016. Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly. *Annu Rev Biochem*, 85, 659-83.
- Phuyal, S., Kasem, M., Rubio, L., Karlsson, H.L., Marcos, R., Skaug, V. & Zienolddiny, S., 2017. Effects on human bronchial epithelial cells following low-dose chronic exposure to nanomaterials: A 6-month transformation study. *Toxicol In Vitro*, 44, 230-240.

- Plasticstoday, 2019. <https://www.plasticstoday.com/materials/global-carbon-nanotube-market-grow-around-4000-tonnes-2023> [online]. [Accessed Access Date]
- Polimeni, M., Gulino, G.R., Gazzano, E., Kopecka, J., Marucco, A., Fenoglio, I., Cesano, F., Campagnolo, L., Magrini, A., Pietroiusti, A., Ghigo, D. & Aldieri, E., 2016. Multi-walled carbon nanotubes directly induce epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells via the TGF-beta-mediated Akt/GSK-3beta/SNAIL-1 signalling pathway. *Part Fibre Toxicol*, 13, 27.
- Ponti, J., Broggi, F., Mariani, V., De Marzi, L., Colognato, R., Marmorato, P., Gioria, S., Gilliland, D., Pascual Garcia, C., Meschini, S., Stringaro, A., Molinari, A., Rauscher, H. & Rossi, F., 2013. Morphological transformation induced by multiwall carbon nanotubes on Balb/3T3 cell model as an in vitro end point of carcinogenic potential. *Nanotoxicology*, 7, 221-33.
- Porter, D.W., Hubbs, A.F., Chen, B.T., Mckinney, W., Mercer, R.R., Wolfarth, M.G., Battelli, L., Wu, N., Sriram, K., Leonard, S., Andrew, M., Willard, P., Tsuruoka, S., Endo, M., Tsukada, T., Munekane, F., Frazer, D.G. & Castranova, V., 2013. Acute pulmonary dose-responses to inhaled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, 7, 1179-94.
- Porter, D.W., Hubbs, A.F., Mercer, R.R., Wu, N., Wolfarth, M.G., Sriram, K., Leonard, S., Battelli, L., Schwegler-Berry, D., Friend, S., Andrew, M., Chen, B.T., Tsuruoka, S., Endo, M. & Castranova, V., 2010. Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology*, 269, 136-47.
- Pothmann, D., Simar, S., Schuler, D., Dony, E., Gaering, S., Le Net, J.L., Okazaki, Y., Chabagno, J.M., Bessibes, C., Beausoleil, J., Nesslany, F. & Regnier, J.F., 2015. Lung inflammation and lack of genotoxicity in the comet and micronucleus assays of industrial multiwalled carbon nanotubes Graphistrength((c)) C100 after a 90-day nose-only inhalation exposure of rats. *Part Fibre Toxicol*, 12, 21.
- Poulsen, S.S., Jackson, P., Kling, K., Knudsen, K.B., Skaug, V., Kyjovska, Z.O., Thomsen, B.L., Clausen, P.A., Atluri, R., Berthing, T., Bengtson, S., Wolff, H., Jensen, K.A., Wallin, H. & Vogel, U., 2016. Multi-walled carbon nanotube physicochemical properties predict pulmonary inflammation and genotoxicity. *Nanotoxicology*, 10, 1263-75.
- Poulsen, S.S., Jacobsen, N.R., Labib, S., Wu, D., Husain, M., Andrew, Williams, Bøgelund, J.P., Andersen, O., Købler, C., Mølhøve, K., Kyjovska, Z.O., Saber, A.T., Wallin, H., Yauk, C.L., Vogel, U. & Halappanavar, S., 2013. Transcriptomic Analysis Reveals Novel Mechanistic Insight into Murine Biological Responses to Multi-Walled Carbon Nanotubes in Lungs and Cultured Lung Epithelial Cells. *PLoS One*, 8.
- Poulsen, S.S., Saber, A.T., Williams, A., Andersen, O., Kobler, C., Atluri, R., Pozzebon, M.E., Mucelli, S.P., Simion, M., Rickerby, D., Mortensen, A., Jackson, P., Kyjovska, Z.O., Mølhøve, K., Jacobsen, N.R., Jensen, K.A., Yauk, C.L., Wallin, H., Halappanavar, S. & Vogel, U., 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.
- R-Nano, 2016. Ministère de l'Environnement de l'Énergie et de la Mer - Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire RAPPORT D'ÉTUDE 2016. (<https://www.r-nano.fr/>).
- Rahman, L., Jacobsen, N.R., Aziz, S.A., Wu, D., Williams, A., Yauk, C.L., White, P., Wallin, H., Vogel, U. & Halappanavar, S., 2017. Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and pro-fibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis. *Mutat Res*, 823, 28-44.
- Ravichandran, P., Baluchamy, S., Sadanandan, B., Gopikrishnan, R., Biradar, S., Ramesh, V., Hall, J.C. & Ramesh, G.T., 2010. Multiwalled carbon nanotubes activate NF-kappaB

- and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells. *Apoptosis*, 15, 1507-16.
- Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I., Mcmenamin, M.G., Lechner, J.F., Su, R.T., Brash, D.E., Park, J.B., Rhim, J.S. & Harris, C.C., 1988. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res*, 48, 1904-9.
- Rezazadeh Azari, M., Mohammadian, Y., Pourahmad, J., Khodaghali, F., Peirovi, H., Mehrabi, Y., Omidi, M. & Rafieepour, A., 2019. Individual and combined toxicity of carboxylic acid functionalized multi-walled carbon nanotubes and benzo a pyrene in lung adenocarcinoma cells. *Environ Sci Pollut Res Int*, 26, 12709-12719.
- Ricci, G., Cucina, A., Proietti, S., Dinicola, S., Ferranti, F., Cammarota, M., Filippini, A., Bizzarri, M. & Catizone, A., 2021. Microgravity Induces Transient EMT in Human Keratinocytes by Early Down-Regulation of E-Cadherin and Cell-Adhesion Remodeling. *Applied Sciences*, 11.
- Rittinghausen, S., Hackbarth, A., Creutzenberg, O., Ernst, H., Heinrich, U., Leonhardt, A. & Schaudien, D., 2014. The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Part Fibre Toxicol*, 11, 59.
- Rivm, 2012. Prediction of carcinogenic potential of substances using repeated dose toxicity data. *RIVM Report 340700006/2012*.
- Rogers-Nieman, G.M. & Dinu, C.Z., 2014. Therapeutic applications of carbon nanotubes: opportunities and challenges. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 6, 327-37.
- Rubio, N., Hirvonen, L.M., Chong, E.Z., Wang, J.T., Bourgognon, M., Kafa, H., Hassan, H.A., Al-Jamal, W.T., McCarthy, D., Hogstrand, C., Festy, F. & Al-Jamal, K.T., 2015. Multiphoton luminescence imaging of chemically functionalized multi-walled carbon nanotubes in cells and solid tumors. *Chem Commun (Camb)*, 51, 9366-9.
- Russell, W.M.S. & Burch, R.L., 1959. *The principles of humane experimental technique*: Methuen.
- Ryman-Rasmussen, J.P., Tewksbury, E.W., Moss, O.R., Cesta, M.F., Wong, B.A. & Bonner, J.C., 2009. Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40, 349-58.
- Salton, F., Volpe, M.C. & Confalonieri, M., 2019. Epithelial(-)Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Kaunas)*, 55.
- Sargent, L.M., Porter, D.W., Staska, L.M., Hubbs, A.F., Lowry, D.T., Battelli, L., Siegrist, K.J., Kashon, M.L., Mercer, R.R., Bauer, A.K., Chen, B.T., Salisbury, J.L., Frazer, D., McKinney, W., Andrew, M., Tsuruoka, S., Endo, M., Fluharty, K.L., Castranova, V. & Reynolds, S.H., 2014. Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Particle and Fibre Toxicology*, 11.
- Sargent, L.M., Shvedova, A.A., Hubbs, A.F., Salisbury, J.L., Benkovic, S.A., Kashon, M.L., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., Friend, S., McKinstry, K.T., Battelli, L. & Reynolds, S.H., 2009. Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. *Environ Mol Mutagen*, 50, 708-17.
- Schmid, O. & Cassee, F.R., 2017. On the pivotal role of dose for particle toxicology and risk assessment: exposure is a poor surrogate for delivered dose. *Part Fibre Toxicol*, 14, 52.
- Sciacovelli, M. & Frezza, C., 2017. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *FEBS J*, 284, 3132-3144.
- Scott, L.E., Weinberg, S.H. & Lemmon, C.A., 2019. Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Cell Dev Biol*, 7, 135.

- Shannahan, J.H., Brown, J.M., Chen, R., Ke, P.C., Lai, X., Mitra, S. & Witzmann, F.A., 2013. Comparison of nanotube-protein corona composition in cell culture media. *Small*, 9, 2171-81.
- Shinohara, N., Nakazato, T., Ohkawa, K., Tamura, M., Kobayashi, N., Morimoto, Y., Oyabu, T., Myojo, T., Shimada, M., Yamamoto, K., Tao, H., Ema, M., Naya, M. & Nakanishi, J., 2016. Long-term retention of pristine multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation. *J Appl Toxicol*, 36, 501-9.
- Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Murray, A.R., Kommineni, C., Castranova, V., Fadeel, B. & Kagan, V.E., 2008. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 231, 235-40.
- Shvedova, A.A., Yanamala, N., Kisin, E.R., Khailullin, T.O., Birch, M.E. & Fatkhutdinova, L.M., 2016. Integrated Analysis of Dysregulated ncRNA and mRNA Expression Profiles in Humans Exposed to Carbon Nanotubes. *PLoS One*, 11, e0150628.
- Siegrist, K.J., Reynolds, S.H., Kashon, M.L., Lowry, D.T., Dong, C., Hubbs, A.F., Young, S.H., Salisbury, J.L., Porter, D.W., Benkovic, S.A., Mccawley, M., Keane, M.J., Mastovich, J.T., Bunker, K.L., Cena, L.G., Sparrow, M.C., Sturgeon, J.L., Dinu, C.Z. & Sargent, L.M., 2014a. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. *Part Fibre Toxicol*, 11, 6.
- Siegrist, K.J., Reynolds, S.H., Kashon, M.L., Lowry, D.T., Dong, C.B., Hubbs, A.F., Young, S.H., Salisbury, J.L., Porter, D.W., Benkovic, S.A., Mccawley, M., Keane, M.J., Mastovich, J.T., Bunker, K.L., Cena, L.G., Sparrow, M.C., Sturgeon, J.L., Dinu, C.Z. & Sargent, L.M., 2014b. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. *Particle and Fibre Toxicology*, 11.
- Siegrist, K.J., Reynolds, S.H., Porter, D.W., Mercer, R.R., Bauer, A.K., Lowry, D., Cena, L., Stueckle, T.A., Kashon, M.L., Wiley, J., Salisbury, J.L., Mastovich, J., Bunker, K., Sparrow, M., Lupoi, J.S., Stefaniak, A.B., Keane, M.J., Tsuruoka, S., Terrones, M., Mccawley, M. & Sargent, L.M., 2019. Mitsui-7, heat-treated, and nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes elicit genotoxicity in human lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*, 16, 36.
- Sierra, M.I., Rubio, L., Bayon, G.F., Cobo, I., Menendez, P., Morales, P., Mangas, C., Urdinguio, R.G., Lopez, V., Valdes, A., Vales, G., Marcos, R., Torrecillas, R., Fernandez, A.F. & Fraga, M.F., 2017. DNA methylation changes in human lung epithelia cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, 11, 857-870.
- Singh, G., Rice, P., Mahajan, R.L. & Mcintosh, J.R., 2009. Fabrication and characterization of a carbon nanotube-based nanoknife. *Nanotechnology*, 20, 095701.
- Snyder-Talkington, B.N., Dong, C., Castranova, V., Qian, Y. & Guo, N.L., 2019. Differential gene regulation in human small airway epithelial cells grown in monoculture versus coculture with human microvascular endothelial cells following multiwalled carbon nanotube exposure. *Toxicol Rep*, 6, 482-488.
- Snyder-Talkington, B.N., Dong, C., Porter, D.W., Ducatman, B., Wolfarth, M.G., Andrew, M., Battelli, L., Raese, R., Castranova, V., Guo, N.L. & Qian, Y., 2016a. Multiwalled carbon nanotube-induced pulmonary inflammatory and fibrotic responses and genomic changes following aspiration exposure in mice: A 1-year postexposure study. *J Toxicol Environ Health A*, 79, 352-66.
- Snyder-Talkington, B.N., Dong, C., Sargent, L.M., Porter, D.W., Staska, L.M., Hubbs, A.F., Raese, R., Mckinney, W., Chen, B.T., Battelli, L., Lowry, D.T., Reynolds, S.H., Castranova, V., Qian, Y. & Guo, N.L., 2016b. mRNAs and miRNAs in whole blood associated with lung hyperplasia, fibrosis, and bronchiolo-alveolar adenoma and

- adenocarcinoma after multi-walled carbon nanotube inhalation exposure in mice. *J Appl Toxicol*, 36, 161-74.
- Snyder-Talkington, B.N., Dong, C., Zhao, X., Dymacek, J., Porter, D.W., Wolfarth, M.G., Castranova, V., Qian, Y. & Guo, N.L., 2015. Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in vitro: concordance with in vivo studies. *Toxicology*, 328, 66-74.
- Snyder-Talkington, B.N., Dymacek, J., Porter, D.W., Wolfarth, M.G., Mercer, R.R., Pacurari, M., Denvir, J., Castranova, V., Qian, Y. & Guo, N.L., 2013a. System-based identification of toxicity pathways associated with multi-walled carbon nanotube-induced pathological responses. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272, 476-89.
- Snyder-Talkington, B.N., Pacurari, M., Dong, C., Leonard, S.S., Schwegler-Berry, D., Castranova, V., Qian, Y. & Guo, N.L., 2013b. Systematic analysis of multiwalled carbon nanotube-induced cellular signaling and gene expression in human small airway epithelial cells. *Toxicol Sci*, 133, 79-89.
- Song, C., He, L., Zhang, J., Ma, H., Yuan, X., Hu, G., Tao, L., Zhang, J. & Meng, J., 2016. Fluorofenidone attenuates pulmonary inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NALP3 inflammasome and IL-1beta/IL-1R1/MyD88/NF-kappaB pathway. *J Cell Mol Med*, 20, 2064-2077.
- Sos Poulsen, S., Jacobsen, N.R., Labib, S., Wu, D., Husain, M., Williams, A., Bogelund, J.P., Andersen, O., Kobler, C., Molhave, K., Kyjovska, Z.O., Saber, A.T., Wallin, H., Yauk, C.L., Vogel, U. & Halappanavar, S., 2013. Transcriptomic analysis reveals novel mechanistic insight into murine biological responses to multi-walled carbon nanotubes in lungs and cultured lung epithelial cells. *PLoS One*, 8, e80452.
- Stemmer, V., De Craene, B., Berx, G. & Behrens, J., 2008. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. *Oncogene*, 27, 5075-80.
- Strippoli, R., Benedicto, I., Perez Lozano, M.L., Cerezo, A., Lopez-Cabrera, M. & Del Pozo, M.A., 2008. Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF-kappaB/Snail1 pathway. *Dis Model Mech*, 1, 264-74.
- Stueckle, T.A., Davidson, D.C., Derk, R., Wang, P., Friend, S., Schwegler-Berry, D., Zheng, P., Wu, N., Castranova, V., Rojanasakul, Y. & Wang, L., 2017. Effect of surface functionalizations of multi-walled carbon nanotubes on neoplastic transformation potential in primary human lung epithelial cells. *Nanotoxicology*, 11, 613-624.
- Suzui, M., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Numano, T., Abdelgied, M., Takahashi, S., Ohnishi, M., Omori, T., Tsuruoka, S., Hirose, A., Kanno, J., Sakamoto, Y., Alexander, D.B., Alexander, W.T., Jiegou, X. & Tsuda, H., 2016. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci*, 107, 924-35.
- Suzuki, Y., Yuen, S.R. & Ashley, R., 2005. Short, thin asbestos fibers contribute to the development of human malignant mesothelioma: pathological evidence. *Int J Hyg Environ Health*, 208, 201-10.
- Sweeney, S., Berhanu, D., Misra, S.K., Thorley, A.J., Valsami-Jones, E. & Tetley, T.D., 2014. Multi-walled carbon nanotube length as a critical determinant of bioreactivity with primary human pulmonary alveolar cells. *Carbon N Y*, 78, 26-37.
- Sweeney, S., Grandolfo, D., Ruenraroengsak, P. & Tetley, T.D., 2015. Functional consequences for primary human alveolar macrophages following treatment with long, but not short, multiwalled carbon nanotubes. *Int J Nanomedicine*, 10, 3115-29.
- Takagi, A., Hirose, A., Futakuchi, M., Tsuda, H. & Kanno, J., 2012. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci*, 103, 1440-4.

- Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S. & Kanno, J., 2008. Induction of mesothelioma in p53<sup>+/-</sup> mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci*, 33, 105-16.
- Tan, C.M., Baudot, C., Han, Y. & Jing, H., 2012. Applications of multi-walled carbon nanotube in electronic packaging. *Nanoscale Res Lett*, 7, 183.
- Tavares, A.M., Louro, H., Antunes, S., Quarre, S., Simar, S., De Temmerman, P.J., Verleysen, E., Mast, J., Jensen, K.A., Norppa, H., Nessler, F. & Silva, M.J., 2014. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro*, 28, 60-9.
- Tennstedt, D. & Lachapelle, J.M., 2002. [Occupational dermatitis: irritation or allergy?]. *Rev Prat*, 52, 1409-14.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y. & Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
- Thompson, L.C., Holland, N.A., Snyder, R.J., Luo, B., Becak, D.P., Odom, J.T., Harrison, B.S., Brown, J.M., Gowdy, K.M. & Wingard, C.J., 2016. Pulmonary instillation of MWCNT increases lung permeability, decreases gp130 expression in the lungs, and initiates cardiovascular IL-6 transsignaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 310, L142-54.
- Thompson, L.C., Sheehan, N.L., Walters, D.M., Lust, R.M., Brown, J.M. & Wingard, C.J., 2018. Airway Exposure to Modified Multi-walled Carbon Nanotubes Perturbs Cardiovascular Adenosinergic Signaling in Mice. *Cardiovasc Toxicol*.
- Thompson, S.L. & Compton, D.A., 2011. Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 17974-8.
- Tilton, S.C., Karin, N.J., Tolic, A., Xie, Y., Lai, X., Hamilton, R.F., Waters, K.M., Holian, A., Witzmann, F.A. & Orr, G., 2014. Three human cell types respond to multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanobelts with cell-specific transcriptomic and proteomic expression patterns. *Nanotoxicology*, 8, 533-548.
- Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M. & Christofori, G., 2012. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol*, 22, 194-207.
- Tse, J.C. & Kalluri, R., 2007. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem*, 101, 816-29.
- Tsukahara, T. & Haniu, H., 2011. Cellular cytotoxic response induced by highly purified multi-wall carbon nanotube in human lung cells. *Mol Cell Biochem*, 352, 57-63.
- Tzanakakis, G., Kavasi, R.M., Voudouri, K., Berdiaki, A., Spyridaki, I., Tsatsakis, A. & Nikitovic, D., 2018. Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon. *Dev Dyn*, 247, 368-381.
- Ursini, C.L., Cavallo, D., Fresegna, A.M., Ciervo, A., Maiello, R., Buresti, G., Casciardi, S., Tombolini, F., Bellucci, S. & Iavicoli, S., 2012. Comparative cyto-genotoxicity assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. *Toxicol In Vitro*, 26, 831-40.
- Ursini, C.L., Maiello, R., Ciervo, A., Fresegna, A.M., Buresti, G., Superti, F., Marchetti, M., Iavicoli, S. & Cavallo, D., 2016. Evaluation of uptake, cytotoxicity and inflammatory effects in respiratory cells exposed to pristine and -OH and -COOH functionalized multi-wall carbon nanotubes. *J Appl Toxicol*, 36, 394-403.
- Vales, G., Rubio, L. & Marcos, R., 2016. Genotoxic and cell-transformation effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) following in vitro sub-chronic exposures. *J Hazard Mater*, 306, 193-202.
- Van Berlo, D., Wilhelmi, V., Boots, A.W., Hullmann, M., Kuhlbusch, T.A., Bast, A., Schins, R.P. & Albrecht, C., 2014. Apoptotic, inflammatory, and fibrogenic effects of two

- different types of multi-walled carbon nanotubes in mouse lung. *Arch Toxicol*, 88, 1725-37.
- Van Jaarsveld, R.H. & Kops, G., 2016. Difference Makers: Chromosomal Instability versus Aneuploidy in Cancer. *Trends Cancer*, 2, 561-571.
- Ventura, C., Pereira, J.F.S., Matos, P., Marques, B., Jordan, P., Sousa-Uva, A. & Silva, M.J., 2020a. Cytotoxicity and genotoxicity of MWCNT-7 and crocidolite: assessment in alveolar epithelial cells versus their coculture with monocyte-derived macrophages. *Nanotoxicology*, 14, 479-503.
- Ventura, C., Vieira, L., Silva, C., Sousa-Uva, A. & Silva, M.J., 2020b. Functional effects of differentially expressed microRNAs in A549 cells exposed to MWCNT-7 or crocidolite. *Toxicol Lett*, 328, 7-18.
- Vietti, G., Ibouaadaten, S., Palmari-Pallag, M., Yakoub, Y., Piret, J.P., Marbaix, E., Lison, D. & Van Den Brule, S., 2016. Towards predicting the lung fibrogenic activity of MWCNT: Key role of endocytosis, kinase receptors and ERK 1/2 signaling. *Nanotoxicology*, 10, 488-500.
- Visalli, G., Bertuccio, M.P., Iannazzo, D., Piperno, A., Pistone, A. & Di Pietro, A., 2015. Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes on A549 human lung epithelial cells. *Toxicol In Vitro*, 29, 352-62.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M. & Kroemer, G., 2011. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 385-92.
- Vitkina, T.I., Yankova, V.I., Gvozdenko, T.A., Kuznetsov, V.L., Krasnikov, D.V., Nazarenko, A.V., Chaika, V.V., Smagin, S.V., Tsatsakis, A., Engin, A.B., Karakitsios, S.P., Sarigiannis, D.A. & Golokhvast, K.S., 2016. The impact of multi-walled carbon nanotubes with different amount of metallic impurities on immunometabolic parameters in healthy volunteers. *Food Chem Toxicol*, 87, 138-47.
- Walczak, C.E., Cai, S. & Khodjakov, A., 2010. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 91-102.
- Wang, L., Stueckle, T.A., Mishra, A., Derk, R., Meighan, T., Castranova, V. & Rojasasakul, Y., 2014a. Neoplastic-like transformation effect of single-walled and multi-walled carbon nanotubes compared to asbestos on human lung small airway epithelial cells. *Nanotoxicology*, 8, 485-507.
- Wang, P., Wang, Y., Nie, X., Braini, C., Bai, R. & Chen, C., 2015. Multiwall carbon nanotubes directly promote fibroblast-myofibroblast and epithelial-mesenchymal transitions through the activation of the TGF-beta/Smad signaling pathway. *Small*, 11, 446-55.
- Wang, X.J., Shannahan, J.H. & Brown, J.M., 2014b. IL-33 modulates chronic airway resistance changes induced by multi-walled carbon nanotubes. *Inhalation Toxicology*, 26, 240-249.
- Wei, H., Liu, Y., Zhai, X., Wang, F., Ren, X., Tao, F., Li, T., Wang, G. & Ren, F., 2020. Application of Carbon Nanotube-Based Materials as Interlayers in High-Performance Lithium-Sulfur Batteries: A Review. *Frontiers in Energy Research*, 8.
- Weiner, S.J. & Neragi-Miandoab, S., 2009. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma and the role of environmental and genetic factors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135, 15-27.
- Westphal, G.A., Rosenkranz, N., Brik, A., Weber, D., Fohring, I., Monse, C., Kaiser, N., Hellack, B., Mattenkloft, M., Bruning, T., Johnen, G. & Bunger, J., 2019. Multi-walled carbon nanotubes induce stronger migration of inflammatory cells in vitro than asbestos or granular particles but a similar pattern of inflammatory mediators. *Toxicol In Vitro*, 58, 215-223.
- Whiteman, E.L., Liu, C.J., Fearon, E.R. & Margolis, B., 2008. The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene*, 27, 3875-9.

- Willis, B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., Du Bois, R.M. & Borok, Z., 2005. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 166, 1321-32.
- Wils, R.S., Jacobsen, N.R., Vogel, U., Roursgaard, M. & Moller, P., 2021. Inflammatory Response, Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Mice After Intrapleural Exposure to Carbon Nanotubes. *Toxicol Sci*, 183, 184-194.
- Wtec, 2007. Panel Report on International Assessment of Carbon Nanotube Manufacturing and Applications. *WTEC*.
- Yang, J. & Weinberg, R.A., 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14, 818-29.
- Yang, M.H. & Wu, K.J., 2008. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell Cycle*, 7, 2090-6.
- Yang, Y., Pan, X., Lei, W., Wang, J. & Song, J., 2006. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene*, 25, 7235-44.
- Yasui, M., Kamoshita, N., Nishimura, T. & Honma, M., 2015. Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes Environ*, 37, 6.
- Yeganeh, B., Kull, C.M., Hull, M.S. & Marr, L.C., 2008. Characterization of airborne particles during production of carbonaceous nanomaterials. *Environ Sci Technol*, 42, 4600-6.
- Zhang, X., Luo, M., Zhang, J., Yao, Z., Zhu, J., Yang, S., Zhu, Q. & Shen, T., 2021. Carbon nanotubes promote alveolar macrophages toward M2 polarization mediated epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Nanotoxicology*, 15, 588-604.
- Zhang, Y., Bai, Y. & Yan, B., 2010. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. *Drug Discov Today*, 15, 428-35.
- Zhao, F. & Klimecki, W.T., 2015. Culture conditions profoundly impact phenotype in BEAS-2B, a human pulmonary epithelial model. *J Appl Toxicol*, 35, 945-51.

-

# Annexes

**Annexe 1 : Études menées *in vivo* chez le rat ayant permis de mettre en évidence une inflammation, une fibrose ou le potentiel cancérigène suite à une exposition aux MWCNT.**

Voie d'administration	Modèle (sexe)	CNT (length, diameter)	Dose	Temps d'observation (post-exposition)	Observations	Références
Instillation intra-trachéale	Sprague-Dalwey (femelles)	MWCNT (l: 5,9 +/- 0,05 µm, d: 9,7 +/- 2 nm)	0,5, 2 et 5 mg/rat	60 jours	Inflammation, développement de granulomes	Muller <i>et al.</i> , 2005
Instillation intra-trachéale	Sprague-Dalwey (mâles)	MWCNT (l: 0,5-2 µm, d: 20-50 nm)	1, 10 et 100 µg/rat	1, 7, 30, 90 et 180 jours	Pas d'inflammation Apoptose des macrophages ayant phagocyté les MWCNT	Elgrabli <i>et al.</i> , 2008
Inhalation	Wistar (mâles et femelles)	Nanocyl NC7000 (l: 0,1-10 µm, d:5-15 nm)	0,1, 0,5 et 2,5 mg/m <sup>3</sup> , 6h/jour, 5 jours/semaine pendant 13 semaines	3 et 24 jours	Inflammation (Augmentation du nombre de cellules/protéines dans le LBA, Augmentation de la LDH)	Ma-Hock <i>et al.</i> , 2009
Injection intrascrotale	Fisher 344 (mâles)	MWCNT-7 #Lot 060125-01k (l: 1-4 µm, d: 70-110 nm)	0,24 mg/rat	52 semaines	Mésothéliomes	Sakamoto <i>et al.</i> , 2009
Inhalation	Wistar (mâles et femelles)	Baytubes (l: 0,2-0,3 µm, d: 10 nm)	0,1, 0,4, 1,5 et 6 mg/m <sup>3</sup> , pendant 13 semaines	6 mois	Inflammation transitoire (0,4 mg/m <sup>3</sup> ), puis persistante aux doses plus élevées	Pauluhn <i>et al.</i> , 2010
Instillation intra-trachéale	Fisher 344 (mâles)	MWCNT-7 #Lot 061220 (l: 5 µm, d: 88 nm)	40, 160 µg/rat	1, 7, 28 et 91 jours	Inflammation (Augmentation du nombre de cellules/protéines dans le LBA, Augmentation de la LDH), hyperplasie, granulomes, fibrose	Aiso <i>et al.</i> , 2010
Inhalation	Sprague-Dalwey (mâles)	MWNT-7 #lot 061220-31 (l: 3,9 µm, d: 49 nm)	5 mg/m <sup>3</sup> , 5h/jour, 1, 3 ou 4 jours	24h, 72h, 120h et 168h	Inflammation pulmonaire, translocation des NTC dans les organes systémiques (reins, foie, cœur)	Stapelton <i>et al.</i> , 2012

Instillation intra-trachéale	Wistar (mâles)	MWCNT (l: 0,94 µm, d: 48 nm)	0,2 et 1 mg/rat	3 jours et 6 mois	Inflammation pulmonaire, formation de granulomes	Morimoto <i>et al.</i> , 2012
Inhalation	Fisher 344 (mâles et femelles)	MWNT-7 #lot 080126 (l: 5+/-4,5, d: 88+/-5)	0,2, 1 ou 5 mg/m <sup>3</sup> , 6 h/jour, 5 jours/semaine, 2 semaines	1 jour et 4 semaines	Inflammation (Augmentation du nombre de cellules/protéines dans le LBA, Augmentation de la LDH) chez les rats exposés aux fortes doses	Umeda <i>et al.</i> , 2013
Injection intra-péritonéale	Wistar (mâles)	MWCNT A (l: 2,72 µm, d: 0,085 µm) MWCNT B (l: 2,13 µm, d: 0,062 µm) MWCNT C (l: 4,18 µm, d: 0,040 µm) MWCNT D (l: 2,53 µm, d: 0,037 µm)	10 <sup>9</sup> ou 5 × 10 <sup>9</sup> NTC	24 mois	Mésothéliomes	Rittinghausen <i>et al.</i> , 2014
Inhalation	Fisher 344/DuCrjCrj (mâles et femelles)	MWNT-7 #lot 071233 et 080216 (l: 5,7 µm, d: 90,7 nm)	0,2, 1 ou 5 mg/m <sup>3</sup> pendant 13 semaines	1 jour	induction d'une inflammation systémique	Kido <i>et al.</i> , 2014
Injection intra-péritonéale	Wistar (mâle)	MWCNT (d: 15-50 nm)	5 mg/m <sup>3</sup> pendant 4 heures	1, 7 et 14 jours	Inflammation, fibrose, et formation de granulomes à 7 et 14 jours	Francis <i>et al.</i> , 2015
Inhalation	F344 (mâles et femelles)	MWNT-7; Lot No. 080126	0, 0,02, 0,2, ou 2 mg/m <sup>3</sup>	0-104 semaines	Inflammation (LBA), hyperplasie, fibrose, Carcinomes pulmonaires, principalement carcinome bronchiolo-alvéolaire, et carcinomes et adénomes combinés	Kasai <i>et al.</i> , 2016
Vaporisation intra-trachéale	F344/Crj (mâles)	MWCNT-N (Nikkiso, Tokyo, Japan) (l: 3,5 µm, d: 1-20 nm)	1 mg/rat	2 et 109 semaines	Mésothéliome et tumeurs pulmonaires (adénomes et carcinomes bronchiolo-alvéolaires)	Suzui <i>et al.</i> , 2016

Instillation intra-trachéale	Sprague-Dalway (ND)	MWCNT-7, #Lot05072001 K28 (l: 3,86 µm, d: 49 ±13,4 nm)	100 µg/rat	1 jour	Inflammation (Augmentation du nombre de cellules/protéines dans le LBA, Augmentation de la LDH)	Thompson <i>et al.</i> , 2016
Inhalation	Sprague-Dawley (mâles)	MWNT-7 (l: 3,86 µm, d: 49 nm)	0,5, 1 or 5 mg/m <sup>3</sup> pendant 1 ou 9 jours	1 et 7 jours	Inhaled MWCNT cause functional changes in lung performance	Thompson <i>et al.</i> , 2018
Vaporisation intra-trachéale	Fisher 344 (mâles)	MWCNT-1 (l: 4,51 µm, d: 177 nm) MWCNT-2 (l: 5,59 µm, d: 90 nm)	250 µg/rat	1 jour et 3 mois	Infiltration de cellules immunitaires dans la cavité pleurale, fibrose	Liao <i>et al.</i> , 2018
Injection intrascrotale	Fisher 344 (mâles)	M-CNT (l: 5-20 µm, d: 20-50 nm) N-CNT (l: 5-20 µm, d: 30-50 nm) W-CNT (l: 5-20 µm, d: 10-50 nm) SD1-CNT (l: 5-20 µm, d: 30-100 nm) WS-CNT (l: 0,5-2 µm, d: 20-50 nm) SD2-CNT (l: 3 µm, d: <10-30 nm) T-CNT (l: 0,7 µm, d: 10-50 nm) DWCNT	1 mg/kg	52 semaines	Mésothéliomes	Sakamoto <i>et al.</i> , 2018
Vaporisation intra-trachéale	Fisher 344 (mâles)	(Toray Industries, Inc., Tokyo, Japan, d: 1-3 nm) MWCNT-7 (Mitsui Chemicals Inc., Tokyo, Japan, l: 6,5 µm, d: 55,5 nm)	0,25 and 0,50 mg/rat, tous les jours pendant 15 jours	1 et 6 semaines	Inflammation (Augmentation du nombre de cellules/protéines dans le LBA, Augmentation de la LDH)	El-Gazzart <i>et al.</i> , 2019
Inhalation	Sprague-Dalway (femelles)	NM-401 (l: 4,0 (±0,37), d: 67 (24–138) NM-403 (l: 0,4 (±0.03), d: 12 (5–37))	0,5 et 1,5 mg/m <sup>3</sup> , 3 h/jour, 5 jours/semaine pendant 4 semaines	3, 30, 90 et 180 jours	Inflammation pulmonaire	Gaté <i>et al.</i> , 2019
Inhalation	Sprague-Dalway (mâles)	MWCNT-7 (Mitsui Chemicals Inc., Tokyo, Japan)	0,5, 1 et 5 mg/m <sup>3</sup> , 6h/jour pendant 9 jours	18h et 7 jours	Augmentation de la résistance pulmonaire	Russ <i>et al.</i> , 2019

