ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

présentée et soutenue publiquement par

Lucie ARMAND

le 1er décembre 2011

Spécialité : toxicologie

Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur les métalloprotéases, influence des paramètres physicochimiques

Directeur de thèse : **Jean-Claude PAIRON**
Codirecteur de thèse : **Sophie LANONE**

Jury

Mme Valérie CAMEL, Professeur, AgroParisTech	Présidente du jury
Mme Karine ANDREAU, Docteur, Université Paris Diderot- Paris 7	Rapporteur
M. Rémy MAXIMILIEN, Docteur, CEA	Rapporteur
M. Jean-Claude PAIRON, Professeur, Université Paris 12	Directeur de thèse
Mme Sophie LANONE, Docteur, INSERM	Codirecteur de thèse

AgroParisTech
INSERM U955 Equipe 04
Faculté de médecine, 8 rue du Général Sarrail, 94000 Créteil

A tous ceux qui renoncent à avoir un griffon comme animal de compagnie parce que leurs voisins ont l'esprit étroit.

Je dédie cette thèse à ma famille, en particulier Marguerite Berthelot, pour m'avoir mis entre les mains un article de Science et Avenir traitant des nanoparticules. Trugarez, mamm-gozh !

Sommaire

Remerciements……..IV
Liste des abréviations……..VII
Liste des figures……..X
Liste des tableaux……..XI

Introduction générale……...……...1

Etat actuel de la littérature……7
1) Nano-objets : Généralités……..……8
1.1) Les nano-objets……..……8
1.1.1) Définition……8
1.1.2) Origine des nano-objets……...10
1.1.3) Propriétés des nano-objets……...10
1.1.4) Applications présentes et futures……11
1.2) Le Dioxyde de Titane……12
1.2.1) Généralités……..12
1.2.2) Principales caractéristiques et applications ……14
1.3) Le Noir de Carbone……16
1.3.1) Généralités……..16
1.3.2) Principales caractéristiques et applications……16
1.4) Propriétés physicochimiques des nano-objets à visée industrielle…..……17
1.5) Voies potentielles de pénétration dans l'organisme……18
1.5.1) Exposition par ingestion……20
1.5.2) Exposition cutanée……..21
1.5.3) Exposition intraveineuse……..……21
1.5.4) Exposition respiratoire……22
1.5.4.1) Dépôt……22
1.5.4.2) Devenir des nano-objets déposés……..……24

2) Toxicité pulmonaire des NP de TiO_2 et de NC chez l'Homme……..……..27
2.1) Etudes épidémiologiques……27
2.1.1) Etudes épidémiologiques et TiO_2……..……...27
2.1.2) Etudes épidémiologiques et NC……28
2.2) Etudes in vitro……..……28
2.2.1) Effets de l'exposition au TiO_2 et au NC nanométriques……28
2.2.1.1) Cytotoxicité……28
2.2.1.2) Génotoxicité……30
2.2.1.3) Internalisation……31
2.2.2) Mécanismes pouvant expliquer les effets des NP de TiO_2 et de NC…..……33
2.2.2.1) Inflammation……33
2.2.2.2) Induction de stress oxydant……36
2.3) Etudes in vivo ……..……44
2.3.1) Modèles d'administration……...44
2.3.2) Cytotoxicité des NP de TiO_2 et de NC……..……..45
2.3.2.1) Cytotoxicité des NP de TiO_2 ……..……45
2.3.2.2) Cytotoxicité et NP de NC ……..……46
2.3.3) Induction d'une réponse inflammatoire par les NP de TiO_2 et de NC.……...46
2.3.3.1) Inflammation et NP de TiO_2 ……46
2.3.3.2) Inflammation et NP de NC ……47

2.3.4) Induction et aggravation de pathologies par les NP de TiO_2 et de NC……...48
2.3.4.1) Induction et aggravation de pathologies par les NP de TiO_2 ……..48
2.3.4.2) Induction et aggravation de pathologies par les NP de NC……49
2.4) Caractéristiques physicochimiques des nano-objets influant sur leurs effets biologiques….55
2.4.1) La taille……...55
2.4.2) La forme……..56
2.4.3) La variété cristalline……...56
2.4.4) La surface spécifique……..57
2.4.5) Le traitement de surface……57

3) La MMP-1……...…61
3.1) Généralités sur les MMP……..……61
3.1.1) Substrats des MMP et les composants de la Matrice extracellulaire……..61
3.1.2) Les MMP et leur fonction……...63
3.1.3) La MMP-12……65
3.1.3.1) Synthèse, structure et fonction……..65
3.1.3.2) Régulation……..66
3.2) La MMP-1……66
3.2.1) Structure……..66
3.2.2) Fonction……..67
3.2.3) Régulation de l'activité de la MMP-1……68
3.2.3.1) Régulation de l'activité de la MMP-1 via sa transcription……..68
3.2.3.2) Régulation de l'activité de la MMP-1 via son activation……69
3.2.3.3) Régulation de l'activité de la MMP-1 via sa compartimentalisation……69
3.2.3.4) Régulation de l'activité de la MMP-1 via des inhibiteurs……69
3.2.3) Pathologies associées à la régulation de l'activité des MMP……69
3.2.3.1) Fibrose……70
3.2.3.2) Emphysème……71

Matériels et méthodes……75
1) Caractérisation des particules……...…...76
1.1) Microscopie Electronique en Transmission……76
1.2) Analyse Dispersive en Energie (EDS)……..……77
1.3) Méthode Braunauer, Emmett et Teller (BET) ……77
1.4) Mesure du potentiel zêta ……..……78
1.5) Spectroscopie par corrélation de photons (SCP) ……..……79
1.6) Production per se de ROS : plasmide phiX174 RFI ……..……80
1.7) Evaluation de la présence d'endotoxines : test Limulus Amebocyte Lysate ……80

2) Culture cellulaire.……...82
2.1) Cellules ……82
2.1.1) Lignée cellulaire ……82
2.1.2) Fibroblastes primaires ……83
2.2) Exposition des cellules aux particules ……83

3) Etude *in vivo* ……...84
3.1) Animaux ……84
3.2) Exposition des animaux…… 84

4) Cytotoxicité……..……86
4.1) WST-1……86
4.2) Quantification de l'ADN ……..……87

5) Mesure de la production de ROS ……87

6) Etude de la transcription de gènes par RT-qPCR ……..……..88
6.1) Extraction des ARNm ……..……..88
6.1.1) A partir des cellules ……..……...88
6.1.2) A partir des poumons de rats ……..…….88
6.2) Transcription inverse ……..88
6.3) PCR……..88

7) Etude de l'expression protéique ……...91
7.1) Western-Blot……..91
7.1.1) Recueil des cellules ……91
7.1.2) Western Blot ……..91
7.2) Immunohistochimie……..92
7.3) ELISA……..93
7.4) Mesure de l'activité de la MMP-1 ……..94

8) Etude morphologique des cellules……94
8.1) Microscopie optique……..94
8.2) Microscopie électronique à transmission dans les cellules…….. 94

9) Analyses histologiques sur tissu pulmonaire ……...95
9.1) Inflammation pulmonaire ……..95
9.2) Emphysème……..95

10) Statistiques ……95

Résultats……95
Première étude……96
Deuxième étude……138

Discussion……177
1) Discussion méthodologique……..178
1.1) Modèle in vitro utilisé ……..……...178
1.2) Modèle in vivo utilisé ……..…178
1.2.1) Modèle d'emphysème ……..178
1.2.2) Mode d'exposition aux NP ……..179
1.3) Doses utilisées……..179
1.3.1) Doses utilisées *in vitro* ……179
1.3.2) Doses utilisées *in vivo* ……180
1.4) Particules utilisées……..……182

2) Discussion des résultats ……...183
2.1) Effet des NP sur l'expression des MMP ……..……184
2.2) Effet des NP sur les pathologies associées au remodelage matriciel ……...187
2.3) Effets de la modification des paramètres physicochimiques ……..……189
2.3.1) Effet de la taille ……189
2.3.2) Effet de la composition chimique ……189
2.3.3) Effet des autres facteurs physicochimiques des particules utilisées……190

Conclusion et perspectives……..191

Références bibliographiques……...195

Annexe……..212

Remerciements

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes, que je remercie sincèrement et à qui je souhaite le meilleur pour la suite.

A tout seigneur tout honneur, je commence par Jorge Boczkowski, qui m'acceptée dans son équipe en stage de master 2, puis en thèse dans l'équipe qu'il venait de monter à Créteil. Votre gentillesse et votre efficacité ont largement contribué à rendre ces 4 ans de travail commun très instructifs et très agréables pour moi.

Juste après Jorge, je voudrais remercier Sophie Lanone, qui s'est occupée de mon encadrement. C'est-à-dire qu'elle m'a appris quasiment tous les aspects du métier de chercheur, en me les expliquant avec une patience qui me laisse admirative. Si j'ai progressé durant ma thèse, c'est en grande partie grâce à toi, Sophie. Merci pour cela, et merci pour la balade en voiture dans une tempête de neige, dans les Rocheuses.