Vaporisation intra-trachéale	Fisher 344 (mâles)	MWCNT-7 (Mitsui Chemicals Inc., Tokyo, Japan, l: 6,5 µm, d: 55,5 nm)	0,5 mg	2 ans	Hyperplasie Inflammation (LBA) Mésothéliomes	Abdelgied <i>et al.</i> , 2019
Inhalation	Sprague-Dalwey (mâles)	MWCNT (l: 37 µm, d: 2,79 nm)	0, 0,257, 1,439, et 4,253 mg/m <sup>3</sup> pendant 28 j (6 h/j, 5j/sem, 4 sem)	1, 7, et 28 jours	Inflammation pulmonaire (LBA, LDH) Rétention des MWCNT Les MWCNT courbés ont une rétention plus faible	Kim <i>et al.</i> , 2020
Instillation intra-trachéale	F344/DuCrjCrj (mâles et femelles)	MWNT-7 (Bussan Nanotech Research Institute Inc., Tokyo, Japan, (l: 9,0 ± 6,1 µm, d: 75 ± 20,4 nm)	0,4 et 0,8 mg/kg (1x/sem pendant 8 semaines)	13 semaines	Inflammation (LBA) Fibrose Toxicité pleurale	Numano <i>et al.</i> , 2020
Vaporisation intra-trachéale	F344/DuCrjCrj (mâles)	MWCNT-A (l: 5,46 +/- 3,15 µm, d: 163 +/- 63 nm) MWCNT-B (l: 5,11 +/- 3,77 µm, d: 19,1 +/- 5,2 nm)	0,5 ou 1,0 mg	2 ans	Hyperplasie broncho-alvéolaire Potentiel cancérigène des deux MWCNT	Saleh <i>et al.</i> , 2020
Instillation intra-trachéale	Wistar (femelles)	CNT1 (l: 10-50 µm, d: 16,37 ± 0,2 nm) CNT2 (l: 1-25 µm, d: 15,64 ± 0,1 nm) CNT3 (l: 7,55 µm, d: 7,75 ± 0,1 nm) CNT4 (l: 3,55 µm, d: 16,7 ± 0,2 nm) CNT5 (l: 10,02 ± 0,3 µm, d: 58,3 ± 1,0 nm)	1,91 et 7,64 mg/kg	24h	Production variable de ROS Inflammation aiguë à 24h dose-dépendante Correlation entre le contenu en métal et l'inflammation	Lee <i>et al.</i> , 2020

**Annexe 2 : Études menées *in vivo* chez la souris ayant permis de mettre en évidence une inflammation, une fibrose ou le potentiel cancérigène suite à une exposition aux MWCNT.**

Voie d'administration	Modèle (sexe)	CNT	Dose	Temps d'observation (post-exposition)	Observations	Références
Instillation intratrachéale	ICR (mâles)	MWCNT (l: 0,1-5 µm, d: 2-20 nm)	4 mg/kg	24h	Inflammation	Inoue <i>et al.</i> , 2008
Injection intrapéritonéale	p53 +/- (mâles)	MWCNT-7, Lot#060125-01k	3 mg/souris	10-200 jours	Mésothéliomes	Takagi <i>et al.</i> , 2008
Aspiration pharyngée	C57BI (mâles)	MWNT-7, lot #05072001K28 (l: 13 µm, d:40-100 nm)	10, 20, 40 et 80 µg/souris	1, 7, 28 et 56 jours	Inflammation dose dépendante (Paramètres LBA)	Porter <i>et al.</i> , 2010
Injection intrapéritonéale	C57BI (femelles)	MWCNT1 (Meijo Nano Carbon) (l: 5–15 µm, d: 20–60 nm) MWCNT2 (SES research) (l: 1–2 µm, d: 60–100 nm) MWCNT3 (SES research) (l: 1–2 µm, d: <10 nm)	50 µg/souris	24h	Inflammation (Fluide abdominal)	Yamashita <i>et al.</i> , 2010
Instillation intratrachéale	C57BI (femelles)	MWCNT (l: 20 ± 10 µm, d: 31 ± 23 nm)	20, 40 µg/souris	7 jours	Inflammation transitoire	Han <i>et al.</i> , 2010
Instillation intratrachéale	C57BI (ND)	CM-95 (l: 20 µm, d: 10-15 nm)	10 et 100 µg/souris	24h, 1,2, 4 semaines et 4 mois	Inflammation, granulomes	Kim <i>et al.</i> , 2010

Injection intra-péritonéale	p53 +/- (ND)	NT50a (Mitsui) (l: 4 µm, d: 50 nm) NT50b (Showa Denko) (l: 10 µm, d: 80 nm) NT115 (Showa Denko) (l: 8 µm, d: 150 nm) NT145 (Showa Denko) (l: 6 µm, d: 150 nm) NTtngl (Showa Denko) (l: 3 µm, d: 15 nm)	300 µg/souris	1 an	mésothéliomes malins, inflammation, hyperplasie	Nagai <i>et al.</i> , 2011
Instillation intratrachéale	C57Bl/6	MWCNT (SES Research (Houston, TX), 900–1501, lot GS1801) d: 20-40 nm	100 µg	10, 60, ou 90 jours	granulomes, inflammation	Huizar <i>et al.</i> , 2011
Aspiration pharyngée	C57BL/6	FA08B (l: 5-15 µm, d: 24 nm) FA17 (l: 5-15 µm, d: 32 nm) FA10B (l: 5-15 µm, d: 29 nm) FA04 (l: 5-15 µm, d: 33 nm) FA21 (l: 5-15 µm, d: 27 nm) FA13 (l: 1-2 µm, d: 34 nm) FA05 (l: 1-2 µm, d: 29 nm) FA022 (l: 1-2 µm, d: 39 nm) FA11 (l: 1-2 µm, d: 245 nm)	150 µg/souris	7 et 56 jours	Inflammation	Hamilton <i>et al.</i> , 2012
Injection intra-péritonéale	Souris ICR (femelles)	MWCNT-7 (Lot#060125-01k)	2 mg/kg	2, 4, 10, 20 et 34 semaines	Stimulation du système immunitaire et de la réponse inflammatoire	Yamaguichi <i>et al.</i> , 2012
Injection intra-péritonéale	C57BL/6 p53 <sup>+/-</sup> (mâles)	MWCNT-7, Lot No. 060125-01k	3000 µg/souris	1 an	Mésothéliomes et inflammation	Takagi <i>et al.</i> , 2012
Instillation intranasale	BALB/c (mâles)	MWCNT (l: 0,1-10 µm, d: 10-15 nm)	1,5, 6,25 et 25 µg/souris	24h et 7 jours	Inflammation des voies respiratoires	Ronzani <i>et al.</i> , 2012
Inhalation	C57BL/6J (mâles)	MWNT-7, lot #061220-31	10 mg/m <sup>3</sup> , 5 h/jour pendant 2, 4, 8 et 12 jours	1 et 14 jours	Inflammation, hyperplasie, fibrose	Porter <i>et al.</i> , 2013

Inhalation	C57BL/6 (mâles)	MWNT-7, lot #05072001K28 (l: 13 µm, d:40-100 nm)	5 mg/m <sup>3</sup> , 5 h/jour pendant 12 jours (4x/semaines pendant 3 semaines)	1, 14, 84, 168 et 336 jours	Inflammation et réponse fibrotique	Mercer <i>et al.</i> , 2013
Instillation oro-pharyngée	C57BL/6	MWCNT (SES Research (Houston, TX), 900–1501, lot GS1801) d: 20-40 nm	100 µg/souris	60 jours	Inflammation, granulomes	Huizar <i>et al.</i> , 2013
Inhalation	B6C3F1 (mâles)	MWNT-7, lot #061220-31	5 mg/m <sup>3</sup> (5 h/jour, pendant 15 jours)	17 mois	Inflammation, adénomes bronchiolo-alvéolaires et adénocarcinomes pulmonaires	Sargent <i>et al.</i> , 2014
Instillation intra-trachéale	C57BL/6 (mâles)	MWCNT (l: 1-5 µm, d: 12,5-25 nm)	4 mg/kg	24h et 30 jours	Inflammation et fibrose pulmonaire	Wang <i>et al.</i> , 2014
Instillation intra-trachéale	C57BL/6 (mâles)	S-MWCNT (l: 350–700 nm, d: 10-20 nm) L-MWCNT (l: 5–15 µm, d: 10-20 nm)	60 µg/souris	7, 28 et 56 jours	Fibrose pulmonaire, inflammation	Chen <i>et al.</i> , 2014
Aspiration pharyngée	C57BL/6 (mâles)	MWNT-7 from Mitsui & Co., Japan., (l: 13 µm, d:40-100 nm) NM 400, Nanocyl, Belgium (l: 5 µm, d: 30nm)	0,002 mg/g	8 semaines	Inflammation, hyperplasie, granulomes	Van Berlo <i>et al.</i> , 2014
Aspiration pharyngée	C57BL/6 (mâles)	Mitsui & Company (MWCNT-7, Lot No. 05072001K28)	10, 20, 40, ou 80 µg/souris	1, 7, 28 et 56 jours	Identificaiton de réseaux de signalisation qui reflètent la réponse inflammatoire et fibrotique pulmonaire induite par les MWCNT	Dymacek <i>et al.</i> , 2015
Aspiration pharyngée	C57BL/6 (mâles)	MWNT-7, lot #05072001K28	0, 5, 20 and 40 µg/souris	1, 3, 7 et 14 jours	Inflammation, fibrose pulmonaire	Dong <i>et al.</i> , 2015
Instillation intra-trachéale	C57BL/6 (femelles)	NRCWE-026 (Nanocyl NC7000 CNT, Sambreville, Belgium) NM-401 (Union Joint Research Centre, Ispra, Italy)	0, 18, 54 et 162 µg/souris	3 et 28 jours	Inflammation, fibrose pulmonaire	Poulsen <i>et al.</i> , 2015

Aspiration pharyngée	C57BL/6 (mâles)	MWNT-7 (Kawasaki-shi, Japan; lot #080918 01 K), MWCNTg (l: 1,12 +/- 0,005, d: 67 +/-2)	120 µg/souris	15, 30 et 60 jours	Dépôt de collagène dans les poumons	Polimeni <i>et al.</i> , 2016
Aspiration pharyngée	Gclm (mâles et femelles)	MWCNT (l: 1,1 µm, d: 18 nm)	25 µg/souris	24h	Inflammation (LBA)	Catwright <i>et al.</i> , 2016
Inhalation	C57BL/6 (mâles)	MWNT-7, lot #05072001K28	1, 10, 40, et 80 µg/souris	1, 6 et 12 mois	Inflammation et fibrose pulmonaire	Snyder-Talkington <i>et al.</i> , 2016
Instillation intra-trachéale	C57BL/6J BomTac (femelles)	NRCWE-040 (l: 518.9 (±598) µm, d: 20.56 (±6.94) nm) RCWE-041 (l: 1005 (±2948) µm, d: 26.38 (±11.08) nm) NRCWE-042 (l: 723.2 (±971.9) µm, d: 20.5 (±5.32) nm) NRCWE-043 (l: 771.3 (±3471) µm, d: 26.73 (±6.88) nm) NRCWE-044 (l: 1330 (±2454) µm, d: 32.55 (±14.4) nm) NRCWE-045 (l: 1553 (±2954) µm, d: 28.07 (±13.85) nm) NRCWE-046 (l: 717.2 (±1214) µm, d: 17.22 (±5.77) nm) NRCWE-047 (l: 532.5 (±591.9) µm, d: 12.96 (±4.44) nm) NRCWE-048 (l: 1604 (±5609) µm, d: 15.08 (±4.69) nm) NRCWE-049 (l: 731.1 (±1473) µm, d: 13.85 (±6.09) nm) tMWCNT (Helix Material Solutions Inc. (Richardson, TX) rMWCNT (XRNI MWNT-705072001 K28)	0, 6, 18 et 54 µg/souris	1, 28 et 92 jours	Inflammation	Poulsen <i>et al.</i> , 2016
Aspiration pharyngée	Stat1 +/+ (mâles)	(Helix Material Solutions Inc. (Richardson, TX) rMWCNT (XRNI MWNT-705072001 K28)	4 mg/kg	21 jours	Inflammation chronique, fibrose pulmonaire	Duke <i>et al.</i> , 2017

Aspiration pharyngée	C57BL/6 (mâles et femelles)	MWCNT (l: 1,1 µm, d: 18 nm)	80 µg/souris	24h	Réponse inflammatoire (ARNm TNFα, IL6, IL1β)	Vandivort <i>et al.</i> , 2017
Instillation intratrachéale	BALBc (mâles)	NM-400 (European Commission, Joint Research Centre)	2,5 et 0,25 mg/kg	48h	Inflammation (LBA), hyperméthylation de l'ADN	Tabish <i>et al.</i> , 2017
Instillation intratrachéale	Muta™Mouse (femelles)	MWNT-7 (Mitsui-7; Lot# 05072001K28)	36 ± 6 ou 26 ± 2 µg/souris et 109 ± 18 ou 78 ± 5 µg/souris	60 jours	Inflammation et fibrose pulmonaire, signature cancérogène	Rahman <i>et al.</i> , 2017
Aspiration pharyngée	C57BL/6 (mâles)	Mitsui-7 (l: 3,86 µm, d: 49 nm)	40 µg/souris	1, 3 et 7 jours	Inflammation et fibrose pulmonaire	Dong <i>et al.</i> , 2018
Aspiration pharyngée	C57BL/6	Mitsui-7 (l: 3,86 µm, d: 49 nm)	50 µg/souris	24h	Inflammation	Mandler <i>et al.</i> , 2018
Aspiration pharyngée	C57BL/6 (mâles)	MWNT-7, lot #05072001K28	10, 20, 40 et 80 µg/souris	1 an	Développement d'une fibrose pulmonaire à long terme, signature moléculaire	Dymacek <i>et al.</i> , 2018
Injection intrapleurale	C57BL/6	MWCNT1 (l: 214 nm, d: 15 nm) MWCNT2 (l: 185 nm, d: 9 nm)	50 et 100 µg/souris	28 jours	Inflammation pleurale, hyperplasie, fibrose	Arnoldussen <i>et al.</i> , 2018
Instillation intratrachéale	C57BL/6	MWCNT (SES Research (Houston, TX), 900–1501, lot GS1801) d: 20-40 nm	60 µg/souris	7, 15 et 30 jours	Inflammation et formation de granulomes	Pacheo <i>et al.</i> , 2018
Instillation intratrachéale	C57BL/6	MWCNT (l: 5-15 µm, d: 33 nm)	2 mg/kg	24h et 6 jours	Inflammation, fibrose pulmonaire	Carvalho <i>et al.</i> , 2018
Aspiration pharyngée	C57BL/6 p53 <sup>+/-</sup>	tMWCNT (l: 0,3-50 µm, d: 30-50 nm) rMWCNT (l: 3,86-50 µm, d: 49 nm)	4 mg/kg	11 mois	Pas de tumeurs Granulomes Hyperplasie	Duke <i>et al.</i> , 2018

Instillation intra-trachéale	C57BL/6 (mâles)	NM-402 (l: 20 µm, d: 30 nm)	25,6 µg/IT, 1IT/sem, 5 semaines	24h et 8 semaines	Influx de macrophages - neutrophiles Secretion de IL-1β, IL-6 Augmentation du facteur de coagulation VIII Inflammation alvéolaire	Luyts <i>et al.</i> , 2018
Instillation intra-trachéale	C57BL/6N BomTac (femelles)	NM-400 (l: 0.85 ± 0.10 µm, d: 11 ± 3 nm)	54 µg/souris	1 an	Biopersistance, inflammation, granulomes, fibrose	Knudsen <i>et al.</i> , 2019
		NM-401 (l: 4.0 ± 0.37, d: 67 ± 24 nm)				
		NM-402 (l: 1.4 ± 0.19, d: 11 ± 3 nm)				
		NM-403 (l: 0.4 ± 0.03, d: 12 ± 7 nm)				
		NRCWE-006, MWNT-7 (l: 5.7 ± 0.49, d: 74 (29-173) nm)				
		NRCWE-040 (l: 0.52 ± 0.59, d: 20.56 ± 6.9 nm)				
		NRCWE-041 (l: 1.0 ± 2.95, d: 26.38 ± 11.1 nm)				
		NRCWE-042 (l: 0.72 ± 0.97, d: 20.5 ± 5.32 nm)				
		NRCWE-046 (l: 0.72 ± 1.2, d: 17.2 ± 5.8 nm)				
		NRCWE-047 (l: 0.53 ± 0.59, d: 12.96 ± 4.4 nm)				
NRCWE-048 (l: 1.6 ± 5.6, d: 15.08 ± 4.7 nm)						
Aspiration pharyngée	C57BL/6J (mâles)	XNRI MWNT-7, lot #05072001K28	40 µg/souris	3-7-28 jours	La voie NF-κB est activée pour médier la transactivation des gènes pro-fibrotiques dans les cellules fibroblastiques au cours des réponses pulmonaires aiguës et chroniques aux NTC	Dong et Ma, 2019
Instillation intra-trachéale	C57BL/6N (mâles)	MWCNT-7 (l: 0,5 µm, d:74 nm) MWCNT-B (l: 5,2 µm, d: 176 nm)	10 et 50 µg/souris	1 semaine et 1 mois	Inflammation (LBA) Granulomes (MWCNT-7)	Horie <i>et al.</i> , 2019

Instillation oro-pharyngée	C57Bl/6J et ABCA1-KO	MWCNT (900-1201, lot-GS1802; SES Research, Houston, TX)	100 µg/souris	60 jours	Granulomes Inflammation Expression de CCL2 et Osteopontine Implication des macrophages dans le développement des granulomes (ABCA1)	McPeck <i>et al.</i> , 2019
Instillation oro-pharyngée	C57BL/6J	MWCNT (900-1201, lot-GS1802; SES Research, Houston, TX)	100 µg/souris	60 jours	Inflammation chronique Granulomes Reduction de l'oxydation des acides gras mitochondriaux dans les macrophages alvéolaires Stress oxydant et apoptose Expression de miR-27b dans les macrophages alvéolaires	Soliman <i>et al.</i> , 2020
Instillation oro-pharyngée	C57BL6 (mâles)	NC7000 TP7000 TP-COOH TP-NH2 CP7000 CP-COOH CP-NH2	1,6 et 4 mg/kg	3 et 60 jours	Inflammation Cytokines pro-inflammatoires (LBA-J3) : IL-1β, IL-6, CXCL1 Les MWCNT à fonction amine ont causé le plus grand nombre de lésions granulomateuses dans les poumons	Taylor-Just <i>et al.</i> , 2020
Instillation oro-pharyngée	C57BL/6 et Mmp12 KO	MWCNTs (900–1201, lot-GS1802, SES Research, Houston, TX, United States)	100 µg/souris	3, 10, 20 et 60 jours	Granulomes pulmonaires MMP12 est impliqué dans la formation des granulomes	Mohan <i>et al.</i> , 2020
Aspiration pharyngée	B6C3F1 (mâles)	Mitsui-7, XNRI 1, lot #-0507 2001K28, Tokyo, Japan	40 µg/souris	1, 7 et 28 jours	Inflammation aiguë (J1 et J7) Granulomes (J28) Recrutement de neutrophiles (LBA)	Lim <i>et al.</i> , 2020
Aspiration oro-pharyngée	C57BL/6 (mâles)	MWCNT-7 (Porter et al., 2013)	10 et 40 µg/souris	24h	Secretion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6 et TNF-α) Inflammation pulmonaire indépendante de l'activité des MMP (LBA)	Young <i>et al.</i> , 2021

Instillation intra-trachéale	C57BL/6 J Bom (femelles)	CNT-pristine (l: $3,9 \pm 2,7 \mu\text{m}$ , d: $26 \pm 12,7 \text{ nm}$ ) CNT-short (l: $1,0 \pm 0,6 \mu\text{m}$ , d: $26 \pm 12,7 \text{ nm}$ ) CNT-COOH-high (l: $3,1 \pm 1,8 \mu\text{m}$ , d: $26 \pm 12,7 \text{ nm}$ ) CNT-COOH-low (l: $3,3 \pm 2,4 \mu\text{m}$ , d: $26 \pm 12,7 \text{ nm}$ )	18 et 54 $\mu\text{g/souris}$	1, 28 et 90 jours	Influx de neutrophiles plus important avec les longs MWCNT Génotoxicité des longs MWCNT Influx de neutrophile réduit avec les MWCNT courts ou fonctionnalisés COOH (jour 1 et 28) MWCNT-7 et NM-401: inflammation aiguë, afflux de macrophages et neutrophiles dans la cavité pleurale (jusqu'à 90 jours) -Production de ROS NM-403: pas d'inflammation pleurale, pas de production de ROS. Pas ou peu de dommages à l'ADN	Hadrup <i>et al.</i> , 2021
Injection intra-pleurale	C57BL/6 (femelles)	MWCNT-7 NM-401 NM-403	0,2 et 5 $\mu\text{g/souris}$	1 et 90 jours	Influx eosinophiles Inflammation pulmonaire Haut niveau de IgE Implication de la voie STAT6 dans la réponse inflammatoire (voie allergie)	Solling Wils <i>et al.</i> , 2021
Aspiration intranasale	Wild type (WT) et STAT6 knockout (Stat6 KO) (mâles)	MWCNT (l: $0,5\text{-}40 \mu\text{m}$ , d: $10\text{-}30 \text{ nm}$ )	Aux jours 0, 2, 4, 14, 16 et 18 ( $12,5 \mu\text{g/souris}$ )	21 jours	Présence des particules dans les poumons, la rate, les ganglions lymphatiques, de façon dose dépendante Induction des gènes de la réponse inflammatoire Toxicité dans les autres organes due aux macrophages	Ihrie <i>et al.</i> , 2021
Inhalation	B6C3F1/N (mâles)	MWCNT (l: $2,6 \mu\text{m}$ , d: $15 \text{ nm}$ )	0, 0,06, 0,2, et 0,6 $\text{mg/m}^3$ pendant 30 jours	30 jours		Migliaccio <i>et al.</i> , 2021

### Annexe 3 : Études menées *in vitro* ayant permis de mettre en évidence le potentiel toxique des MWCNT.

Type Cellulaire	Concentrations	Temps d'exposition	MWCNT	Observations	Référence
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	5 µg/mL 0.5 µg/mL	48h et 336h	MWCNT-N MWCNT-R	Mort cellulaire Baisse viabilité cellulaire Relarguage de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8)	Soto <i>et al.</i> , 2008
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	1, 20, et 40 µg/cm <sup>2</sup>	4h	MWCNT	Influence des contaminants métalliques sur la cytotoxicité Dommages à l'ADN	Karlsson <i>et al.</i> , 2008
Macrophages murins (J774.1 et CHO-K1)	0-100 µg/mL	0-24h	XNRI WMVT-7 Lot# 05072001K28	Cytotoxicité Pas de modulation d'expression génique des cytokines, MAKP, et voies apoptotiques Association des MWCNT avec la paroi des macrophages (lyse)	Hirano <i>et al.</i> , 2008
HDMEC (fibroblastes) PBMC (cellules sanguines humaines)	0-150 µL/mL	24h	MWCNT (l: 1-5 µm, d: 20-40 nm)	Micronoyaux Dommages à l'ADN	Cveticanin <i>et al.</i> , 2009
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	0,1 à 100 µg/mL (0,02 à 20 µg/cm <sup>2</sup> )	6, 24, 48, 72h à	MWCNT (l: 0,1-13 µm, d: 12 nm)	Baisse de l'activité métabolique Pas d'apoptose Pas d'internalisation	Tabet <i>et al.</i> , 2009
V79 (fibroblastes de poumons)	0,1 à 100 µg/mL	24h	Baytubes	Aberrations chromosomiques Pas de dommages à l'ADN Pas de cytotoxicité Pas de mutagénicité	Wirnitzer <i>et al.</i> , 2009
PBMC (cellules sanguines humaines)	25 et 250 µg/mL	3, 18, 24h	MWCNT (l: 0,1-10 µm, d: 10-50 nm)	Cytotoxicité Mort cellulaire	Walker <i>et al.</i> , 2009
U937 (lymphome)	0,1 mg/mL	24, 48, 72 et 96h	As-grown (l: 10-20 µm, d: 100-150 nm) HTT1800 (l: 10-20 µm, d: 100-150 nm) HTT2800 (l: 10-20 µm, d: 100-150 nm)	Diminution de la prolifération Cytotoxicité Modifications des protéines du métabolisme	Haniu <i>et al.</i> , 2010

Macrophages murins (RAW264.7)	30, 100 et 300 µg/mL	24h	MWCNT (l: 1-2 µm, d: 10-30 nm)	Cytotoxicité Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires	Palomaki <i>et al.</i> , 2010
Macrophages murins (RAW264.7)	0,01 à 100 µg/mL	2 et 48h	MWCNT (l: 5-9 µm, d: 110-170 nm)	Cytotoxicité Micronoyaux Dommages à l'ADN Comètes	Migliore <i>et al.</i> , 2010
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	50 µg/mL	3-24h	M1 (l: 5-15 µm, d: 20-60 nm) M2 (l: 1-2 µm, d: 60-100 nm) M3 (l: 1-2 µm, d: <10 nm)	Dommages à l'ADN	Yamashita <i>et al.</i> , 2010
CHL/IU (Cellules de poumons de hamster)	12,5 à 400 µg/mL	24h-7 jours	MWNT-7 (l: 5,0 ± 4,5 µm, d: 88 ± 5 nm)	Cytotoxicité Diminution viabilité cellulaire Micronoyaux Aberrations chromosomiques	Asakura <i>et al.</i> , 2010
LE cells (cellules épithéliales de poumons de rat)	5µg	12-24h	MWCNT (l: 2,5-20 µm, d: 6-13 nm)	Dommages à l'ADN Activation des voies NF-KB et AP-1 Apoptose	Ravichandran <i>et al.</i> , 2010
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	2, 5, 10 µg/mL (0,5, 1.25, 2,5 µg/cm <sup>2</sup> )	2, 5, 8 et 12h	XNRI WMVT-7	Cytotoxicité Cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) Activation des voies p38, ERK et HSP27 Activation des voies NF-KB et AP-1	Hirano <i>et al.</i> , 2010
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines) WI38-VA13 (fibroblastes de poumons humains) A549 (adénocarcinome pulmonaire) RAW264.7 (macrophages murins)	BEAS-2B : 0, 2, 20 et 200 µg/mL WI38-VA13 : 0, 5 et 10 µg/mL A549 : 0, 2, 20 et 200 µg/mL RAW264.7 : 0, 2, 20 et 200 µg/mL	0-120min 16-24h 1 - 4 jours	MWCNT (Sigma) (l: 2,5-20 µm, d: 6-13 nm)	Cytotoxicité dose-dépendante (BEAS-2B, A549, and WI38-VA13) Production de ROS Activation de la voie NF-KB, sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10, and MCP1 (RAW264.7) Production de facteurs de croissance pro-fibrotiques TGFβ1 et PDGF, signaux de transformation des fibroblastes de poumons en myofibroblastes (fibrose) (WI38-VA13)	He <i>et al.</i> , 2011

BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines) MESO-1 (mésothéliome pleural malin humain)	10 µg/mL	24h	MWCNT (l: 8 µm, d: 150 nm)	Cytotoxicité et Inflammation	Haniu <i>et al.</i> , 2011
MeT5A, HPMC (cellules mésothéliales du péritoine) RAW264.7 (macrophages murins)	5 µg/c <sup>2</sup>	24h	NT50a (Mitsui) (l: 4 µm, d: 50 nm) NT50b (Showa Denko) (l: 10 µm, d: 80 nm) NT115 (Showa Denko) (l: 8 µm, d: 150 nm) NT145 (Showa Denko) (l: 6 µm, d: 150 nm) NTtngl (Showa Denko) (l: 3 µm, d: 15 nm)	Pas d'internalisation des NTC (MeT5A et HPMC) Internalisation des NTC sauf NTtngl (RAW264.7) Cytotoxicité (NT6+50a)	Nagai <i>et al.</i> , 2011
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	30 µg/mL	24 et 72h	HTT2800 (l: 10-20 µm, d: 100-150 nm)	Mort cellulaire Dommages à l'ADN Secretion de cytokines (IL-6 et IL-8) Pas de ROS	Tsukahara <i>et al.</i> , 2011
HUVECs (ATCC CRL-2873)	0,5, 2, 5, 10, 20, 50 et 100 µg/mL	2h et 6-12- 24h	MWCNT (l: < 1 µm, d: 30 nm)	Baisse survie cellulaire Apoptose Modification de morphologie cellulaire gH2AX foci Production de ROS	Guo <i>et al.</i> , 2011
Macrophages murins (RAW264.7)	50 µg/mL	24-48-72 h	MWCNT (l: 0,5-50 µm, d: 10-30 nm)	Aberrations chromosomiques Apoptose Production de ROS Interaction avec la membrane plasmique	Di Giorgio <i>et al.</i> , 2011
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	0,5-100 µg/mL	6-72 h	MWCNT (l: 0,3-2 µm, d: 5-20 nm)	Apoptose Stress oxydant	Srivastava <i>et al.</i> , 2011
NHBE (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0,01 - 0,1%	24 et 48h	MWCNT (l: 545 µm, d: 10-15 nm)	Modification de l'expression génique (Mésothéliome et cancer des poumons) Aberrations chromosomiques Micronoyaux Mutations	Kim <i>et al.</i> , 2012

A549 (adénocarcinome pulmonaire)	5, 10, 40 et 100 µg/m/	2, 4 et 24h	MWCNT (l: 0,5-200 µm, d: 20-40 nm)	Diminution de la viabilité cellulaire Dommages à l'ADN	Cavallo <i>et al.</i> , 2012
THP-1 (Macrophages humains) MeT5A (cellules mésothéliales)	5 µg/cm <sup>2</sup>	24h	NTshort (l: 1-2 µm, d: 25,7 ± 1.6 nm) NTtang1 (l: 1-5 µm, d: 14,84 ± 0.005 nm) NTtang2 (l: 5-20 µm, d: 10,40 ± 0.32 nm) NTlong1 (l: 13 µm, d: 84,89 ± 1.9 nm) NTlong2 (l: 6 µm, d: 165,012 ± 4.68 nm)	Sécrétion de cytokines (THP-1) Phagocytose frustrée (fibres longues) Réponse pro-inflammatoire)	Murphy <i>et al.</i> , 2012
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	2,5, 5, 10 µg/mL	4-24h	CNT20 (l: 0,5-2 µm, d: 20-30 nm) CNT40 (l: 0,5-2 µm, d: 40-70 nm)	Dommages à l'ADN	Guo <i>et al.</i> , 2012
RAW264.7 (macrophages murins)	0,02, 0,1, et 0.5 mg/mL	24, 48 et 72h	a-MWCNT (Chengdu Organic Chemicals Co. Ltd.)	Diminution de la prolifération des macrophages	Yang <i>et al.</i> , 2012
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	5, 10, 20 et 40 µg/mL de MWCNT et 1, 5, 10, 20 et 40 µg/mL de MWCNT-OH.	2, 4 et 24h	MWCNT (l: 0,07-7,8 µm; d: 32 ± 2 nm) MWCNT-OH (l: 0,02-1,7 µm; d: 18 ± 1 nm)	Activité LDH Réduction de la viabilité cellulaire Apoptose Dommages à l'ADN	Ursini <i>et al.</i> , 2012
RAW264.7 (macrophages murins) MCF-7 (Cancer du sein)	0,2, 2, 20, 100, 200, 400 µg/ml	24h	Court MWCNT (l: 1,5 µm, d: 40-60 nm) Long MWCNT (l: 3-14 µm, d: 40-60 nm)	Le CNT plus long est plus toxique	Liu <i>et al.</i> , 2012
RAW264.7 (macrophages murins)	38, 80 µg/mL	3 jours	MWCNT (l: 1-2 µm, d: 10-30 nm) MWCNT-F (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )	La fonctionnalisation facilite l'interaction avec les cellules Interaction des MWCNT-F avec les macrophages (mitose)	Fraczek- Szczypta <i>et al.</i> , 2012