Je voudrais remercier Jean-Claude Pairon, dont l'esprit affuté a souvent permis d'améliorer mes protocoles ou de mieux expliquer mes résultats. Merci d'avoir pris un peu de votre temps pourtant déjà bien occupé pour m'aider dans mes réflexions. Merci à vous ainsi qu'à Sophie pour l'efficacité et la rapidité avec lesquelles vous avez corrigé les différentes versions de cette thèse.

Merci aux membres de mon jury, Karine Andréau, Rémy Maximilien ainsi que Valérie Camel d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également aux membres de mon comité de thèse, Armelle Baeza-Squiban et Hélène Desqueyroux, pour leurs conseils avisés durant ces 3 ans.

Je ne voudrais pas oublier non plus Suzanne Ménashii et Eric Huet du laboratoire de Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires **(**CRRET**)** ainsi que Pascale Fanen de l'équipe 11 de l'unité 955 de l'INSERM, pour s'être intéressés à mes travaux, m'avoir suggéré des pistes de recherche et m'avoir mis leurs appareils à ma disposition.

Merci également aux membres du CRRET qui m'ont accompagné dans mes premiers pas dans l'enseignement, en particulier Dulce Papy, Laure Garrigue-Antar, et Thibault Bouderlique, à qui je souhaite bon courage pour la suite de sa thèse.

Remerciements

Merci à Nathalie Herlin, Martine Mayne et Aurélie Habert, du Laboratoire Francis Perrin au CEA, qui a laissé un duo de biologistes utiliser leurs appareils de caractérisation des nanoparticules pendant plusieurs semaines. Merci à Xavier Jeanson, du Laboratoire d'Etude des Particules Inhalées, pour avoir aidé dans la caractérisation de mes particules.

Une pensée émue pour les membres, passés et présents, de l'unité 700 à Bichat, dans laquelle j'ai passé une excellente année de master. La liste est longue, mais je voudrais particulièrement remercier Claudie Bantsimba Malanda, Marielle Maret, Delphine Goven, Joelle Marchal-Somme et Aurélie Fabre, pour leur gentillesse et leurs précieux conseils.

Merci aux « voisins du dessous », l'équipe 8, chez qui il est toujours agréable de descendre, que ce soit pour travailler, pour utiliser divers appareils, et pour discuter protocoles, musique ou jeux vidéos. Amal, Medhi, Elizabeth, Dominique, Elise, Vicky…

Merci à ceux qui ont constitué et constituent mon entourage depuis ces 3 ans, à l'équipe 4. Les « anciens » qui ont beaucoup contribué à ma formation, tout d'abord : Cyrill Bussy, que j'espère bien revoir lors de ma soutenance, Lyes Tabet, à qui je souhaite bonne continuation au Canada, et Laurent Boyer, à qui je souhaite bonne chance aux Etats Unis.
Merci aux autres, dans le désordre : Philippe Caramelle pour sa bonne humeur, Stéphane Kerbrat (Breizh atao !) pour ses précieux conseils sur la PCR, Marie-Claude Bourrin pour m'avoir enseigné les ficelles du Western (et de l'enseignement), Marie-Laure Franco-Montoya pour avoir répondu à toutes mes questions. Sans oublier Pascal Andujar, pour avoir contribué à diminuer mon stress à Denver, et pour son esprit critique.
Merci à Sabine Le Gouvello pour ses conseils et sa disponibilité, ainsi qu'à son équipe pour le travail qu'ils ont effectué pour moi : je pense en particulier à Corinne, François et Catherine. Ca valait bien un paquet de M&M's et un saucisson !
Aux membres du Bureau des Etudiants : Agnès, Mélinda (mon Disciple), Guillaume, Sandra, Mirlande, Indou, Elise, Angèle (et ses lapins…). Le travail dans ce Bureau s'est toujours effectué dans la bonne humeur et la satiété, pourvu que ça dure ! Un merci particulier à Jean-Marie, qui a beaucoup contribué à faire ma culture rugby. J'espère qu'on aura encore le temps d'aller voir le Stade Français jouer !

Je n'oublie pas non plus les secrétaires. Merci donc à celles qui se sont succédées auprès de l'Equipe 4, Catherine, Nadia et Julia. Vous avez toutes été des modèles de gentillesse et d'efficacité, ce dont je vous remercie.

Et que serai-je devenue sans le précieux trio avec lequel je forme le Bureau des Thésards & Post-docs ? Angélique, ta perpétuelle bonne humeur (et ta nourriture) a bien souvent suffit à éclaircir la mienne. Tes précieuses explications sur la caractérisation des nanoparticules m'ont été très utiles. Bonne continuation pour la suite et je ne désespère pas de voir Aëlis en personne un jour !
Maylis, tu m'as appris énormément de choses sur la culture cellulaire, sur l'immunocytochimie, sur la recherche et sur l'enseignement. Tu as été d'une très grande aide, et ç'a été un plaisir pour moi de te côtoyer, tout comme d'être ta camarade de chambre aux Etats-Unis. J'espère de tout cœur que tu auras ton poste de maître de conférences.
Esther… Nous avons partagé des bureaux, des manips, des repas au RU, des chambres d'hôtel, des soirées ciné ou resto. Avoir quelqu'un dans la même situation que moi m'a beaucoup aidé. Je vais « presque » regretter que ta prédiction ne se soit pas réalisée. Mais promis, si elle se réalise un jour, tu le sauras.

Enfin, je voudrais remercier tous les autres, scientifiques ou non, qui m'ont accompagnée au cours de ces 3 années... ou plus.
Clément et Jim, tout d'abord.
Un énorme merci à Christophe et Marie. Votre soutien psychologique (et matériel) m'a été très utile, et je compte bien vous embêter (et vous surveiller) encore longtemps ! Merci aussi à Ludovic, dont les délires du vendredi soir m'ont beaucoup fait rire. Désolée de n'avoir « rien fait péter ». Merci à Emmanuelle, avec qui je partage les mêmes galères depuis les bancs de « Châto » il y a maintenant 9 ans.
Merci aussi à tous ceux, dont la liste est trop longue pour être écrite mais que ne j'oublie pas pour autant, qui ont pris de mes nouvelles et posé la question qu'il ne faut pas poser : « alors cette thèse, ça avance ? ».

Last but not least, je remercie du fond du cœur ma famille, sans qui je ne serais pas en train de terminer ces remerciements de thèse aujourd'hui.

Liste des abréviations

8-OH-G : 8-Hydroxyguanosine
AcP : Accessory Membrane-spanning Protein
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Al_2O_3 : Alumine
AP-1 : Activator Protein-1
ARN : Acide Ribonucléique
ASB : Albumine de Sérum Bovin
BAP : Benzo(a)pyrène
BET : Brunauer Emmett et Teller
BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
Cat : Catalase
CCL : Chemokine C-C motif ligand
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand
DCFH : 2,7 Dichlorofluorescéine Diacétate
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPPP : 1,3-Bis(diphenylphosphino) propane
DTT : Dithiothreitol
EDS : Analyse Dispersive en Energie
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Emmprin : Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer
EMSA : Electromobility Shift Assay
Fe_2O_3 : Maghémite
FGF : Fibroblast Growth Factor
GAG : Glycosaminoglycane
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GPCR : G Protein-Coupled Receptors
GPx : Glutathion Peroxydase
GSH : Glutathion
GSSH : Glutathion réduit
H_2 : Dihydrogène
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HE : Hématoxyline Eosine
$HO^{\cdot}$: Radical hydroxyle
HO-1 : Hème Oxygénase-1
HOCl : Acide Hypochlorique
HPRT : Hypoxanthine Phosphoribosyl Transférase
HRB : Hyperréactivité Bronchique
IARC : International Agency for Research on Cancer
ICE : IL-1β Converting Enzyme
IgE : Immunoglobuline E
IGFBP : Insulin Growth Factor Binding Protein

IKK : IκB Kinase
IL : Interleukine
IL-1 Ra : IL-1 Receptor antagonist
IL-1R : IL-1Receptor
IRAK : IL-1R Activated Kinase
KC : Keratinocyte Chemoattractant
KO : Knock Out
LBA : Lavage Bronchoalvéolaire
LDH : Lactate Deshydrogenase
LPS : Lipopolysaccharide
MAPK : Mitogen-activatedprotein (MAP) kinases
MAPKKK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MARCO : Macrophage Receptor with Collagenous structure
MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1
MET : Microscopie Electronique à Transmission
MIP-2α : Macrophage Inflammatory Protein-2α
MMLV : Moloney Murine Leukemia Virus
MMP : Matrix Metalloprotease
MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
Muc5a : Mucine5a
MWCNT : Nanotube de Carbone Multifeuillet
NAC : N-Acétyl Cystéine
NALP-3 : NACHT, LRR and PYD domains-containing protein-3
NC : Noir de Carbone
NF-κB : Nuclear Factor-κB
NIF : NF-κB-Inducing Kinase
NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health
Nox : Nicotine adénine dinucléotide phosphate oxydase
NP : Nanoparticule
NT : Nanotube
$O_2^{\cdot -}$: Anion superoxide
OA : Ovalbumine
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCNA : ProliferatingCellNuclearAntigen
PlGF : Placenta Growth Factor
PN : Polynucléaire Neutrophile
ROS : Espèce Réactive de l'Oxygène
RT-qPCR : Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction
SARA : Smad Anchor for Receptor Activation
SCENIHR : Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
SCP : Spectroscopie par Corrélation de Photons
SF3A1 : Splicing factor 3A subunit 1
SiO_2 : Silice