Macrophages de souris C57BL/6 exposées aux MWCNT	/	/	FA08B (l: 5-15, d: 24) FA17 (l: 5-15, d: 32) FA10B (l: 5-15, d: 29) FA04 (l: 5-15, d: 33) FA21 (l: 5-15, d: 27) FA13 (l: 1-2, d: 34) FA05 (l: 1-2, d: 29) FA022 (l: 1-2, d: 39) FA11 (l: 1-2, d: 245)	Activation de l'inflammasome NLRP3 Relargage de cytokines (IL-1B, IL-18)	Hamilton <i>et al.</i> , 2012
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	20-200 mg/mL	6h	MWNT-7 (l: 1-4 µm, d: 70-110 nm)	Micronoyaux	Kato <i>et al.</i> , 2013
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines) MeT5A (cellules mésothéliales du péritoine)	5-200 µg/cm <sup>2</sup> (19-760 µg/mL)	24-48h	MWCNT (l: 1-2 µm, d: 10-30 nm)	Dommmages à l'ADN Micronoyaux	Lindberg <i>et al.</i> , 2013
SAEC (petites cellules épithéliales bronchiques)	1,2 µg/mL	1, 6 et 24h	MWNT-7, Mitsui (l: 3,86 µm, d: 49 nm)	Interaction des CNT à la périphérie des cellules Production de ROS Altération des biomarqueurs de cancérogénicité, progression tumorale, et défaut des poumons	Snyder-Talkington <i>et al.</i> , 2013
Co-culture SAEC , cellules endothéliales	1,2 µg/mL	6-24h	MWNT-7, Mitsui (l: 3,86 µm, d: 49 nm)	Production de ROS Réarrangement de l'actine Perte de surface de contact Activation des voies NF-KB, STAT3 et p38 Sécrétion de VEGFA, sICAM-1, et sVCAM-1	Snyder-Talkington <i>et al.</i> , 2013
RAW264.7 (macrophages murins) NIH3T3 (fibroblastes embryonnaires)	10, 20 et 40 µg/mL (RAW264.7) 5, 10, 15 et 30 µg/mL (NIH3T3)	24h	Court MWCNT (l: 0,5-2 µm, d: 50 nm) Long MWCNT (l: 20-50 µm, d: 50 nm)	Production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TGF-β1, and PDGF-AA) Augmentation de l'expression de TGFB1, TNFα, ColIII Voie de signalisation TGFβ1/Smad	Wang <i>et al.</i> , 2013
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	1-10-50 µg/mL	24h	MWNT-7 (l: 10 µm, d: 60 nm)	Cytotoxicité Pas d'internalisation des MWCNT	Haniu <i>et al.</i> , 2013

BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines) RLE-6TN (cellules alvéolaires épithéliales II) THP-1 (macrophage humain)	10, 25, 50, et 100 µg/mL	24h	O-MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm) P-MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm) F-MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm)	Augmentation IL-1b (THP-1)	Xia <i>et al.</i> , 2013
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines) RLE-6TN (cellules alvéolaires épithéliales II) THP-1 (macrophage humain)	10, 25, 50, et 100 µg/mL	24h	O-MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm) P-MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm) F-MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm)	Cytotoxicité ≥ 50 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 2013
HFL-1 (fibroblastes humains poumons foetal) BALB-3T3 (fibroblastes murins embryonnaires) MLg (fibroblastes murins de poumons)	1, 4,7, 18,75 et 27,5 µg/cm <sup>2</sup>	24h	NM400 (l: 0,7-3 µm, d: 5-35 nm) NM402 (l: 0,7-4 µm, d: 6-20 nm)	Prolifération des fibroblastes <i>in vitro</i>	Vietti <i>et al.</i> , 2013
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	10 µg/mL	0-48h	HTT2800 (l: 10-20 µm, d: 100-150 nm)	Mort cellulaire Dommages à l'ADN Secretion de cytokines pathologie pulmonaire	Tsukahara <i>et al.</i> , 2013
MH-S Macrophages alvéolaires murin	25–100 µg/cm <sup>2</sup>	24h	MWCNT+Fe (l: 1,12 µm, d: 67 nm) MWCNT-Fe (l: 1,23 µm, d: 52,6 nm)	MWCNT+Fe : Cytotoxicité, Genotoxicité, Stress oxydant	Aldieri <i>et al.</i> , 2013

BALB-3T3 (fibroblastes murins embryonnaires)	100 µg/mL	72h	Nanocyl®-7000 (l: 1,5 µm, d: 9,5 nm) Nanocyl®-3101 (l: 1,5 µm, d: 9,5 nm) Nanocyl®-3152 (l: <1 µm, d: 9,5 nm) Nanocyl®-3153 (l: <1 µm, d: 9,5 nm)	Pas de cytotoxicité Pas de micronoyaux Transformation cellulaire	Ponti <i>et al.</i> , 2013
THP-1 (macrophage humain) Macrophages de souris C57BL/6 exposées aux MWCNT	/	/	FA08B (l: 5-15, d: 24) FA17 (l: 5-15, d: 32) FA10B (l: 5-15, d: 29) FA04 (l: 5-15, d: 33) FA21 (l: 5-15, d: 27) FA13 (l: 1-2, d: 34) FA05 (l: 1-2, d: 29) FA022 (l: 1-2, d: 39) FA11 (l: 1-2, d: 245)	Les MWCNT de plus grand diamètre/longueur augmentent l'activation de l'inflammosome.	Hamilton <i>et al.</i> , 2013
THP-1 (macrophages humains) SAEC (petites cellules épithéliales pulmonaires) Caco-2/HT29-MTX coculture MDM (Macrophages humains sanguins) MDDC	10, 100 µg/mL	1, 3 et 24h	MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm)	Augmentation de l'expression de gènes: Prolifération cellulaire, Réparation de l'ADN Anti-apoptotiques	Tilton <i>et al.</i> , 2014
(Cellules dendritiques humaines) 16HBE140 (Cellules épithéliales humaines)	0,005-0.02 mg/mL	24h	MWCNT (Cheap Tubes Inc.)	Pas de cytotoxicité Sécrétion des cytokines TNFα et IL-8	Clift <i>et al.</i> , 2014
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	0, 0,3, 3, 30 et 300 µg/ml	0, 2, 12 et 24h	MWCNT (l: < 1 µm, d: 30 nm)	Cytotoxicité (fortes doses) Augmentation de l'expression de l'Actine Capacités migratoires	Ju <i>et al.</i> , 2014

BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0,024, 0,24, 2,4 et 24 µg/cm <sup>2</sup>	24h	MWCNT (l: 0,1-2 µm, d: 10-20 nm)	Interaction des MWCNT avec les microtubules, l'ADN et les centrosomes. Mitoses anormales Anuploïdie	Siegrist <i>et al.</i> , 2014
NIH 3T3 (fibroblastes embryonnaires de souris) RLE-6TN (cellules épithéliales alvéolaires de rat)	0-15-30-60 µg/mL	24-48h	Court MWCNT (l: 0.5-2 µm, d: 50 nm) Long MWCNT (l: 20-50 µm, d: 50 nm)	Conversion fibroblaste-myofibroblaste Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) Activation de la voie de signalisation TGF-β/Smad2 Induction TGF-β1 et collagène III	Wang <i>et al.</i> , 2014
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	1, 4 et 16 µg/cm <sup>2</sup>	72h	S-MWCNT (l: 350-700 nm, d: 10-20 nm) L-MWCNT (l: 5-15 µm, d: 10-20 nm)	L-MWCNT: baisse de l'expression de la protéine E- cadhérine et de l'actine musculaire lisse (α-SMA)	Chen <i>et al.</i> , 2014
RAW264.7 (macrophages murins)	0,625, 2,5, et 10 µg/cm <sup>2</sup>	24h	MWNT-7 from Mitsui & Co., Japan (l: 13 µm, d: 4-100 nm) NM 400, Nanocyl, Belgium (l: 5 µm, d: 30 nm)	Cytotoxicité (longs MWCNT) Réponse pro-fibrotique et inflammatoire (ARNm) Apoptose Caspase 3/7	Van Berlo <i>et al.</i> , 2014
SHE (cellules embryonnaires de hamster) V79 (cellules de poumons de hamster)	0,27 - 2,1 µg/cm <sup>2</sup>	24h	MWCNT 3100, Nanocyl, Belgium (l: 1,5 µm; d: 9,5 nm) MWCNT 3150, Nanocyl, Belgium (l: <1 µm; d: 9,5 nm) MWCNT SBb (l: >0,8 µm; d: 15-50 nm) MWCNT SBp (l: >0,8 µm; d: 15-50 nm)	Cytotoxicité Génotoxicité - Micronoyaux	Darne <i>et al.</i> , 2014
HBE (cellules épithéliales bronchiques humaines)	1,5-24 µg/mL équivalent à 0,37- 6,0 µg/cm <sup>2</sup>	24h	MWCNT (l: 0,5-40 µm, d: 10-30 nm)	NLRP3 inflammasome Augmentation de l'ARNm de marqueurs pro- fibrotiques (TIMP-1, Tenascin-C, Procollagen 1, et Osteopontin)	Hussain <i>et al.</i> , 2014
THP-1 (macrophages humains)	2-10 µg/mL	24h	XNRI WMVT-7, Lot# 05072001K28	Sécrétion IL-1B	Kanno <i>et al.</i> , 2014
THP-1 (macrophages humains) PBMC (cellules sanguines humaines)	10-100 µg/mL	24h	MWCNT (l: 0,5-40 µm)	Sécrétion IL-1B, IL-6	Taylor <i>et al.</i> , 2014

BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	5-200 mg/L	4-72h	MWCNT-NH2 (l: 1-15 µm, d:13-18 nm) MWCNT-Pristine (l: 1-15 µm, d:13-18 nm) MWCNT-O+ (l: 1-15 µm, d:13-18 nm) MWCNT-COOH (l: 1-15 µm, d:13-18 nm)	Cytotoxicité Génotoxicité Fonctionnalisation influence la bioactivité des MWCNT	Chatterjee <i>et al.</i> , 2014
Cellules sanguines	0,256 mg/mL	0-400 min	NRCWE-006 (Mitsui&Co., Ltd., Ibaraki, Japan) NRCWE-007 (Cheap Tubes Inc., Brattleboro, VT, USA) NM-400 NM-401 NM-402 NM-403	Micronoyaux Génotoxicité	Tavares <i>et al.</i> , 2014
SAEC (petites cellules épithéliales bronchiques)	1,2 µg/mL	6-24h	MWCNT-7, lot #05072001K28	Altération de la morphologie cellulaire Diminutions des jonctions serrées Perturbation du cytosquelette Expression d'ARNm (inflammation et fibrose)	Snyder-Talkington <i>et al.</i> , 2014
Calu-3 (cancer du poumon humain)					
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0, 15, 30, 45, et 75 mg/cm <sup>2</sup>	24h, 8 jours	MWCNT (l: 5-9 µm, d: 110-170 nm)	Mort cellulaire Baisse viabilité/Apoptose	Rotoli <i>et al.</i> , 2015
A549 (adénocarcinome pulmonaire)					
C10 (lignée cellulaire pneumocyttaire )	25 µg/mL	24h	(Hamilton et al., 2012)	Secretion de HMGB1 (inflammasome activation) Sécrétion IL-1B	Jessop <i>et al.</i> , 2015
MDM (Macrophages humains sanguins)	3, 10, 30, 100 et 300 mg/mL	6h	MWCNT	Protéines sécrétées similaires à l'amiante Dommages lysosomes	Patomaki <i>et al.</i> , 2015

cellules épithéliales pulmonaire de souris FE-1 Muta™	12,5–200 µg/mL	24h	NM-401 NM-402 NM-403 NRCWE-026 MWCNT-XNRI-7	Pas de cytotoxicité Pas de dommages à l'ADN Baisse de la prolifération cellulaire	Jackson <i>et al.</i> , 2015
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	50 µg/mL	30 min	pMWCNT	Dysfonction lysosomale Dommages à l'ADN Micronoyaux Production de ROS	Visalli <i>et al.</i> , 2015
SAEC (petites cellules épithéliales bronchiques) HMVEC (cellules endothéliales microvasculaires)	1,2 µg/mL	24h	Mitsui (Mitsui&Co. Lot#05072001K28)	Gènes de la réponse inflammatoire	Snyder-Talkington <i>et al.</i> , 2015
MDA-435	0, 12,7, 25,3 et 50,6 µg/ml	de 48 à 72h	MWCNT (l: 1-4 µm, d: 70-110 nm) AP-MWCNT (l: 10-30 µm, d: 20-30 nm) PD-MWCNT (l: 10-30 µm, d: 20-30 nm) COOH-MWCNT (l: 10-30 µm, d: 20-30 nm)	La polyploïdisation par les MWCNT est très similaire à celle observée avec la crocidolite.	Yasui <i>et al.</i> , 2015
RAW264.7 (macrophages murins)	0,03, 0,1, et 0,3 mg/mL	24h, 4, 12, and 24 h	MWCNTs (Cheaptubes Inc., Grafton, VT)	Production TGF-β1 et IL-1β Réponses cellulaires pro-fibrogéniques	Meng <i>et al.</i> , 2015
A549 (adénocarcinome pulmonaire) MDDCs (cellules dendritiques)	0,14, 0,20 et 0,39 mg/cm²	24h	MWCNTs (Cheaptubes Inc., Grafton, VT)	Pas de cytotoxicité Pas de marqueurs de l'inflammation	Chortarea <i>et al.</i> , 2015
MM6 (monocyte humain) J774A.1 (macrophages de souris)	7,5, 15, 31, 62, et 125 µg/mL	4, 24, 48h	MWCNT-7, lot #05072001K28	Phagocytose frustrée	Boyles <i>et al.</i> , 2015
SAEC (petites cellules épithéliales bronchiques)	1,2 mg/mL	6 et 24h	MWCNT-7, lot #05072001K28	Diminution de la prolifération Interaction avec les cellules Internalisation potentielle Augmentation ROS Altération du cycle cellulaire	Mihalchik <i>et al.</i> , 2015

A549 (adénocarcinome pulmonaire)	5, 10, 20 µg/mL	1-2-4h et 24h	MWCNTs-COOH	Contact des MWCNT avec la membrane cellulaire Modification de la surface cellulaire	Fanizaa <i>et al.</i> , 2015
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0,25, 2 et 10 mg/cm <sup>2</sup>	24h	MWCNT-7, lot #05072001K28	Diminution du potentiel membranaire mitochondrial Signature de 330 gènes (dont 26 gènes dont la fonction mitochondriale est connue)	Nymark <i>et al.</i> , 2015
Macrophages alvéolaires primaires	10 µg/mL	24h , 1 et 5 jours	Long-MWCNT (l: 19,3 µm, d: 30,6 nm) Court-MWCNT (l: 1,1 µm, d: 30,6 nm)	Réduction de la phagocytose et de la capacité migratoire parallèlement à une expression accrue de MARCO Phagocytose frustrée Diminution de la capacité migratoire	Sweeney <i>et al.</i> , 2015
THP-1 (macrophages humains)	10 µg/mL	24h	MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm)	La suppression de l'activation de l'inflammasome et de l'IL-1β par un microenvironnement pulmonaire allergique est un mécanisme par lequel les MWCNT exacerbent la fibrose des voies respiratoires	Shipkowski <i>et al.</i> , 2015
HBEC (Cellules épithéliales bronchiques humaines) HMC (Cellules mésothéliales humaines)	10 µg/mL	2, 6, et 24 h	MWNT-7; Tokyo, Japan	Internalisation dans les HBEC Accumulation dans des lysosomes Absorption par les cellules non phagocytaires Identification des voies d'endocytose	Maruyama <i>et al.</i> , 2015
THP-1 (macrophages humains)	0, 0,53, 1,06, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 75 et 100 µg/mL	24h	MWCNT (l: 0,5-2 µm, d: 20-50 nm)	Dégradation des MWCNT <i>via</i> les ROS Identification des mécanismes de dégradation	Elgrabli <i>et al.</i> , 2015
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0,02–0,6 µg/cm <sup>2</sup>	48h	XNRI MWNT-7, lot no. 05072001K28	Augmentation de TGFβ1, TGF-βR1 et Smad2/3 Augmentation du collagène	Mishra <i>et al.</i> , 2015
NHBE (cellules épithéliales bronchiques humaines)	1-10 µg/cm <sup>2</sup>	24h	MWCNT (l: 1-10 µm, d: 12,5-25 nm)	Diminution de la résistance électrique transépithéliale ARNm : diminution VCAM-1, IL-6, augmentation ZO-1, ICAM-1, IL-8, gp130	Thompson <i>et al.</i> , 2016
HUVECs (ATCC CRL-2873) A549 (adénocarcinome pulmonaire)	2-4-8-16-32 µg/mL	24h	NM-400 & NM-402	Augmentation ROS Diminution glutathion intracellulaire Augmentation de l'adhésion	Cao <i>et al.</i> , 2016

A549 (adénocarcinome pulmonaire) BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	1, 5, 10, 20, 40 et 100 µg/mL	24h	MWCNT (l: 0,5-200 µm, d: 20-40 nm) MWCNT-COOH	Les MWCNT-COOH sont dans des vésicules cytoplasmiques Peu d'effet sur la viabilité cellulaire Dommages de la membrane Sécrétion IL-6 et IL-8	Ursini <i>et al.</i> , 2016
Macrophages de péritoine de souris (J774) Cellules épithéliales alvéolaires de type II de souris (LA-4)	7,5-30 µg/cm <sup>2</sup>	24h	NM-400 NM-402	Stimulation indirecte de la différenciation cellulaire Stimulation directe de la prolifération des fibroblastes Activation ERK1/2 (induite par le PDGF et TGFβ)	Vietti <i>et al.</i> , 2016
RPMC (Cellules mésothéliales de péritoine de rat)	10 µg/cm <sup>2</sup>	24h	NT50 (l: 10 µm, d: 50 nm) NT100 (l: 8 µm, d: 80 nm) NT150 (l: 6 µm, d: 150 nm) NT-Tngl (l: 3 µm, d: 15 nm)	Cytotoxicité avec NT50	Wang <i>et al.</i> , 2016
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	5-350 µg/cm <sup>2</sup>	24-48h	XNRI MWNT-7, lot no. 05072001K28	Cassures ADN Pas de micronoyaux Dommages des chromosomes	Catalan <i>et al.</i> , 2016
Culture primaire de macrophages de souris	25 µg/mL	6h	MWCNT-2 (l: 0,5-2 µm, d:10-20 nm) MWCNT-30 (l: 10-30 µm, d:10-20 nm)	La fonctionnalisation augmente l'insertion dans les cellules (RAW264.7) Augmentation IL-6 et Hmox	Bai <i>et al.</i> , 2016
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	1-10-20 µg/mL	4 semaines	NM-403	Augmentation ROS (faible dose) Pas de dommages à l'ADN Augmentation micronoyaux Transformation cellulaire (CTA)	Vales <i>et al.</i> , 2016
V79 (cellules de poumons de hamster)	0,12-12 µg/cm <sup>2</sup>	24 h, 48 h, ou 72 h	NM-401	Absorption cellulaire Production de ROS Genotoxicité	Rubio <i>et al.</i> , 2016

RAW264.7 (macrophages murins) A549 (adénocarcinome pulmonaire)	10–80 µg/cm <sup>2</sup>	24 h, 48 h, et 72 h	CNT1 (l: 10-30 µm, d: 60-100 nm) O-CNT1 (l: 10-30 µm, d: 60-100 nm) CNT2 (l: 10-30 µm, d: 40-60 nm) O-CNT2 (l: 10-30 µm, d: 40-60 nm) CNT3 (l: 10-30 µm, d: 20-40 nm) O-CNT3 (l: 10-30 µm, d: 20-40 nm) NM-401 (l: 2-6 µm, d: 40-90 nm)	Diamètre > 40 nm : Pas de toxicité Diamètre 15-40 nm : Peu de toxicité La fonctionnalisation modifie l'état d'agglomération	Allegri <i>et al.</i> , 2016
NIH-3T3 (Fibroblastes embryonnaires de souris)	1, 5, 10, 50 et 100 µg/mL	24, 48h	COOH-MWCNT (l: 0,5-2 µm, d: 10–20 nm)	Baisse viabilité Augmentation des protéines d'adhésion	Zhao <i>et al.</i> , 2016
TT1 (Culture primaire cellules épithéliales alvéolaires humaines)	1–30 µg/mL	24h	non-fMWCNT (l: 300 nm) p(4VP)-MWCNT (l: 700 nm)	Pas de cytotoxicité Absorption cellulaire Altération de l'intégrité de la barrière	Ruenraroengsak <i>et al.</i> , 2016
A549 (adénocarcinome pulmonaire) HBEpC (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0,5, 1, 2 µg/mL	8h	CNT-S (l: 1-2 µm, d: 20-40 nm) CNT-L (l: 5-15 µm, d: 20-40 nm)	Cytotoxicité Adduits ADN Endocytose des MWCNT Genotoxicité	Hiraku <i>et al.</i> , 2016
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	5,5, 11, 22 et 44 µg/mL	96h	MWCNT (l: 1,12 µm, d: 67 nm)	Transition épithélio-mésenchymateuse Activation de Akt/GSK-3β et SNAIL-1 Sécrétion de TGFβ	Polimeni <i>et al.</i> , 2016
A549 (adénocarcinome pulmonaire) BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0-78 µg/mL	48h et 8 jours	NM-400 NM-401 NM-402 NM-403	48h: Cytotoxicité du NM-401 8j: Cytotoxicité de tous les MWCNT Pas de dommages à l'ADN Micronoyaux (NM-401 et NM-402) La longueur influence la génotoxicité	Louro <i>et al.</i> , 2016

CHL/IU (cellules de poumons de hamster)	0,31 - 5000 µg/mL	45h	CTa (l: 5,7 µm, d: 91 nm) - droit CTb (l: 3,6 µm, d: 144 nm) - droit CTc (l: 4,0 µm, d: 65 nm) - incurvé CTd (l: 4,2 µm, d: 63 nm) - incurvé CTe (l: 8,3 µm, d: 2300 nm) - incurvé/aggrégé CTf (l: 3,3 µm, d: 2300 nm) - incurvé/aggrégé CTg (l: 3,3 µm, d: 2300 nm) - incurvé/aggrégé	La forme des MWCNT impacte la polyploïdie des cellules Probablement pas d'interaction directe entre les MWCNT et l'ADN	Sasaki <i>et al.</i> , 2016
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	20-50 µg/mL	6 ou 24h	MWCNT (l: 2,24 ± 1,56 µm, d: 13,22 ± 2,94 nm)	Augmentation TSP-1 Diminution MiR-1 Relation entre TSP-1, MWCNT et le TGFβ Augmentation MMP10, IL-6 et IL-1β	Pacurari <i>et al.</i> , 2017
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	20 ou 100 µg/mL	48h	MWCNT (l: 2,24 ± 1,56 µm, d: 13,22 ± 2,94 nm)	Augmentation TGFβ1, Col3A, MMP9, MMP12, NF-κB Wound Healing	Pacurari <i>et al.</i> , 2017
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	40 µg/mL	24, 48 et 72h	NM-400 Nanocyl, Belgique (l: 5 µm, d: 30 nm)	Augmentation de l'activité de réparation de l'ADN Diminution des la longueur des télomères	Borghini <i>et al.</i> , 2017
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	1 mg/mL	24h	MWCNTp (l: 0,5-2 µm, d: 8-15 nm) MWCNT-COOH MWCNT-OH	La fonctionnalisation de surface diminue le potentiel toxique Modification de l'expression de gènes (métabolomique et méthylation de l'ADN)	Chatterjee <i>et al.</i> , 2017
MmdM (macrophages issus de souris)	0-12,5-25,50 µg/mL	4h	MWCNT (l: 5-10 µm, d: 20-30 nm)	Activation NLRP3 (par Lysosome) LMP : Lysosome membrane perméabilisation	Jessop <i>et al.</i> , 2017
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	50 µg/mL	3 et 48h	pMWCNT (l: 10-20 µm, d: 15-30 nm) MWCNT-COOH (l: 200-1000 nm, d: 15-03 nm)	Prouction de ROS Fonction mitochondriale altérée Dommages à l'ADN	Visalli <i>et al.</i> , 2017

Macrophages dérivés de moelle de souris	10, 50 et 100 µg/mL	2h	MWCNT (l: 10-30 µm, d: 10-20 nm)	Augmentation MMP10, IL-6, IL-1b	Vandivort <i>et al.</i> , 2017
E10 (cellules épithéliales alvéolaires murines)	0, 5, 10, 25, 50 et 100 µg/mL	24h	MWCNT (l: 0,5-40 µm)	Fonctionnalisation influence l'induction de voies de signalisation Voies mTOP/EIF4/p70S6K Sécrétion IL-1b Dysfonctionnement mitochondrial	Hilton <i>et al.</i> , 2017
RAW264.7 (macrophages murins)	50µg/mL	24h	c-MWCNT (l: 0,3-1,5 µm, d:926-945 nm)	Augmentation de PLC et recrutement des macrophages via la cascade de signalisation des canaux PLC/IP3/CRAC.	Li <i>et al.</i> , 2017
SAEC (petites cellules épithéliales bronchiques)	0,06 µg/cm <sup>2</sup>	6-10 semaines	pMWCNT (l: 1-12 µm, d: 13-18 nm) MW-COOH (l: 1-12 µm, d: 13-18 nm) MW-NHx (l: 1-12 µm, d: 13-18 nm)	Transformation en cellules pré-néoplasiques Augmentation prolifération, invasion	Stueckle <i>et al.</i> , 2017
Épithélium bronchique reconstitué humain	10 µg/cm <sup>2</sup> pendant 5 semaines (5j/semaine)	1-3-5 semaines	MWCNTs (Cheaptubes Inc., Grafton, VT)	Pas de cytotoxicité Pas de modification de morphologie Augmentation de la clairance muco-ciliaire	Chortarea <i>et al.</i> , 2017
Mélanocytes concancéreux ( <i>in vivo</i> )	0,05-0,1-0,2-0,4 µg/mL	5-60 min	MWCNT (Sigma, Chemical Co. (St. Louis, MO, USA))	Production de ROS Dommages de la mitochondrie	Naserzadeh <i>et al.</i> , 2017
HBEC-3KT (Cellules épithéliales bronchiques humaines)	0,96 et 1,92 µg/cm <sup>2</sup>	26 semaines	NM-400 NM-401	Baisse prolifération Pas de transformation (NM-401) Formation de colonies après 3 mois (NM-400)	Phuyal <i>et al.</i> , 2017
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	10 - 20 mg/mL	4 semaines	NM-401	Hypométhylation de sites CpG Enrichissement sur le chromosome X Concernant majoritairement les marques H3K9me3	Sierra <i>et al.</i> , 2017
MeT-5A (cellules mésothéliales pleurales)	0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 et 40 µg/cm <sup>2</sup>	0-24-48-72h	MWCNT (l: 2-10 µm, d: 120-280 nm)	Réponse dose/temps dépendante Pas de prolifération Genotoxicité Perturbation de la mobilité cellulaire	Ju <i>et al.</i> , 2017
THP-1 (macrophages humains)	0-6,2-12,5-18,7-25-31,2 µg/cm <sup>2</sup>	6h	MWNT-7, lot #061220-31	Cytotoxicité Stress oxydant Réponse dépendante de l'activation de l'inflammosome NLRP3	Kodali <i>et al.</i> , 2017
Cellules épithéliales bronchiques de donneurs humains	1 µg/cm <sup>2</sup>	24h (+ 28 jours en ALI)	MWCNT (l: 0,5-4 µm, d: 10-30 nm)	Réduction des battement des cellules ciliées Perturbation des microtubules Expression de marqueurs de différenciation mucociliaire non affectés par le traitement	Snyder <i>et al.</i> , 2017

THP-1 (macrophages humains) A549 (adénocarcinome pulmonaire)	50 µg/mL	24h	MWCNT (l: 10-30 µm, d: 20-30 nm) fonctionnalisés ou non	Bioactivité des MWCNT diminue avec l'augmentation de la carboxylation des MWCNT	Hamilton <i>et al.</i> , 2018
HBEC-3KT (cellules épithéliales bronchiques humaines)	1,92 et 0,96 µg/cm <sup>2</sup>		NM-400 (l: 0,84 µm, d: 11 nm)	Augmentation ROS Pas de dommages à l'ADN Protéines anti/pro-apoptotiques Pas de modification de la méthylation globale de l'ADN	Phuyal <i>et al.</i> , 2018
16 HBE (cellules épithéliales bronchiques humaines)	25 et 100 µg/mL	1 et 24h	NM-400 (l: 0,84 µm, d: 11 nm)	Modification de la méthylation sur des promoteurs spécifiques (altération expression génique) Promoteurs concernés: ATM, p21, CDK4, TNFr, TRAF2, NFκB, IL-1b, IL6, CXC2. Activation des voies de signalisation : p53/DNA damage, apoptose, PI3K-AKT/MAPK Mesure des MWCNT dans les cellules	Oner <i>et al.</i> , 2018
RAW264.7 (macrophages murins)	20 à 80 µg/mL	24h	MWNT-7	Production d'IL-1b et TNF Production de ROS Dommages à l'ADN	Fukai <i>et al.</i> , 2018
HBE (cellules épithéliales bronchiques humaines)	2.5, 5 et 25 µg/mL	24h	NM-400	Pas de modification de méthylation globale de l'ADN Modulation de la méthylation de gènes en relation avec la voie p53, réparation aux dommages à l'ADN et cycle cellulaire	Ghosh <i>et al.</i> , 2018
L5178Y/Tk+/-3.7.2C (Cellules de lymphome de souris)	0.01, 1, 10, 100 et 250 µg/mL	24h	MWCNT (l: 0,5-2 µm, d: 10-20 nm) MWCNT-COOH (l: 0,5-2 µm, d: 30-50 nm) MWCNT-NH2 (l: 55 µm, d: 30-50 nm)	Peu d'effets cytotoxiques Mutations génétiques	Demir <i>et al.</i> , 2018
THP-1 (macrophages humains) A549 (adénocarcinome pulmonaire) HUVECs (ATCC CRL-2873)	8, 32 et 128 µg/mL	24h	XFM19 (pristine) XFM21 (carboxylé)	Modulation de l'expression de gènes du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie	Chang <i>et al.</i> , 2018

RAW264.7 (macrophages murins)	10-100µg/mL	6h	S-CNT short (l: 1,7 µm, d: 26 nm) SF-CNT short functionalized (l: 1,6 µm, d: 25 nm) L-CNT long (l: 6,4 µm, d: 24 nm) LF-CNT long functionalized (l: 9,2 µm, d: 25 nm)	Blocage de l'autophagie Dysfonction lysosomale Baisse d'expression de SNAPIN	Cohignac <i>et al.</i> , 2018
MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humains) MeT-5A (cellules mésothéliales pleurales) Modèle 3D: THP-1 (macrophages humains) A549 (adénocarcinome pulmonaire) MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humains)	0-8-32-182 µm/mL	24h	XFM19 (l: 10-30 µm, d: 20-30 nm) XFM21 (l: 10-30 µm, d: 20-30 nm)	Prolifération des fibroblastes et des cellules mésothéliales	Liao <i>et al.</i> , 2018
THP-1 (macrophages humains) A549 (adénocarcinome pulmonaire) MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humains)	10µg/cm <sup>2</sup>	5 jours	Mitsui-7 (l: 5,66 µm, d: 60 nm)	Enrichissement des protéines des voies de signalisation NRF2 et stress oxydant	Hilton <i>et al.</i> , 2018
THP-1 (macrophages humains) A549 (adénocarcinome pulmonaire) MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humains)	5, 10, 20 µg/mL	24, 96h	Mitsui-7 (l: 5,66 µm, d: 60 nm)	Interaction des MWCNT avec les 3 types cellulaires Pas de cytotoxicité (LDH) Augmentation GSH (24h) Relargage IL-1b Etude du potentiel pro-fibrotique des MWCNT (TGFb, PDGF, ONP)	Chortarea <i>et al.</i> , 2018
WI38-VA13 (fibroblastes pulmonaires humains)	1 µg/mL	24h	XNRI MWNT-7, Mitsui & Company (Tokyo, Japan)	Différenciation induite des myofibroblastes dans les cultures 2D et 3D Les rapports d'aspect les plus bas produisent les effets les plus importants Processus fibrotiques matriciels induits par les NTC	Hindman <i>et al.</i> , 2018