SOD : SuperoxydeDismutase
SVF : Sérum de Veau Fœtal
SWCNT : Nanotube de Carbone Monofeuillet
TDI : Toluene Diisocyanate
TGFRI : Transforming Growth Factor Receptor I
TGF-β : Transforming Growth Factor-β
TIMP : Tissue Inhibitor of Matrix Metalloprotease
TiO_2 : Dioxyde de Titane
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α
TRAF6 : Tumor Necrosis FactorReceptor-Associated Factor 6
TTBS : Tris-buffered saline + Tween
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferased UTP Nick End Labeling
UV : Ultraviolet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WST-1 : 4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzène disulfonate
XTT : 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide
ZnO : Oxyde de Zinc

Liste des figures

Figure 1.1 : surface spécifique d'un matériau non plan (en bas), en comparaison avec la surface apparente……..……... 9
Figure 1.2 : rapport surface/volume (en bleu) et fraction des molécules présentes à la surface de la particule (en rouge) en fonction du diamètre de la particule (pour une particule sphérique)……... 11
Figure 1.3 : cristallographie du rutile…… 13
Figure 1.4: cristallographie de l'anatase……..... 13
Figure 1.5 : église du Jubilée à Rome, contenant du TiO_2 nanométrique dans son ciment…….…… 15
Figure 1.6 : mises en contact possibles d'humains avec des nanomatériaux…..…… 19
Figure 1.7 : dépôt prédit de particules inhalées de différentes tailles par respiration orale ou nasale, en considérant les particules comme sphériques et non agglomérées…… 24
Figure 1.8 : mécanismes de devenir des particules solides inhalées dans et hors du tractus respiratoire…… 26
Figure 1.9 : mécanismes d'internalisation……..…… 31
Figure 1.10 : voie de signalisation de l'IL-1β……... 36
Figure 1.11 : mécanismes de formation des principales Espèces Réactives de l'Oxygène ainsi que les réactions catalysées par les enzymes antioxydantes…….. 37
Figure 1.12 : représentation d'une partie de la matrice extracellulaire……. 62
Figure 1.13 : structure de la Matrix Métalloprotéase-1…… 67
Figure 1.14 : niveaux de régulation de la Matrix Métalloprotéase-1.……..... 68
Figure 1.15 : représentation schématique de A) la réparation tissulaire normale et B) la fibrose : rôle des fibroblastes……. 70
Figure 1.16 : voie de signalisation du Transforming Growth Factor-β faisant intervenir les Smad……...…… 71
Figure 1.17 : mécanismes menant au déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases dans le poumon……. 73

Figure 2.1 : charges et potentiels d'une particule en suspension…….. 79
Figure 2.2 : cellules MRC-5 observées en microscopie optique…….. 83
Figure 2.3 : protocole expérimental de l'étude *in vivo* : exposition des animaux et prélèvements/analyses réalisés ……... 85

Figure 3.1 : protocole expérimental de l'étude *in vivo* : exposition des animaux et prélèvements/analyses réalisés……... 140

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : description et localisation des mécanismes de clairance de particules sphériques inhalées dans le tractus respiratoire……25
Tableau 1.2 : résumé des études décrivant les effets *in vitro* des NP de TiO_2…….. 40
Tableau 1.3 : résumé des études décrites sur les effets *in vitro* des NP de NC…… 43
Tableau 1.4 : résumé des études décrivant les effets *in vivo* des NP de TiO_2……... 51
Tableau 1.5 : résumé des études décrivant les effets *in vivo* des NP de NC…… 53
Tableau 1.6 : résumé des effets *in vivo* et *in vitro* des NP de TiO_2 et de NC…… 55
Tableau 1.7 : résumé des différentes études *in vitro* et *in vivo* les caractéristiques physicochimiques des NP de TiO_2 et de NC impliquées dans leurs effets biologiques……... 58
Tableau 1.8 : les Matrix Metalloproteases et leurs substrats……64

Tableau 2.1 : caractéristiques physicochimiques des particules utlisées lors de l'étude, telles que transmises par les fournisseurs……... 76
Tableau 2.2 : séquences des amorces des différents gènes humains étudiés.…… 90
Tableau 2.3 : séquences des amorces des différents gènes de rat étudiés……..... 90
Tableau 2.4 : anticorps utilisés en Western Blot…….. 92
Tableau 2.5 : anticorps utilisés en immunohistologie…….. 93

Tableau 3.1 : résumé des résultats observés lors de l'étude *in vitro*…….… 100
Tableau 3.2 : résumé des résultats obtenus lors de l'étude *in vivo*……..……. 141

Introduction générale

Les nanosciences et nanotechnologies ont connu un essor fulgurant ces dernières décennies. Le terme « nano » fait référence à l'échelle du nanomètre (10^{-9} m). Réduire les dimensions d'un objet jusqu'à l'échelle nanométrique (il est alors appelé nano-objet) peut permettre l'apparition de propriétés nouvelles. Les nanosciences s'intéressent à ces nouvelles propriétés ainsi qu'aux interactions entre ces nano-objets et leur environnement. Les nanotechnologies, quant à elles, ont pour objectif de mettre en application les concepts et les procédés obtenus par les nanosciences. Depuis le discours du physicien Richard Feynman prédisant «There's plenty at the bottom »[1] (il y a plein de choses en bas, sous entendu à découvrir), en 1959, les nanotechnologies se sont développées et diversifiées. Bien que beaucoup d'applications soient encore à réaliser, des progrès remarquables ont déjà été constatés, que ce soit dans le domaine de l'électronique, de l'industrie, de l'environnement ou de la médecine. L'intérêt des industriels et des scientifiques pour les nanotechnologies s'est amplifié, parallèlement aux moyens matériels et financiers permettant leur développement.

Les nanotechnologies semblent avoir pris pied dans notre vie quotidienne. A l'heure actuelle, on recense à travers le monde plus d'un millier de produits affichant contenir des nano-objets, et il en existe probablement beaucoup plus, car il n'y a pas de réglementation spécifique concernant les nano-objets. Cette absence de transparence des produits contenant des nano-objets inquiète certains consommateurs, d'autant plus que les études concernant les effets sur la santé humaine et l'environnement ne permettent pas de dire de manière précise quels risques font courir ces nano-ojets. Peut-être est-ce dû également au contexte marqué par les scandales liés à l'amiante et aux inquiétudes et débats suscités par les Organismes Génétiquement Modifiés. Quoi qu'il en soit, on observe une certaine méfiance de la population vis-à-vis des nanotechnologies, comme l'indiquaient les réponses collectées lors du débat national sur les nanotechnologies, en 2009[2].

Une demande conjointe des associations telle que France Nature Environnement et des scientifiques a permis la création d'une table ronde dédiée aux nanotechnologies lors du Grenelle de l'Environnement, en 2007, ce qui a donné lieu à un rapport. De plus, les lois Grenelle 1[3] et Grenelle 2[4], votées respectivement en 2009 (celle-ci a été publiée au Journal Officiel le 24 avril 2011) et 2010 suite au rapport du Grenelle de l'Environnement de 2007, prévoient d'obliger les industriels à déclarer à l'autorité administrative les substances

[1] Site http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html, consulté en ligne le 20 juillet 2011
[2] Site http://debatpublic-nano.org/informer/bilan_debat.html, consulté en ligne le 20 juillet 2011
[3] Site http://www.legrenelle-environnement.fr/IMG/pdf/hors-serie_loi_grenelle_1.pdf , consulté en ligne le 20 juillet 2011
[4] Site http://www.legrenelle-environnement.fr/Presentation-de-la-loi-Grenelle-2.html, consulté en ligne le 20 juillet 2011

nanométriques qu'ils fabriquent, importent ou mettent sur le marché et à en informer le public et les consommateurs. De même, en application du Règlement Européen sur les Produits Cosmétiques, les nanomatériaux présents dans les cosmétiques devront être mentionnés sur les étiquettes à partir de 2013, donnant ainsi une meilleure visibilité des nano-objets dans les produits de consommation.

En parallèle de ces différentes lois sur les nano-objets, les études scientifiques se poursuivent pour essayer d'anticiper l'impact du développement des nanotechnologies sur la santé humaine et l'environnement et établir des règles d'utilisation. Cette tâche s'avère complexe, car il existe toutes sortes de nano-objets : en effet, un nano-objet ne se définit pas seulement par sa taille, mais également par d'autres paramètres physicochimiques tels que sa forme, sa réactivité de surface, sa composition chimique... Ces paramètres sont susceptibles, eux aussi, de modifier les propriétés du nano-objet. Et si cela intéresse les industriels qui souhaitent des nano-objets aux propriétés suffisamment variées pour être adaptés à leurs besoins, cela complique la tâche du toxicologue qui doit multiplier le nombre d'études pour une évaluation globale des effets biologiques des nanobjets. Car le fait que les propriétés des nano-objets qui intéressent les industriels varient peut également vouloir dire que les effets biologiques des nano-objets varient eux aussi. De plus, les tests biologiques utilisés pour évaluer la toxicité de substances chimiques peuvent se révéler non adaptés aux nano-objets, en raison des propriétés particulières de ces derniers, ce qui oblige les toxicologues à choisir leurs tests avec précaution ou à en utiliser plusieurs pour vérifier leurs résultats. Enfin, les nano-objets peuvent entrer en contact avec les humains ou l'environnement lors de plusieurs étapes de leur cycle de vie, mais, pour l'instant, peu d'études ont permis de quantifier ces expositions, ce qui rend difficile une évaluation du risque encouru par l'Homme du fait des nano-objets.

Dans ce travail, nous avons choisi de nous intéresser au dioxyde de titane (TiO_2). Après avoir longtemps été utilisé en tant que particule de taille micrométrique pour ses propriétés optiques et d'adsorption des rayons ultraviolets, il est de plus en plus synthétisé en tant que nanoparticule (NP, nano-objet ayant 3 dimensions nanométriques) ou nanotube (nano-objet ayant 2 dimensions nanométriques), car un nano-objet de TiO_2 dispose de propriétés nouvelles et originales par rapport aux particules de TiO_2 de taille micrométrique. Cependant, le TiO_2 nanométrique (NP ou nanotube) peut être à l'origine d'effets biologiques indésirables [1]. En particulier, le TiO_2 nanométrique est de plus en plus utilisé dans les implants orthopédiques, dentaires ou cardiaques [2-4]. Or, les études à long terme sur les prothèses de genou ou de

hanche montrent un descellement[5] des prothèses utilisant du TiO_2 micrométrique [5]. Ceci est dû à une dégradation de la matrice extracellulaire en contact avec les prothèses, et pose le problème de la biocompatibilité à long terme du TiO_2, et du TiO_2 nanométrique en particulier. Un tel phénomène de dégradation de la matrice extracellulaire a également été observé dans des poumons de souris exposées à des NP de TiO_2 [6]. 14 jours après l'administration initiale de NP de TiO_2, les auteurs ont observé une rupture des cloisons alvéolaires, une apoptose des cellules épithéliales, ainsi qu'un élargissement des alvéoles pulmonaires, trait caractéristique d'un emphysème pulmonaire [6]. Ces effets de dégradation de la matrice sont importants, car ils peuvent perturber le bon fonctionnement du poumon. Cependant, les mécanismes aboutissant à ces phénomènes, en particulier dans le poumon, n'ont pas été décrits.

Les Matrix metalloproteases (MMP) et leurs inhibiteurs, les Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases (TIMP) jouent un rôle important dans l'homéostasie du poumon. En particulier, une surexpression de la collagénase interstitielle MMP-1 chez des cellules épithéliales alvéolaires a été démontrée comme étant impliquée dans la perte de l'intégrité alvéolaire [7]. De plus, les études ont montré une augmentation de l'expression et de l'activité de la MMP-1 sur des cellules épithéliales alvéolaires humaines après exposition à des particules diesel [8]. Ce résultat a également été observé sur des cellules épithéliales bronchiques humaines [9]. Il est donc possible que les dégradations de la matrice extracellulaire observées après une exposition au TiO_2 soient liées à une surexpression de la MMP-1.

Plusieurs paramètres physicochimiques du TiO_2 sont susceptibles de moduler ses effets [1]. Parmi ces paramètres, on cite la taille, la forme, ou encore la variété cristalline, mais il en existe d'autres, comme les propriétés de surface. En revanche, aucune étude n'a encore permis de montrer si un de ces facteurs était principalement responsable des effets du TiO_2, car les études qui ont été réalisées portent, en général, sur des nano-objets de TiO_2 ayant plusieurs paramètres physicochimiques différents. Il est, de fait, difficile d'évaluer la part exacte de chaque paramètre physicochimique dans les effets biologiques observés.

Notre hypothèse est que, au vu des données de la littérature, les NP de TiO_2 peuvent participer à un remodelage matriciel via l'induction de la MMP-1, mais elles peuvent également

[5] Apparition d'une mobilité anormale entre la prothèse et l'os au niveau duquel elle est ancrée

aggraver un remodelage matriciel déjà existant, par exemple dans un contexte de pathologie associée au remodelage matriciel, comme l'emphysème pulmonaire.

L'objectif de cette thèse est donc triple :

- Examiner les effets de NP de TiO_2 en termes d'induction de la MMP-1 dans un modèle expérimental de lignée cellulaire de fibroblastes pulmonaires fœtaux humains. Les fibroblastes sont en effet un type cellulaire sécrétant la MMP-1 [10], et ils sont impliqués dans le remodelage matriciel [11]. De plus, étant donné que les nano-objets sont capables de passer de la lumière des alvéoles pulmonaires vers la circulation sanguine [12, 13], il est à envisager qu'il existe un passage interstitiel des NP de TiO_2 vers les fibroblastes suite à une exposition à ces NP par inhalation.

- Evaluer la capacité du TiO_2 à moduler le remodelage matriciel dans un contexte d'emphysème pulmonaire déjà existant. Nous avons choisi d'administrer des NP de TiO_2 par instillation intratrachéale dans un modèle expérimental d'emphysème, chez le rat.

- Déterminer s'il existe un ou plusieurs facteurs physicochimiques déterminant ces effets biologiques. Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs particules de caractéristiques physicochimiques différentes : taille, composition chimique (TiO_2 et Noir de Carbone NC), forme (sphérique et bâton), variété cristalline (anatase et rutile).

Le présent document est constitué de 4 parties. Dans une première partie, est présenté un état actuel de la littérature définissant les nanotechnologies, le TiO_2 et ses effets biologiques, puis les MMP et leur rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire, à la fois en situation physiologique et pathologique. La deuxième partie présente les différentes techniques utilisées dans cette étude, ainsi que les modèles cellulaires et animaux mis en œuvre dans ce travail. Les résultats de cette étude sont présentés sous forme de deux articles et font l'objet de la troisième partie : tout d'abord, les conséquences de l'exposition aux NP de TiO_2 sur l'expression de la MMP-1, sur une lignée cellulaire de fibroblastes pulmonaires humains sont étudiées. Ces effets seront comparés à ceux d'un type de TiO_2 de taille micrométrique et d'un type de NP de NC. Ensuite, sont présentés les résultats d'une étude de l'effet d'une NP de TiO_2 sur un modèle *in vivo* d'emphysème provoqué par l'instillation d'élastase sur des rats, en

comparant ces effets à ceux induits par une NP de NC. La quatrième partie est une discussion sur l'ensemble des résultats, suivie d'une conclusion générale et de perspectives.

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la direction du Pr Jean-Claude Pairon et du Dr Sophie Lanone, dans l'équipe 4 de l'unité 955 de l'INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), dirigée par le Dr Jorge Boczkowski, à la faculté de médecine de l'Université Paris Est Créteil. Cette thèse a bénéficié d'une bourse du Ministère de la Recherche, via l'Ecole Doctorale Agriculture Biologie Environnement Santé (ABIES).

Etat actuel de la littérature

1) Nano-objets : Généralités

1.1) Les nano-objets

1.1.1) Définition

La première définition que l'on a donnée aux nano-objets concernait exclusivement leur taille. On caractérisait les nano-objets par au moins l'une de leurs dimensions inférieure à 100 nm, sans précision quant à la composition chimique, la forme ou la réactivité de l'objet.

A mesure que les études sur les effets biologiques des nano-objets avançaient, il est apparu qu'une définition plus précise et plus spécifique des nano-objets s'imposait, définition qui ne prendrait plus seulement en compte la taille des objets, mais également leur surface spécifique. Aussi, en décembre 2010, le Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), qui se réunit tous les ans à la demande de la Commission Européenne, a donné les conclusions suivantes concernant des caractéristiques des nano-objets et une nouvelle proposition de définition[6] :

- Les propriétés physiques et chimiques des matériaux peuvent changer avec leur taille, mais il n'existe pas de taille minimale ou maximale qui puisse être associée à ces changements pour tous les nano-objets.

- La taille est le meilleur moyen de définir tous les nano-objets.

Le SCENIHR a donc recommandé de définir un nano-objet comme ayant :

- Une taille comprise entre 1 et 100 nm pour au moins une dimension.

- Une dimension comprise entre 1 et 100 nm pour au moins 0.15% des composants du matériau.

- Une surface spécifique en volume supérieure à 60 m^2/cm^3.