RAW264.7 (macrophages murins)	10-100 µg/mL	24-48h	MWCNT (l: 10 µm, d: 10-15 nm)	Absorption cellulaire Inflammation L'état d'agrégation influence la toxicité	Kuroda <i>et al.</i> , 2018
A549 (adénocarcinome pulmonaire) MRC-9 (fibroblastes embryonnaires humains)	0,315, 3,15 et 31,5 µg/cm <sup>2</sup>	24h	MWCNT (l: 1-2 µm, d: 10-30 nm)	Altération des fonctions ribosomales, des mécanismes de réparation de l'ADN. Induction des marqueurs de toxicité POC3, RBP4 et INS	Ndika <i>et al.</i> , 2018
Cellules épithéliales bronchiques humaines (primaires)	3 µg/mL	5 jours	MWCNT (100-1000 nm, d: 30-50 nm)	Dysfonctionnement mitochondrial qui conduit à la mitophagie	Snyder <i>et al.</i> , 2019
HUVECs (ATCC CRL-2873)	0-4-8-16-32-48- 64 µg/mL	24h	XFM19 XFM20 XFM21	Baisse viabilité cellulaire Absorption des MWCNT Production de ROS Réduction de BCL-2 Induction Caspases 3/8 Cytotoxicité	Sun <i>et al.</i> , 2019
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines) SAEC (petites cellules épithéliales pulmonaires)	0,024-2,4 µg/mL	24h	MWCNT-7	Aberrations mitotiques (mitoses multi- et monoploïdes) Centrosomes fragmentés Aneuploïdie importante	Siegrist <i>et al.</i> , 2019
A549 (adénocarcinome pulmonaire) THP-1 (macrophages humains) NR8383 (macrophages de rat)	1, 10, ou 100 µg/mL	24h	MWCNT-7 (l: 0,5 µm, d: 74 nm) MWCNT-B (l: 5,2 µm, d: 176 nm)	Production de cytokines (IL-8) Phagocytose La toxicité du MWCNT-7 est plus importante	Horie <i>et al.</i> , 2019
THP-1 (macrophages humains)	0-4-8-16-32-48- 64 µg/mL	24h	p-MWCNT (pristine) (l: 1,4 µm, d: 27 nm) h-MWCNT (hydroxylé) (l: 1,3 µm, d: 26 nm) c-MWCNT (carboxylé) (l: 1,3 µm, d: 25 nm)	Internalisation Sécrétion de cytokines (IL-8) Accumulation de lipides Stress du réticulum endoplasmique Augmentation de l'expression de CD36 et MSR1	Long <i>et al.</i> , 2019

NR8383 (macrophages de rat)	0-4-8-16-20-25- 75-100-200 µg/cm <sup>2</sup>	16-24h	NM-400 NM-401 NM-402 NM-403	Cytotoxicité (NM-401) Induction de migration cellulaire (MWCNT) Médiateurs de l'inflammation (CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL3, IL1RA (IL1RN), CSF1, GDF15 et TNFα) Différence d'effets entre NM-401 et NM-403	Westphal <i>et al.</i> , 2019
RAW264.7 (macrophages murins)	1-100 µg/cm <sup>2</sup>	24 h, 48 h, et 72 h	NM-401 (l: 4 µm, d: 67 nm) NM-400 NM-402 (l: 846–1372 nm, d: 11 nm)	Baisse viabilité cellulaire (NM-401) Activité phagocytaire réduite (NM-401) La forme et la longueur des MWCNT influence leur toxicité	Di Cristo <i>et al.</i> , 2019
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	4 µg/cm <sup>2</sup>	72h	MWCNT (l: 10-50 µm, d: 8-15 nm)	Induction de l'EMT Implication de SIRT6 dans l'induction de l'EMT SIRT6 inhibe l'EMT induite par les MWCNT via la voie TGFB1/Smad2	Chen <i>et al.</i> , 2019
Co-culture SAEC , cellules endothéliales	1,2 µg/ml	6-24h	MWCNT-7, lot # 05072001 K28	Induction de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, réponse immunitaire et inflammation. Réponse inflammatoire	Snyder- Talkington <i>et al.</i> , 2019
16HBE14o- (cellules épithéliales bronchiques humaines)	25 et 100 µg/mL	24h	NM-400	Hypométhylation de l'ADN (cytosines) Hypométhylation globale de l'ARN (adénosine) Diminution de la méthylation de CDKN1A Hyperméthylation de l'ADN de au niveau de TRAF2	Emerce <i>et al.</i> , 2019
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 et 256 µg/mL 32, 64 et 128 µg/mL	48h	F-MWCNTs (l: 1,2–5,7 µm, d: 13–29 nm)	Absorption des MWCNT Baisse de la viabilité cellulaire Production de ROS Apoptose Production de 8-OHdG Stress oxydant	Rezazadeh Azari <i>et al.</i> , 2019
NR8383 (macrophages de rat)	2,5, 5, 10, 20, 40 et 80 cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup>	24h	NM-403	Cytotoxicité Inflammation (Nfkb, Tnf-α, Il-6 and Il-1β)	Nahle <i>et al.</i> , 2019
16HBE14o (cellules épithéliales bronchiques humaines)	2,5 et 25 µg/mL	24h	MWCNT (l: 10-30 µm, d: 20-30 nm)	Induction de l'autophagie Augmentation de BCL-2 (anti-apoptotique) Diminution de la Caspase 3/7 Surexpression de la Caspase 3/7	Ghosh <i>et al.</i> , 2019
A549 (adénome pulmonaire)	2 µg/mL	36 jours	pMWCNT (l: 10-20 µm, d: 15-30 nm) MWCNT-COOH (l: 200-1000 nm, d: 15-03 nm)	Production de ROS Dommages de la mitochondrie	Visalli <i>et al.</i> , 2019

J774A.1 (macrophages murins) WI38-VA1 (fibroblastes pulmonaires humains)	2.5 µg/mL	24h	M-LS Sigma (698,849) (l: 10 µm, d: 12 nm) M-IM Sigma (773,840) (l: 3-6 µm, d: 10 nm) M-SS Sigma (755,117) (l: 1 µm, d: 9,5 nm) M-SR Mitsui (MWNT-7) (l: 3,86 µm, d: 49 nm)	Induction de IL-1B mRNA et protéine Activation de l'inflammasome (NLRP3) Production de ROS Transformation	Hindman et Ma <i>et al.</i> , 2019
LP9 c (cellules mésothéliales de péritoine humain)	5 µg/cm <sup>2</sup>	24h	MWCNT1 (Co) (l: 7,91 µm, d: 37,25 nm) MWCNT2 (Fe) (l: 10,24 µm, d: 40,25 nm) MWCNT3 (Fe) (l: 9,30 µm, d: 85 nm) MWCNT3a (Fe) (l: 9,30 µm, d: 62,25 nm) MWCNT5 (Fe) (l: 9,30 µm, d: 17,24 nm)	Sénescence Inhibition de la division cellulaire Déplétion de LMNB1 Dommages à l'ADN (γH2A.X) MWCNT (longs et épais)- sénescence cellulaire prématurée	Reamon- Buettner <i>et al.</i> , 2020
THP-1 (macrophages humains)	0, 2, 4, 8, 16 et 32 µg/mL	24h	XFM4 WFM22 XFM34 Longueur similaire mais diamètre XFM4 < XFM22 < XFM34	Cytotoxicité dépendante du diamètre Accumulation de lipides Production de ROS Rétention dans les macrophages Activation de la voie PPAR	Yang <i>et al.</i> , 2020
THP-1 (macrophages humains) Met5A (cellules mésothéliales)	0,1 µg/mL pendant 3 mois	1 jour à 3 mois	MWCNT (l: 10-20 µm, d: 30-50 nm)	Sécrétion de IL-1B (Macrophages) Sécrétion de cytokines IL-8, TNF-α, et IL-6 (Cellules mésothéliales) Prolifération/Migration/Invasion Transformation cellulaire (via inflammation) La voie NF-κB/IL-6/STAT3 active la transformation maligne	Huang <i>et al.</i> , 2020
THP-1 (macrophages humains)	1-10-50 µg/mL	3-24h	MWCNT (l: 5,15 ± 2,29 µm, d: 11,7 ± 6,50 nm) MWCNT (l: 4,52 ± 2,06 µm, d: 9,77 ± 4,32 nm)	Induction de la libération d'ATP et de la sécrétion d'IL-1b dépendante de l'axe ATP-P2X7R La libération de l'ATP est médiée par l'activation de l'inflammasome NLRP3 via P2X7R	Fan <i>et al.</i> , 2020

NR8383 (macrophages de rat)	MW1-4: 1-100 µg/mL; MW5-6: 0,5-50 µg/mL	24h	MW1 (l: -, d: 70 mn) MW2 (l: -, d: 44 mn) MW3 (l: < 10 µm, d: 10-15 mn) MW4 (l: 1,5 µm, d: 9,5 mn) MW5 (l: 150-300 µm, d: 5-20 mn) MW6 (l: 150-300 µm, d: 5-20nm)	MWCNT courbés: phagocytose, sécrétion de ROS, baisse survie cellulaire MWCNT rigides: sécrétion de ROS Pas de mutagénicité La diamètre contribue à la toxicité	Fujita <i>et al.</i> , 2020
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0–15 µg/cm <sup>2</sup> (0–24 µg/mL)	24h	MW1 (l: 0,80 µm, d: 12 nm) MW2 (l: 1,79 µm, d: 14 nm) MW3 (l: 1,28 µm, d: 19 nm) MW4 (l: 1,84 µm, d: 18 nm) MW5 (Mitsui-7) (l: 5,62 µm, d: 63 nm) MW6 (l: 3,42 µm, d: 25 nm)	Micronoyaux, Cytotoxicité	Fraser <i>et al.</i> , 2020
A549 (adénome pulmonaire)	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	24h	Mitsui-7 (Mitsui and Co, Lda. Ibaraki, Japan)	Baisse survie cellulaire Activation des voies AMPK, FoxO, TGF-β et Hippo Le MWCNT-7 affecte le cytosquelette d'actine, la protéolyse médiée par l'ubiquitine les récepteurs de l'ECM	Ventura <i>et al.</i> , 2020
A549 (adénome pulmonaire)	12,5, 50 et 100 µg/mL	30 min, 1 et 3h	MWCNT (l: -, d: 20-50 nm)	Potentiel cancérigène des MWCNT Cytotoxicité plus élevée pour le MWCNT fonctionnalisés Dommages de la membrane cellulaire Augmentation pro-inflammatoires leucotriènes (LTB4) et PGE2	Kyriakidou <i>et al.</i> , 2020
J774A.1 (macrophages murins)	2,5 µg/mL	1, 2 et 3 jours	Mitsui-7, XNRI 1, lot #-0507 2001K28, Tokyo, Japan	Polarisation temps-dépendante des macrophages M1 Influx de neutrophiles induite par les MWCNT Polarisation des macrophages Activation des voies ALOX et LMs	Lim <i>et al.</i> , 2020
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, et 256 µg/mL	48h	L-MWCNT (l: 2,11 ± 7,2 µm, d: 8-26 nm) S-MWCNT (l: 0,1 ± 7,14 µm, d: 7-24 nm)	Production de ROS Cytotoxicité Cytotoxicité plus importante avec S-MWCNT	Rezazadeh Azari <i>et al.</i> , 2020
A549 (adénome pulmonaire) THP-1 (macrophages humains)	6,25, 12,5, 25, 50, et 100 mg/cm <sup>2</sup>	24h et 48h	Mitsui-7 (Mitsui and Co, Lda. Ibaraki, Japan)	EMT Résistance à l'apoptose Augmentation micronoyaux (co-culture) Cytotoxicité/Génotoxicité	Ventura <i>et al.</i> , 2020

16 HBE (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0,25 µg/mL	4 semaines	NM-400	Incorporation dans le noyau Hypométhylation au niveau d'un site CpG et d'une région de promoteur de gène Pas de modification globale de la méthylation de l'ADN après une période de récupération de 4 semaines	Oner <i>et al.</i> , 2020
THP61/THP-1-KO (macrophages) BNM (monocytes sanguins)	5-15-30-60 µg/mL	24 h, 48 h et 72 h	MWCNT Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA, Ref# 659258)	Accumulation dans le cytoplasme Activation de l'inflamosome NLRP3	Svadlakova <i>et al.</i> , 2020
NR8383 (macrophages de rat)	2,5, 5, 10, 20, 40, 80 cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> de NM403 3, 5,5, 11, 21,5, 43, 86 cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> de NRCWE-042 4, 7,5, 15, 30, 60, 120 cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> de NRCWE-049	24h	NM-403 (l: 400 nm; d: 12 nm) NRCWE-042 (l: 723 nm; d: 21 nm) NRCWE-049 (l: 731 nm; d: 14 nm)	Interférence avec la traduction des protéines ribosomiques, du cytosquelette Réponse inflammatoire Les MWCNT fonctionnalisés modifient la voie mTOR Effets et voies de signalisation différentes en fonction de la fonctionnalisation du MWCNT	Nahle <i>et al.</i> , 2020
BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	EC <sub>50</sub>	24h	Prist-SS (l: 0,5-2 µm, d: 8-15 nm) COOH-SS (l: 0,5-2 µm, d: 8-15 nm) OH-SS (l: 0,5-2 µm, d: 8-15 nm) OH-LS (l: 10-30 µm, d: 8-15 nm) OH-LB (l: 10-30 µm, d: 20-30 nm)	Stress du réticulum endoplasmique MAPK activation Apoptose Activation de IRE1alpha-XPB1 (JNK) L'intensité de la réponse dépendant de la fonctionnalisation du MWCNT	Chatterjee <i>et al.</i> , 2020
MeT-5A (cellules mésothéliales pleurales)	10 µg/cm <sup>2</sup> (48h/passage) pendant 1 an	1 an	MWCNT (Aldrich 659,258) (l: 5-9 µm, d: 110-170 nm)	Transformation néoplasique La voie miR 221-annexine a1 est impliquée dans la régulation de la migration cellulaire des cellules transformées	Ju <i>et al.</i> , 2021

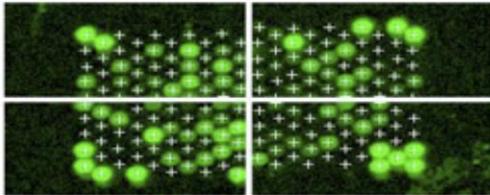
A549 (adénome pulmonaire) THP-1 (macrophages humains)	0-10-40-80- 160 µg/mL	6 et 24h	NRCWE-040a (l: 519 nm, d: 22 nm) NRCWE-041a (l: 1005 nm, d: 27 nm) NRCWE-42a (l: 723 nm, d: 30 nm) NRCWE-006 (l: 5730 nm, d: 74 nm) NM-400 (l: 847 nm, d: 11 nm) NM-401 (l: 4048 nm, d: 67 nm) NM-403 (l: 443 nm, d: 12 nm)	Expression de IL-8 (tous les MWCNT) NM-401 et NRCWE-006 causent la réponse inflammatoire la plus forte Génotoxicité Concordance entre les résultats obtenus un vitro (A549 et THP-1) et les cellules du LBA de souris exposées aux MWCNT.	Di Ianni <i>et al.</i> , 2021
Beas-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	0,125-0,25-0,5- 1 µg/cm <sup>2</sup>	1-6 semaines (+ 4 semaines sans traitement)	Mitsui-7 NM-403	Micronoyaux Mitoses anormales Modification de morphologie Induction d'une EMT Effets plus importants avec le Mitsui-7 Retour à un phénotype partiellement après 4 semaines de récupération Augmentation de ROS Inhibition de la prolifération cellulaire Augmentation de p21 et de mla senescence Potentialisation des effets par des pro-fibrotiques (TGFb)	Barthel <i>et al.</i> , 2021
Beas-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	5 µg/mL	72h	MWCNT (l: 10-30 µm, d: < 8nm)	Augmentation de ROS Inhibition de la prolifération cellulaire Augmentation de p21 et de mla senescence Potentialisation des effets par des pro-fibrotiques (TGFb)	Lucas <i>et al.</i> , 2021
FE1-MML (cellules épithéliales de poumons de souris FE1- MutaTMMouse) Macrophages alvéolaires de souris (culture primaire de macrophages provenant du LBAde souris C57BL/6J) Beas-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines)	2,5–160 mg/mL	3h, 24h et 10 semaines	MWCNT-7 NM-401 NM-403	Dommages à l'ADN (comet) Augmentation des ROS Augmentation de la longueur des télomères (long terme)	Solling Wils <i>et al.</i> , 2021
	0, 25, 50, et 100 mg/mL	6, 12, et 24h	XFM22 (l: 0,5-2µm) XFS05 (l: 10-30 µm)	L'exposition aux NTC favorise la polarisation des macrophages vers le phénotype M2, qui facilite l'EMT par la sécrétion de TGFb	Zhang <i>et al.</i> , 2021

NRM2 (cellules mésothéliales de rat)	0,02 µg/cm <sup>2</sup>	45 semaines 85 passages	tMWCNT (Helix Material Solutions Inc. (Richardson, TX) rMWCNT (XRNI MWNT- 705072001 K28)	rMWCNT : transformation en cellules pré- néoplasiques et augmentation de l'ARNm de l'osteospondine OPN tMWCNT: pas de transformation ni OPN Après 1 an, augmentation de la prolifération cellulaire Migration/Invasion Gènes différenciellement exprimés (2878) Modification de l'expression de PIK3R3、WNT2B 、VANGL2、ANXA1	Sridharan <i>et al.</i> , 2021
MeT-5A (cellules mésothéliales pleurales)	10 µg/cm <sup>2</sup> (48h/passage) pendant 1 an	1 an	MWCNT (Aldrich 659,258) (l: 5-9 µm, d: 110-170 nm)		Ju <i>et al.</i> , 2021

## Annexe 4 : Détails du rapport de contrôle qualité extrait de Feature Extraction.

### 1- Validation de la position de la « grille » sur la puce

Spot Finding of the Four Corners of the Array

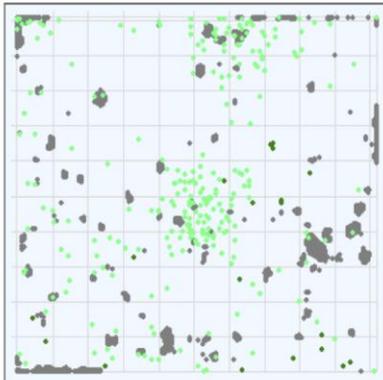


Grid Normal

Les 4 coins de la lame doivent être verts et attestent du bon positionnement de la grille sur la lame. En cas d'erreur, il est conseillé de recommencer l'extraction avec une autre grille.