La surface spécifique représente la surface réelle d'un objet, par opposition à la surface apparente. Elle représente la surface qu'occuperait un gramme de cet objet si cette surface

[6] Site http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_032.pdf, consulté en ligne le 19 juillet 2011

était entièrement développée. Elle rend ainsi compte de la surface totale du nano-objet en contact avec l'extérieur, qui peut être différente de la surface apparente de l'objet (Figure 1.1). Elle s'exprime en m²/g.

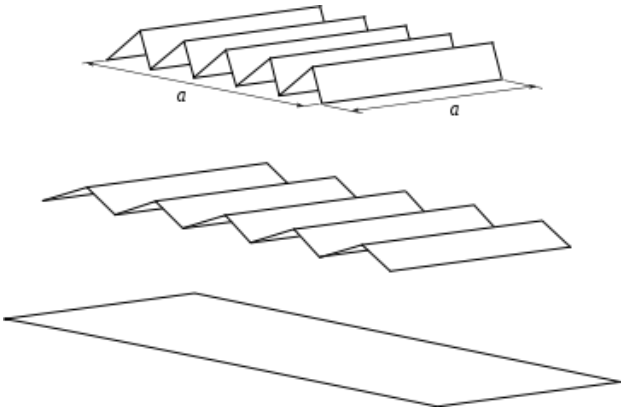


Figure 1.1: surface spécifique d'un matériau non plan.
En haut, le matériau non plan et sa surface apparente (surface occupée par le matériau) a². En bas, le matériau aplati et sa surface spécifique (la surface qu'il occupe alors), qui est supérieure à la surface apparente[7].

Une autre manière d'exprimer la surface spécifique d'un objet consiste à la rapporter au volume total de l'objet, au lieu de sa masse (on parle alors de surface spécifique « en volume », exprimée en m^2/cm^3). Cette surface spécifique exprimée en volume s'obtient en divisant la surface spécifique de l'objet exprimée par unité de masse par sa densité, qu'on suppose égale à celle du même objet à l'échelle non nanométrique. Cette façon d'exprimer la surface spécifique présente l'avantage d'être indépendante de la densité du matériau, et d'être donc comparable entre des objets de compositions chimiques différentes.

On peut voir que la proposition de définition du SCENHIR (qui n'a pas été adoptée à l'heure actuelle), même si elle tient compte de plus de paramètres que la taille des objets, est susceptible de regrouper des objets de composition, taille, forme… très différents.

Un nano-objet est appelé un **nanofeuillet** s'il dispose d'une dimension nanométrique (exemple : graphite), un **nanotube** si 2 de ses dimensions sont nanométriques (exemple : les nanotubes de carbone) et une **nanoparticule** (NP) si ses 3 dimensions sont nanométriques (exemple : nanoparticule d'or).

[7] Tiré de http://fr.wikipedia.org/wiki/Surface_sp%C3%A9cifique, consulté en ligne le 19 juillet 2011

1.1.2) Origine des nano-objets

On distingue plusieurs types d'origine pour les nano-objets :

- Les nano-objets d'origine naturelle : ils sont produits par différents phénomènes dont la condensation de gaz dans l'atmosphère, mais aussi l'activité volcanique, les feux, les marées, l'érosion…

- Les nano-objets d'origine anthropique, produits du fait des activités humaines. Ces nano-objets peuvent eux-mêmes être divisés en 2 catégories :
  - Les nano-objets d'origine non intentionnelle : ils peuvent être générés par la combustion des moteurs, les industries, les procédés métallurgiques…

  - Les nano-objets manufacturés, produits intentionnellement pour être utilisés. La présente étude traitera plus spécifiquement de ce type de nano-objets.

1.1.3) Propriétés des nano-objets

La réactivité chimique des nano-objets est susceptible d'être fortement modifiée lorsqu'ils sont comparés à leurs pendants de taille micrométrique ou supérieure.

Le nombre d'atomes en surface du nano-objet est fortement supérieur à l'état nanométrique comparé à l'état micrométrique. Comme on peut le voir sur la Figure 1.2, la proportion d'atomes à la surface augmente fortement lorsque le diamètre de l'objet diminue, en particulier en dessous de 100 nm. Or, ce sont principalement les atomes présents en surface qui interagissent avec l'environnement du nano-objet lors de réactions chimiques. L'énergie d'activation (quantité d'énergie à apporter à un composé pour provoquer une réaction chimique), croît lorsque la taille diminue. C'est également le cas de la surface spécifique. La réactivité chimique, qui dépend de ces propriétés, augmente donc lorsque la taille des objets diminue.

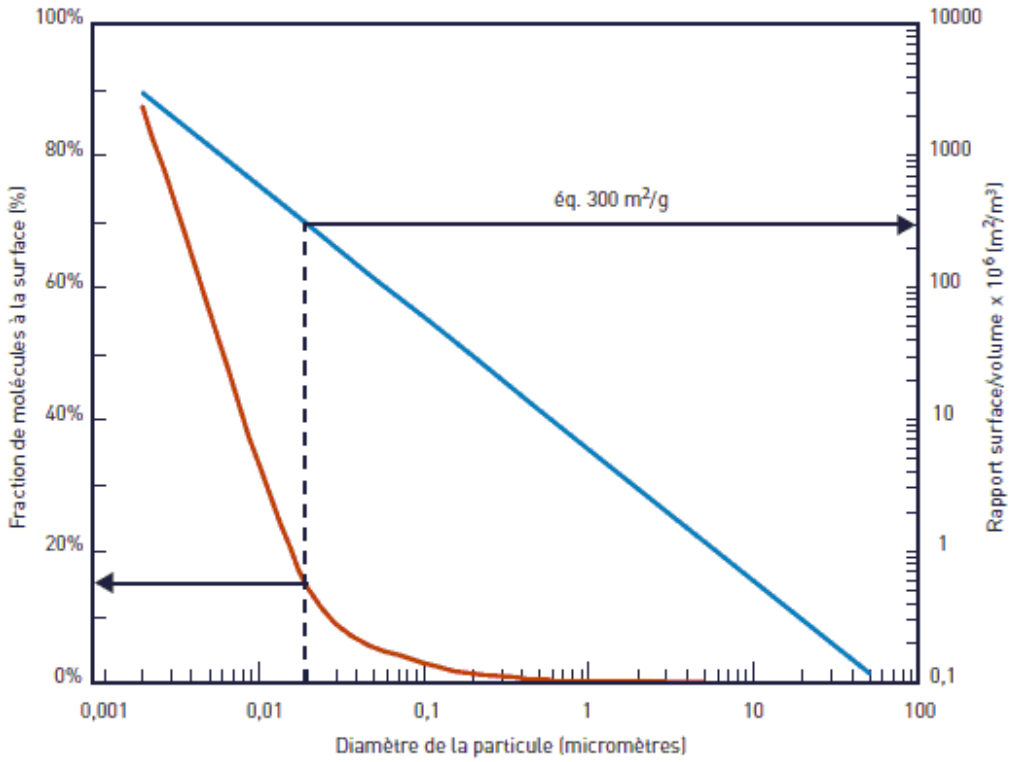


Figure 1.2 : rapport surface/volume (en bleu) et fraction des molécules présentes à la surface de la particule (en rouge) en fonction du diamètre de la particule (pour une particule sphérique).
A la fois le rapport surface/volume et la fraction des molécules présentes à la surface augmentent lorsque la taille de la particule diminuent. Adapté de [14].

Ceci peut expliquer que l'or, inerte à l'échelle micrométrique, soit réactif à l'échelle du nanomètre [15].

1.1.4) Applications présentes et futures

- Premier secteur à s'approprier le nanomonde, **l'électronique** cherche à repousser toujours plus loin la taille de ses composants élémentaires : les transistors. La barre des 100 nanomètres étant franchie depuis 2002, les ingénieurs sont à présent confrontés à toutes les difficultés inhérentes à l'utilisation d'objets aux propriétés plus quantiques que physiques (« fuite » des particules de leur transistor, par exemple)[8].

- Avec un marché mondial estimé à 340 milliards de dollars d'ici 2015, d'après une étude de la Commission Européenne[9], les **nanomatériaux** (matériaux comportant des nano-objets) regroupent des secteurs comme l'aéronautique, l'automobile ou l'espace.

[8] Site internet http://www.cnano-paca.fr/index.php?option=com_content&view=article&id=49&Itemid=76
[9] Site internet ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanoarticle_hullmann_nov2006.pdf, consulté en ligne le 12 août 2011

Les débouchés potentiels sont nombreux, même si peu de prototypes peuvent encore espérer s'imposer sur le marché. Résistance à la traction à l'aide d'argile nanométrique, imperméabilité au gaz plus importante du nanocomposite à base de polyamide et d'argile, béton autonettoyant et dépolluant grâce au TiO_2 nanométrique, aérogels superisolants… sont des exemples de propriétés, envisagées ou bien déjà réalisées, que peuvent avoir les nanomatériaux.