### 3- Distribution spatiale des valeurs aberrantes

Spatial Distribution of All Outliers on the Array  
384 rows x 164 columns



# FeatureNonUnif (Green) = 19(0.03%)

# GeneNonUnif (Green) = 17 (0.029 %)

\*BG NonUniform  
\*Green FeaturePopulation

\*BG Population  
\*Green Feature NonUniform

S'il y avait des caractéristiques répétées représentant un gène ou qui n'étaient pas une aberration, aucune aberration génétique n'apparaîtrait.

### 2- « Outliers » ou valeurs aberrantes

	Feature Green	Local Background Green
Non Uniform	19	49
Population	256	1316

Si le rapport de contrôle qualité indique un nombre de valeurs aberrantes il convient alors de vérifiez l'étape d'hybridation/lavage.

### 4- Statistiques sur les signaux nets

#### Net Signal Statistics

	Agilent SpikeIns:	Green
# Saturated Features		0
99% of Sig. Distrib.		206165
50% of Sig. Distrib.		557
1% of Sig. Distrib.		22

#### Non-Control probes:

		Green
# Saturated Features		0
99% of Sig. Distrib.		48218
50% of Sig. Distrib.		52
1% of Sig. Distrib.		17

Le rapport de CQ utilise la plage du premier au 99<sup>ème</sup> centile comme indicateur de plage dynamique pour cette matrice.

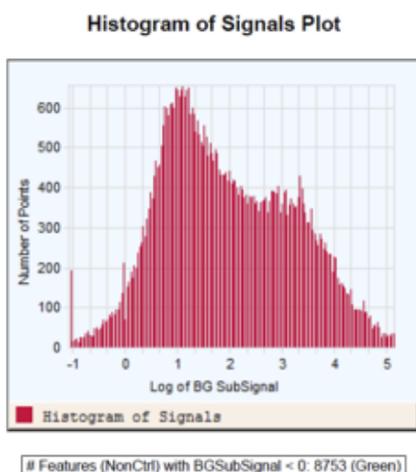
### 5- Statistiques sur les contrôles négatifs

#### Negative Control Stats

	Green
Average Net Signals	19.98
StdDev Net Signals	2.74
Average BG Sub Signal	-3.90
StdDev BG Sub Signal	2.66

Le tableau comprend la moyenne et l'écart type des signaux nets et des signaux d'arrière plan dans le canal vert. Il permet d'estimer le bruit de fond (saturation, valeurs aberrantes).

## 6- Histogramme, tracé des signaux



L'histogramme montre le niveau de signal et sa distribution.

## 7- Incrustations d'arrière-plan locales

### Local Bkg (inliers)

Green

Number	61660
Avg	30.72
SD	2.43

Les valeurs permettent de voir le signal moyen après que le bruit de fond et les valeurs aberrantes aient été retirées. Ces valeurs permettent de détecter des artefacts d'hybridation ou de lavage.

## 8- Ajustement de la surface avant-plan

### Foreground Surface Fit

Green

RMS_Fit	0.69
RMS_Resid	3.39
Avg_Fit	33.38

Les valeurs peuvent indiquer un décalage du scanner.

## 9- Ajustement multiplicatif de la surface

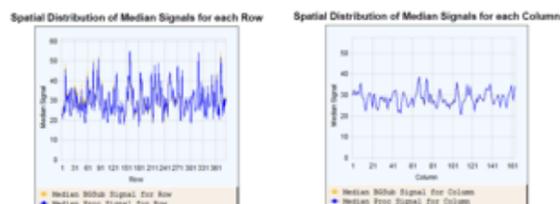
### Multiplicative Surface Fit

Green

RMS_Fit	0.04
---------	------

Les valeurs permettent d'observer des zones de brillance qui pourraient interférer avec les autres signaux.

## 10- Distribution spatiale par ligne/colonne



Il ne doit pas y avoir de différence entre les deux signaux.

## 11- Reproductibilité

### Reproducibility: %CV for Replicated Probes

Median %CV Signal (inliers)

Non-Control probes      Agilent SpikeIns  
Green                              Green

BGSubSignal	5.69	5.03
ProcessedSignal	3.76	3.65

Une valeur de %CV médiane inférieure indique une meilleure reproductibilité du signal à travers le microréseau.

## 13- Statistiques Spike-In

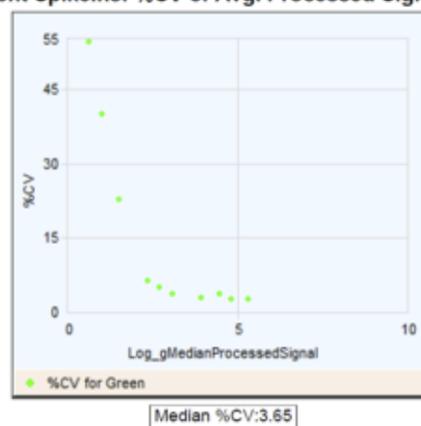
### Agilent SpikeIns Signal Statistics

Probe Name	Log(Relative Conc.)	Median(Log Proc. Sig.)	% CV	StdDev
(+)E1A_r60_3	0.30	0.61	54.41	0.19
(+)E1A_r60_a104	1.30	0.99	40.06	0.18
(+)E1A_r60_a107	2.30	1.52	22.79	0.10
(+)E1A_r60_a135	3.30	2.36	6.29	0.03
(+)E1A_r60_a20	3.83	2.68	5.00	0.02
(+)E1A_r60_a22	4.30	3.09	3.65	0.02
(+)E1A_r60_a97	4.82	3.92	2.90	0.01
(+)E1A_r60_n11	5.30	4.46	3.65	0.02
(+)E1A_r60_n9	5.82	4.79	2.56	0.01
(+)E1A_r60_1	6.30	5.29	2.67	0.01

Le tableau décrit les caractéristiques relatives au Spike-In.

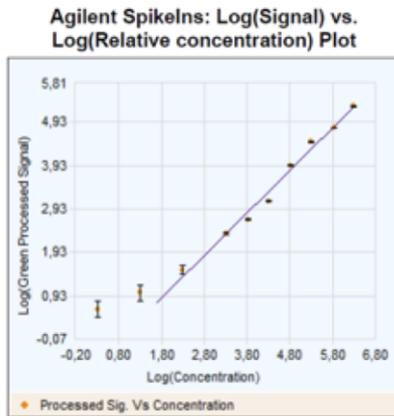
## 12- Sensibilité de détection

### Agilent SpikeIns: %CV of Avg. Processed Signal Plot



Le graphique permet de caractériser la sensibilité de la détection d'un signal faible par rapport à l'arrière-plan.

### 14- Linéarité du Spike-In



Une pente de 1, une interception de l'axe des y par 0 et un R<sup>2</sup> égal à 1 sont les valeurs idéales. Le coefficient de régression (R<sup>2</sup>) reflète la reproductibilité.

### 15- Linéarité du Spike-In

#### Agilent Spike-In Concentration-Response Statistics

Linear Range Statistics:

Low Signal	0.78
High Signal	5.83
Low Relative Concentration	1.70
High Relative Concentration	6.87
Slope	0.98
R <sup>2</sup> Value	0.99

Signal Detection Limit Statistics

Saturation Point	5.89
Low Threshold	0.56
Low Threshold Error	0.26
Spike-In Detection Limit	1.15

Permet de vérifier la présence de Spike, et de vérifier qu'elle soit concentration dépendante.

### 16- Validation de l'échantillon

#### Evaluation Metrics for GE1\_QCMT\_Jun14

Good (10)

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrcntFeatNonU...	0.03		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	19.98		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-3.90		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	2.66		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFil...	3.39		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSig...	3.76		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	3.65		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	0.98		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	1.15		0.01 to 2	<0.01 or >2

• Excellent • Good • Evaluate

Le contrôle qualité est validé à condition que l'ensemble des paramètres précédemment décrits et résumés dans ce tableau soient considérés d'excellente (vert) ou de bonne qualité (bleu).

**Annexe 5 : Fiche d'observation quotidienne des animaux.**

**FICHE D'OBSERVATION QUOTIDIENNE DES ANIMAUX**

Date	01/01	02/01	03/01	04/01	05/01	06/01	07/01	08/01	09/01	10/01	11/01	12/01	13/01	14/01
Aspect général (poils, posture, respiration...dans la cage)														
Poids (pesées selon procédure mise en place)														
Oreilles (grosseurs, aspect/couleur)														
Yeux (écoulement, aspect, pupille)														
Museau (écoulement, aspect/couleur)														
Dents														
Cou/ganglions (grosueur, lésion)														
Face ventral (grosueur, lésion)														
Face dorsale (grosueur, lésion)														
Pattes (grosueur, lésion)														
Zone urogénital (grosueur, aspect/couleur)														
Initial(s)														

**Remarques :**

## **Annexe 6 : Communications, Publication**

### **Communications**

#### Présentations orales :

**Assessment of the genotoxicity and markers of potential carcinogenicity of multiwalled carbon nanotubes in BEAS-2B cells.**

Hélène Barthel, Caroline Vion, Laurent Gaté, Athanase Visvikis, Carole Seidel

7th International Conference NANOSAFE 2020 – Virtual (France, Novembre 2020)

#### Posters :

**Les nanotubes de carbone vont-ils me transformer ? Les cellules s'inquiètent.**

Journée des doctorants INRS – Nancy (France, Mars 2019)

**Study of cellular transformation and carcinogenesis induced by carbon nanotubes.**

Journée des doctorants, Ecole Doctorale BioSE – Présentation en 180 secondes – Nancy (France, Novembre 2019)

**MWCNTs induced epithelial-mesenchymal transition of BEAS-2B cells.**

Hélène Barthel, Christian Darne, Laurent Gaté, Athanase Visvikis, Carole Seidel

EUROTOX 2021 Virtual Congress – Virtual (France, October 2021)

### **Publication**

#### Article :

Hélène Barthel, Christian Darne, Laurent Gaté, Athanase Visvikis, Carole Seidel. Continuous long-term exposure to low concentrations of MWCNTs induces an epithelial-mesenchymal transition in BEAS-2B cells. *Nanomaterials* (2021), 11, 1742.

<https://doi.org/10.3390/nano11071742>



## **Influence de paramètres physiques de nanotubes de carbone multi-parois sur leurs propriétés toxicologiques dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques. Rapprochement avec les effets pulmonaires chez le rat.**

À l'ère des nanotechnologies, l'utilisation des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) s'accroît. L'exposition par inhalation des salariés lors de procédés industriels soulève des inquiétudes quant à leurs effets nocifs pour la santé en raison de leurs propriétés physico-chimiques et de leur biopersistance. Ils peuvent aisément atteindre les voies respiratoires profondes et se déposer au niveau de l'épithélium pulmonaire. Cette thèse avait pour objectif d'évaluer l'influence du diamètre et de la longueur des MWCNT sur leurs effets toxiques. Dans une première approche, un modèle expérimental *in vitro* a été mis en place. Ainsi, des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) ont été traitées pendant 6 semaines consécutives avec deux MWCNT (0,125 à 1 µg/cm<sup>2</sup>) ayant des caractéristiques physiques différentes : NM-403 (court et fin) et Mitsui-7 (long et épais). Les cellules ont ensuite été maintenues en culture pendant 4 semaines supplémentaires sans traitement afin d'évaluer la réversibilité des effets. Dès la première semaine de traitement un effet génotoxique a été observé. Quatre à six semaines de traitement ont été nécessaires pour induire des changements de la morphologie des cellules, suggérant une conversion de l'état épithélial à l'état mésenchymateux. Cette transition a été confirmée par une diminution de l'expression de deux marqueurs épithéliaux (E-cadhérine et Claudine-1) et une expression accrue des marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, Vimentine et Fibronectine). Après 4 semaines sans traitement, la transition épithélio-mésenchymateuse précédemment induite était en partie réversible et le degré de réversibilité était dépendant du MWCNT. Dans une deuxième approche, la toxicité induite par les MWCNT a été évaluée chez des rats de génotype sauvage (WT) et hétérozygotes pour p53 (OGM). Suite à une instillation intratrachéale par semaine pendant 4 semaines consécutives de Mitsui-7 ou de NM-403, deux groupes ont été mis à mort 3 jours et 8 mois après la dernière instillation. À J3 une inflammation pulmonaire aiguë a été observée avec les deux MWCNT. De manière intéressante, l'inflammation a été persistante 8 mois après exposition au NM-403, alors qu'elle a été résorbée dans le groupe traité avec le Mitsui-7, de manière indépendante du génotype. Les analyses histopathologiques n'ont pas mis en évidence de développement de fibrose interstitielle typique. Cependant, ces analyses ont révélé un dépôt de collagène ainsi que la formation de granulomes 8 mois après exposition au Mitsui-7 et au NM-403.

Mots clés : Nanotubes de carbone, Génotoxicité, Transition épithélio-mésenchymateuse, BEAS-2B, rat transgénique hétérozygote p53<sup>+/-</sup>, Toxicité pulmonaire.

## **Influence of physical parameters of multi-wall carbon nanotubes on their toxicological properties in a model of bronchial epithelial cells. Association with lung effects in rats.**

In the era of nanotechnology, the use of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) is increasing. Inhalation exposure of workers during industrial processes concerns about their adverse health effects due to their physico-chemical properties as well as their biopersistence. They can easily reach the deep airways and deposit in the pulmonary epithelium. The aim of this thesis was to assess the influence of the diameter and length of MWCNT on their toxic effects. As a first approach, an *in vitro* experimental model was developed. Human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were treated for 6 consecutive weeks with two MWCNT (0.125 to 1 µg/cm<sup>2</sup>) having different physical characteristics: NM-403 (short and thin) and Mitsui-7 (long and thick). After treatment, the cells were cultured for 4 additional weeks without treatment to assess the reversibility of the effects. From the first week of treatment with MWCNT genotoxic effects have been observed. Four to six weeks of treatment were required to reveal changes in cell morphology, suggesting a conversion from epithelial to mesenchymal state. This transition was confirmed by a decrease in the expression of two epithelial markers (E-cadherin and Claudine-1) and increased expression of mesenchymal markers (N-cadherin, Vimentine and Fibronectine). After 4 weeks without treatment, we found that the previously induced epithelial-mesenchymal transition was partially reversible and that the degree of reversibility was dependent on the MWCNT. As a second approach, MWCNT-induced toxicity was evaluated in wild-type genotype (WT) and heterozygous rats for p53 (GMO). Following one intratracheal instillation per week for 4 consecutive weeks of Mitsui-7 or NM-403, two groups were euthanized after 3 days and 8 months after the last instillation. Three days post-exposure, acute pulmonary inflammation was observed with both MWCNTs. Interestingly, the inflammation was persistent 8 months after exposure to NM-403, whereas it was resolved in the group exposed to Mitsui-7, independently of the genotype. Histopathological analyses did not reveal any typical interstitial fibrosis. However, collagen deposition and granuloma formation were evident 8 months after exposure to both MWCNTs.

Key words: Carbon nanotubes, Genotoxicity, Epithelial-mesenchymal transition, BEAS-2B, heterozygous p53<sup>+/-</sup> rats, Pulmonary toxicity.