- Bien qu'encore très largement au stade expérimental, la **nanomédecine** a un énorme potentiel devant elle. Il existe, à l'heure actuelle, plusieurs nanomédicaments commercialisés, principalement dans le domaine de la cancérologie, même si d'autres domaines sont ciblés. Par exemple, on peut citer la délivrance de substances actives via l'enrobage dans des nanocapsules pour un meilleur ciblage des cellules à traiter, la visualisation de tumeurs rendue possible grâce à des nanoparticules d'oxyde de fer, des diagnostics plus précoces et précis [16].

- Les applications liées à **l'environnement** ne sont pas en reste : sont envisagées des applications telles qu'augmenter l'autonomie des voitures électriques grâce à des nanoparticules de phosphate de fer lithié (meilleur conducteur que le cobalt actuellement utilisé), retenir les médicaments grâce à des membranes de filtration d'eaux usées contenant des nanoparticules, ou encore d'ajouter du TiO_2 dans des cellules solaires pour accroître leur efficacité [17].

- Enfin, et bien qu'il soit difficile de savoir ce qu'il en est exactement, la **Défense** investit lourdement dans le secteur des nanotechnologies. En 2010, le ministère de la Défense américain a reçu plus d'un quart (soit environ 436 millions de dollars) du budget alloué par le gouvernement américain aux nanotechnologies. L'arsenal nanotechnologique serait, à terme, très diversifié : caméras multispectrales, lasers, détecteurs chimiques, blindages et armures n'en sont que des exemples.

1.2) Le Dioxyde de Titane

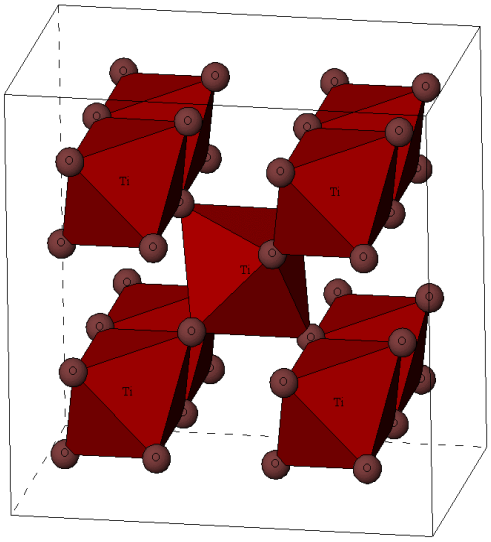
1.2.1) Généralités

Le TiO_2 est un oxyde métallique, et le 9ème composant le plus abondant dans la croûte terrestre. Il est présent sous forme amorphe (les différents atomes le composant ne forment

pas de figure particulière) ainsi que sous 3 principales formes tétragonales de paramètres de maille différents : le rutile (le plus présent sur Terre, Figure 1.3), l'anatase (Figure 1.4) et le brookite.

On trouve le TiO_2 dans la nature sous forme de rutile pur (95%), ou bien d'illénite, un mélange de $FeTiO_3$ et de TiO_2. On peut également récupérer du TiO_2 presque pur dans les scories d'illénite (illénite dont on a extrait le fer).

Le TiO_2 a été découvert en 1791 en Angleterre, mais son exploitation commerciale en temps que composé pur n'a commencé qu'en 1913. A l'époque, la purification du TiO_2 micrométrique se faisait par fusion, mais en 1918 ce procédé fut remplacé par le « procédé au sulfate », une digestion par l'acide sulfurique à chaud. En 1958, un procédé supplémentaire, appelé « procédé au chlore », fut introduit, dans lequel le TiO_2 était extrait à l'aide de dichlore, à chaud.



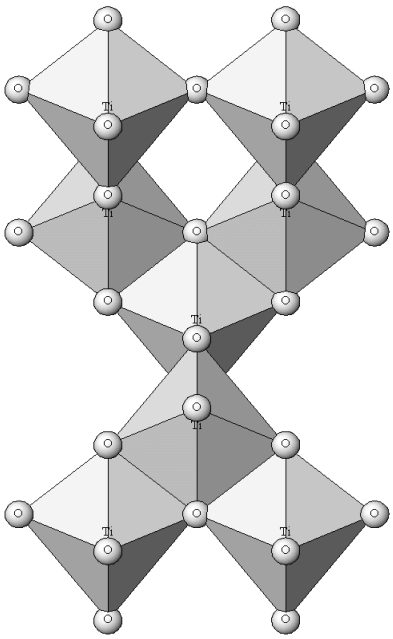


Figure 1.3 : cristallographie du rutile[10]. Figure 1.4: cristallographie de l'anatase[10].

Il existe de plus différents procédés permettant de synthétiser du TiO_2 nanométrique, comme par exemple le procédé sol-gel, qui consiste en une suite de polymérisations/hydrolyses à partir d'un précurseur inorganique. On peut également citer le procédé sol, qui consiste en une série de réactions non hydrolytiques entre un précurseur de chlorure de titane et des molécules

[10] Site internet http://staff.aist.go.jp/nomura-k/english/itscgallary-e.htm, consulté en ligne le 11 août 2011

donneuses d'oxygène, ou encore un procédé par oxydation directe de titane pur. Le choix du procédé de fabrication ainsi que les conditions de production comme la nature du précurseur ou les conditions de température peuvent donner lieu à du TiO_2 de caractéristiques physicochimiques différentes [18].

1.2.2) Principales caractéristiques et applications

Une des caractéristiques intéressantes pour les industriels du TiO_2 est sa couleur. Cette couleur dépend de la taille du TiO_2 : à l'état massif, il est incolore, et à l'échelle micrométrique, blanc. La raison est que le TiO_2 n'absorbe presque pas de lumière incidente dans la région visible du spectre. Cette lumière est soit transmise soit réfractée. S'il y a, dans un cristal massif de TiO_2, assez de lumière transmise pour que le cristal apparaisse transparent, en revanche, à l'échelle micrométrique, presque toute la lumière est réfléchie par les interfaces entre cristaux, ce qui donne à la poudre sa couleur blanche.
Une autre des caractéristiques intéressantes du TiO_2 est son fort indice de réfraction. Pour une longueur d'onde de 590 nm, l'indice de réfraction du rutile est de 2.7, celui de l'anatase est de 2.55 (par comparaison, celui du diamant est de 2.45). Cet indice fait du TiO_2 le pigment blanc le plus opaque parmi ceux disponibles.
Enfin, il a la propriété d'adsorber les rayons UV.

Du fait de ces propriétés, on peut trouver différents champs d'applications pour le TiO_2, micrométrique tout d'abord puis nanométrique à présent :

- Comme **pigment :** un peu moins de 4 millions de tonnes de TiO_2 sont consommés dans le monde chaque année. Son indice de réfraction et sa blancheur font qu'il est utilisé dans les peintures, revêtements, plastiques, encres… comme pigment [19]. Il entre également, pour la même raison, dans la composition de médicaments et dentifrices. Enfin, le TiO_2 est un colorant alimentaire, le E171[11].

- Dans les **écrans solaires :** le TiO_2 est beaucoup utilisé dans l'industrie cosmétique comme pigment mais aussi comme écran solaire, du fait de son indice de réfraction et de ses propriétés d'absorption d'UV. Le TiO_2 est, à l'heure actuelle, utilisé dans presque toutes les crèmes solaires, car les absorbeurs d'UV minéraux (à base de TiO_2

[11] Site internet http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/frsum_afc_titanium_dioxide.pdf1.pdf, consulté en ligne le 11 août 2011

ou d'oxyde de zinc) entraînent moins de problèmes de photoallergie que les absorbeurs d'UV chimiques. De plus, le TiO_2 nanométrique est plus intéressant que le TiO_2 micrométrique pour les crèmes solaires car il laisse moins de traces sur la peau [20].

- Dans les **implants biologiques:** le TiO_2 micrométrique a longtemps été considéré comme un matériau inerte, ce qui en faisait un bon composant des implants biologiques [3]. De plus, la présence de TiO_2 nanométrique dans les implants biologiques permet d'augmenter la prolifération et la différenciation cellulaire, ce qui augmente la biocompatibilité de l'implant comparé aux implants contenant du TiO_2 micrométrique [3].

- Comme **photocatalyste :** les UV adsorbés à la surface du TiO_2 nanométrique permettent d'oxyder l'eau en O_2 et H_2 (phénomène connu sous le nom d'effet Honda Fujishima, découvert en 1967 par Akira Fujishima [21]). Il peut également oxyder l'oxygène ou la matière organique, ce qui fait qu'il est également incorporé dans les peintures, ciments (Figure 1.5) ou fenêtres pour ses propriétés autonettoyantes, bactéricides ou désodorisantes.



Figure 1.5 : église du Jubilée à Rome, contenant du TiO_2 nanométrique dans son ciment[12].
Le TiO_2 nanométrique est, dans ce cas, utilisé pour ses propriétés autonettoyantes.

On estime la production actuelle mondiale de TiO_2 à 4 millions de tonnes, dont une quantité pour l'instant assez faible (de l'ordre de quelques % de la quantité totale de TiO_2 produit) de

[12] Site internet http://img.planet.fr/01_planet/voyage/monde/eglises%20insolites/Jubilee%20Church_flickr_visionet.jpg, consulté en ligne le 19 juillet 2011

TiO_2 nanométrique. Ceci est principalement dû au coût élevé de fabrication du TiO_2 nanométrique (plus de 170 $/ kg contre 2 $/kg pour le TiO_2 micrométrique) et les prévisions indiquent que cette quantité va croître très rapidement dans le futur, du fait des propriétés physicochimiques du TiO_2 nanométrique, plus intéressantes que celles du TiO_2 micrométrique [22].

1.3) Le Noir de Carbone

1.3.1) Généralités

Le NC est constitué presque exclusivement (>98%) de carbone élémentaire amorphe, le plus souvent présent sous la forme de particules sphériques agrégées. Initialement produit en Chine par combustion incomplète dans des lampes à huile (noir de fumée), et destiné à fournir le pigment noir de l'encre de Chine, il est utilisé depuis 1912 pour renforcer le caoutchouc des pneumatiques.

Il existe de nombreuses qualités de NC, en fonction des matières premières utilisées, des conditions de combustion et de décomposition thermique.

Le NC est produit principalement par combustion incomplète de résidus pétroliers lourds selon le procédé Oil Furnace Black. La réaction a lieu dans un four dans lequel est brûlé du gaz naturel en présence d'un excès d'air. Le NC est contenu dans les gaz de combustion.

La production actuelle de NC, à la fois micrométrique et nanométrique, dépassait les 8 millions de tonnes en 2009[13].

1.3.2) Principales caractéristiques et applications

La couleur noire caractéristique du NC dépend de nombreux facteurs physicochimiques, comme la taille des particules, leur état d'agglomération ou encore leur dispersion. En général, la couleur est plus intense lorsque le diamètre diminue.

Le NC dispose, à l'état brut, d'une conductivité comprise entre 10^{-1} et 10^{2} Ω/cm, ce qui en fait un bon conducteur. La forme agrégée peut acquérir une structure encore plus conductrice.

Ces propriétés peuvent donner lieu à différentes applications du NC :

[13] Site internet http://www.carbon-black.org/what_is.html, consulté en ligne le 20 juillet 2011

- **Pigment :** en plus de son utilisation dans les encres de Chine, le NC est actuellement incorporé dans les encres d'imprimerie (journaux, imprimantes), mais aussi les peintures (pour automobile par exemple), ou les laques.

- **Agent de renforcement :** principalement dans les pneumatiques, le NC apporte de la résistance à l'usure. Les NC nanométriques apportent de la dureté, les NC micrométriques conservent la souplesse du caoutchouc.

- **Agent conducteur :** Les noirs de carbone conducteurs sont utilisés dans les piles électriques salines, les câbles souterrains de haut voltage, les plastiques et caoutchoucs conducteurs (abaissement de la conductivité de 4000 à quelques Ω/cm)….[14]

1.4) Propriétés physicochimiques des nano-objets à visée industrielle

La taille n'est pas la seule caractéristique physicochimique qui intéresse les industriels concernant les nano-objets. D'autres caractéristiques peuvent avoir une influence sur les propriétés réactionnelles des nano-objets et sont donc susceptibles d'intéresser les industriels, comme par exemple :

- **La forme :** les propriétés photocatalytiques du TiO_2 peuvent se trouver modifiées par sa forme, les nanotubes de TiO_2 présentant de meilleures propriétés que les NP de TiO_2 [23].

- **La variété cristalline :** toutes les différentes variétés cristallines (pour les NP ayant plusieurs variétés cristallines possibles) ne disposent pas des mêmes propriétés. Pour le TiO_2, il a été démontré que l'anatase avait le plus d'activité photocatalytique [24].

- **La surface spécifique :** à taille équivalente, une surface spécifique plus élevée peut permettre d'augmenter la réactivité chimique des nano-objets, par exemple en augmentant leurs propriétés mécaniques [25].

[14] Site internet http://lecarbone.com/article.php3?id_article=37, consulté en ligne le 10 août 2011

- **La chimie de surface :** la nature et l'arrangement des atomes présents à la surface des nano-objets peuvent modifier leurs propriétés. Par exemple, l'oxydation du TiO_2 peut améliorer sa dureté comme sa porosité [26].

- **La composition chimique :** non seulement des nano-objets de compositions chimiques différentes n'ont pas les mêmes propriétés, mais des assemblages de différents nano-objets n'ont pas les mêmes propriétés selon le pourcentage des différents composants. Par exemple, des copolymères de NP de poly(lactide-co-glycolide) et de polyéthylène glycol vont montrer une biocompatibilité supérieure comparée aux NP de poly(lactide-co-glycolide) seules [27].

- **L'état d'agglomération/d'agrégation des nano-objets :** les nano-objets soumis aux forces de Van der Waals, électrostatiques ou aux tensions de surface, tendent à s'agglomérer [28]. Les nano-objets forment des **agglomérats** lorsqu'ils sont reliés par des liaisons faibles, et des **agrégats** lorsqu'ils sont reliés par des liaisons fortes. La taille de ces agglomérats/agrégats peut influer sur les propriétés physicochimiques des nano-objets ; par exemple, les propriétés photocatalytiques du TiO_2 sont moins importantes quand son état d'agglomération/agrégation augmente [29].

- **Le traitement de surface :** le traitement de surface des nano-objets est également susceptible de modifier leurs propriétés. Par exemple, le fait de greffer (coater) des NP de magnétite superparamagnétique avec du polyéthylèneglycol permet d'améliorer leur internalisation par plusieurs types cellulaires, et donc d'accroître leurs applications biomédicales [30].

Ces paramètres, qui peuvent modifier les propriétés des nano-objets, sont également susceptibles de modifier leurs effets biologiques. Il faut cependant souligner que ces différentes propriétés ne sont pas forcément indépendantes les unes des autres, et qu'il est, de ce fait, difficile d'évaluer l'influence exacte de chaque paramètre physicochimique sur les effets que peuvent avoir les nano-objets.

1.5) Voies potentielles de pénétration dans l'organisme

L'être humain peut rentrer en contact avec les nano-objets à différents moments de la vie de ceux-ci, que ce soit dans le contexte professionnel, environnemental ou de consommation. On peut voir dans la Figure 1.6 que l'exposition est susceptible de varier en fonction du stade du cycle de vie du nano-objet : au stade de fabrication, les travailleurs sont les plus susceptibles d'être exposés, alors qu'au stade de distribution et de commercialisation, les consommateurs peuvent également être exposés. L'exposition peut également avoir lieu en fin de vie du nano-objet, en particulier s'il y a dégradation du produit. Enfin, à tous les stades de vie du nano-objet existe la possibilité qu'il contamine l'environnement. Ainsi, pour le même nano-objet, le nombre de personnes exposées ainsi que les modalités de l'exposition sont des paramètres qui peuvent énormément varier.

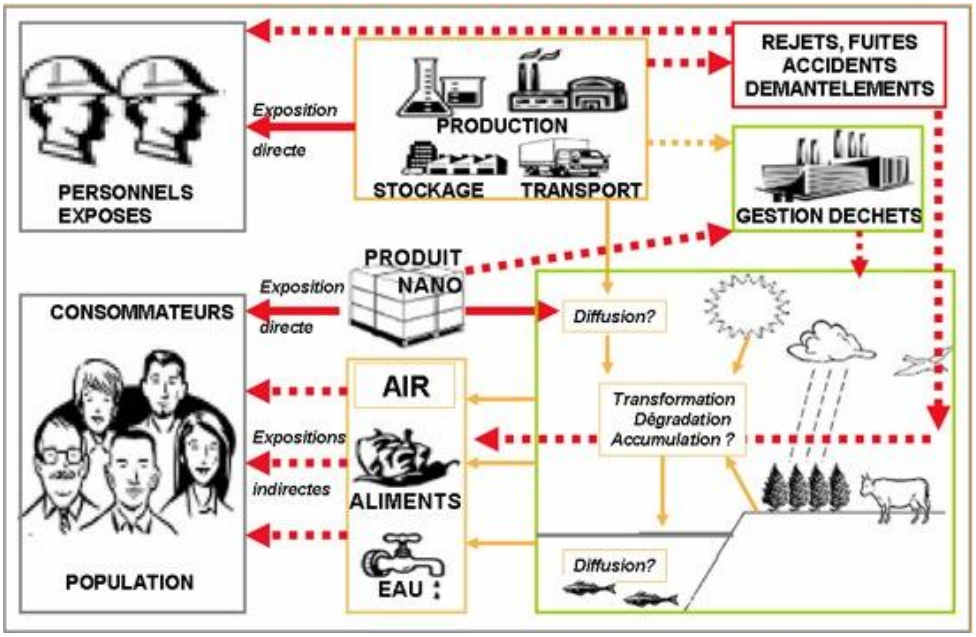


Figure 1.6 : mises en contact possibles d'humains avec des nanomatériaux.
En plus des expositions directes, les nanomatériaux sont susceptibles de contaminer l'environnement et d'entrer en contact avec la population via l'air, les aliments ou l'eau. Adapté de[15].

Très peu d'études se sont intéressées au cycle de vie des nano-objets. Une étude à ce sujet a cependant été réalisée par Wijnhoven et coll. [31] au sujet du nano-argent. Elle recense les données existantes et manquantes pour maîtriser le risque lié au nano-argent, à la fois pour l'Homme et pour l'environnement. Elle explique que, bien que de nombreuses études aient porté sur l'argent, seul un petit nombre a porté sur le nano-argent. Or, du fait de ses nombreux

[15] Tiré de http://www.internetactu.net/wp-content/uploads/2009/10/0910nanoexposition.jpg, consulté en ligne le 19 juillet 2011

domaines d'applications (textiles, cosmétiques, agroalimentaire…) le nano-argent a de fortes probabilités de se retrouver dans l'environnement, en particulier aqueux. De plus, l'étude souligne le manque de données concernant le suivi du nano-argent entre son émission et le moment où il entre en contact avec l'environnement. Cette étude montre que beaucoup de travail reste à faire afin de connaître le risque lié aux autres nano-objets.

Toutefois, de plus en plus d'études ont été réalisées à propos de l'exposition de l'organisme aux nano-objets. Il existe en effet plusieurs types d'exposition qui seront détaillées par la suite : l'exposition par ingestion, l'exposition cutanée, l'exposition intraveineuse et l'exposition respiratoire.

1.5.1) Exposition par ingestion

L'être humain peut être exposé aux nano-objets par le tractus gastro-intestinal en portant la main à la bouche après avoir touché une surface contaminée, en léchant une surface contaminée ou bien en mangeant de la nourriture contenant des nano-objets (comme du TiO_2 lorsqu'il est utilisé comme colorant alimentaire). L'exposition peut également résulter de la déglutition du mucus d'origine bronchique sur lequel des nano-objets se sont déposés après inhalation.

Les objets de taille micro ou nanométrique peuvent intégrer l'organisme à partir du tractus gastro-intestinal par diffusion ou, s'ils sont plus gros, par un mécanisme appelé persorption (les objets passent entre les cellules qui composent les villosités intestinales), et se retrouvent dans les systèmes lymphatique et sanguin [32]. Plusieurs études ont montré que les objets de taille nano et micrométrique étaient également absorbés via les plaques de Peyer (agrégats de follicules lymphoïdes), bien que ces dernières ne représentent qu'une faible proportion de la surface totale de l'intestin. L'absorption peut également avoir lieu via les entérocytes intestinaux [33]. Il est à noter que l'absorption de nano-objets peut dépendre de leurs caractéristiques physicochimiques : en particulier la charge, car il a été démontré que des particules chargées positivement étaient mieux absorbées que les particules neutres ou chargées négativement [33]. La taille peut également jouer dans l'absorption, les nano-objets plus petits étant mieux absorbés [34].

Concernant le TiO_2 plus spécifiquement, Wang et coll. ont démontré chez des souris que le TiO_2 nanométrique comme micrométrique était capable d'intégrer l'organisme via le tractus

gastro-intestinal. Les animaux ont reçu une dose de 5 g/kg par gavage et, 2 semaines plus tard, les auteurs ont observé du TiO_2 dans différents organes comme le foie, la rate, les poumons ou les reins, démontrant la translocation[16] des NP, vers la circulation sanguine, et ce de façon plus importante que les particules de TiO_2 de taille micrométrique [35]. Cependant, la dose utilisée est extrêmement élevée, et il est peu probable que la dose d'exposition humaine au TiO_2 par voie orale atteigne 5 g/kg.

1.5.2) Exposition cutanée

La peau de l'être humain est susceptible d'entrer en contact avec des nano-objets du fait, en particulier, de leur présence dans les cosmétiques (en particulier pour les NP de TiO_2 ou d'oxyde de zinc, ZnO). Les travailleurs peuvent également être exposés par voie dermique lors de la fabrication ou de l'emballage des nano-objets.

De plus en plus d'études s'intéressent au passage de NP, en particulier les NP de TiO_2, à travers la peau. Beaucoup montrent une translocation des NP de TiO_2 faible ou absente à travers une peau saine, à la fois *in vitro* ou *in vivo* [36-38]. En revanche, les études indiquent des résultats contradictoires concernant la translocation de NP de TiO_2 à travers une peau lésée : certaines démontrent qu'il n'y a pas de translocation [36] mais ce n'est pas le cas d' une étude de Wu et coll. [39]. Celle-ci conclut à une absence de translocation de NP de TiO_2 à travers un modèle *in vitro* de peau lésée d'oreille de porc isolée ; de plus, les NP de TiO_2 directement appliquées sur des oreilles de porc dans un modèle *in vivo* ne sont pas retrouvées au niveau de la couche dermale. Cependant, les auteurs observent une translocation des particules de TiO_2 appliquées sur des souris sans poils pendant 60 jours, car ces particules de TiO_2 (de taille micrométrique et nanométrique, et de variétés cristallines différentes) sont retrouvées dans différents organes comme le foie ou le cœur. Cette étude a fait l'objet de critiques, en particulier parce que les niveaux élevés de TiO_2 chez les groupes contrôles et une imprécision dans le protocole de l'étude laissaient penser que les animaux avaient pu être exposés aux particules de TiO_2 par voie orale en même temps que dermique.

En plus d'un passage direct via les cellules des différentes couches de la peau, il est possible que les NP de TiO_2 puissent également franchir la peau au niveau des follicules pileux. Lademann et coll. ont démontré que c'était le cas pour les particules de TiO_2 de taille micrométrique [40].

[16] Le passage des barrières physiologiques

D'autres études semblent obtenir des résultats similaires concernant la faible pénétration de NP de ZnO à travers la peau, pour conclure que, pour l'instant du moins, l'utilisation de crèmes solaires reste indispensable, étant donné les effets bénéfiques avérés de la photoprotection [41].

1.5.3) Exposition intraveineuse

L'être humain peut être amené, à l'avenir, à se trouver en contact avec les nano-objets lors d'une exposition intraveineuse, en particulier lors d'une prise de nanomédicaments.

A l'heure actuelle il existe plusieurs nanomédicaments avec une voie d'administration intraveineuse. Ils ont une demi-vie dans le sang pouvant aller de 1 à 63 heures [42]. Un des objectifs majeurs des recherches actuelles en ce qui concerne les nanomédicaments consiste à augmenter encore cette demi-vie, de manière à prolonger leur effet, mais aussi d'améliorer leur biodistribution ou de limiter leurs interactions non spécifiques avec leur environnement. Différentes propriétés physicochimiques des NP peuvent améliorer leur comportement dans l'organisme :

- **Leur taille :** la taille des NP peut avoir un impact important sur leur adsorption sur les protéines, les NP les plus petites étant moins adsorbées, ce qui augmente leur demi-vie [43].

- **La composition du cœur du médicament :** une étude de Shenoy et coll. [44] montre une meilleure biodistribution d'une NP composée de poly (β-amino ester) comparée à la polycaprolactone.

- **Leur charge :** une étude a démontré que des micelles contenant des groupements tyrosine-glutamine, de charge négative, avaient une distribution dans le foie très inférieure aux micelles contenant des groupements tyrosine, de charge neutre [45].

- **Leur traitement de surface :** les NP contenant à leur surface du polyéthylène glycol semblent plus appropriées pour un usage médicamenteux car ces derniers réduisent les interactions non spécifiques avec les protéines [42].

1.5.4) Exposition respiratoire

1.5.4.1) Dépôt

L'exposition aux nano-objets par inhalation peut avoir lieu sur leur site de fabrication, ou bien lors de la dégradation de produits en contenant.

La plupart des données concernant les mécanismes de dépôt des nano-objets proviennent des études qui ont été faites sur les particules atmosphériques.

Une fois inhalées, les particules atmosphériques peuvent être exhalées ou bien se déposer dans les différents compartiments de l'appareil respiratoire à cause de différents phénomènes :

- **La sédimentation**, du fait de la gravité.

- **L'impaction** : certaines particules, lorsqu'elles atteignent une courbe dans les voies aériennes, ne suivent pas l'écoulement de l'air et viennent heurter la surface dans leur trajectoire, parfois en y adhérant.

- **L'interception**, qui correspond au dépôt d'une particule lorsqu'elle rentre en contact avec une paroi.

- **La diffusion**, due aux mouvements browniens des particules.

- **Les interactions électrostatiques**, dans le cas de particules chargées.

En ce qui concerne les nano-objets, leur dépôt se fait principalement via le phénomène de diffusion, car la plupart des phénomènes de déposition des particules plus larges ne s'appliquent pas à eux du fait de leur petite taille. Il est cependant à noter que les nano-objets peuvent être soumis à des phénomènes de coagulation[17] ce qui peut augmenter leur taille et donc les rendre sensibles à l'ensemble des phénomènes de dépôt décrits pour les particules plus grosses.

Le dépôt peut avoir lieu à différents endroits du tractus respiratoire, en fonction de la taille des objets inhalés.

[17] Déstabilisation des forces répulsives existant entre deux particules chargées pour permettre leur contact

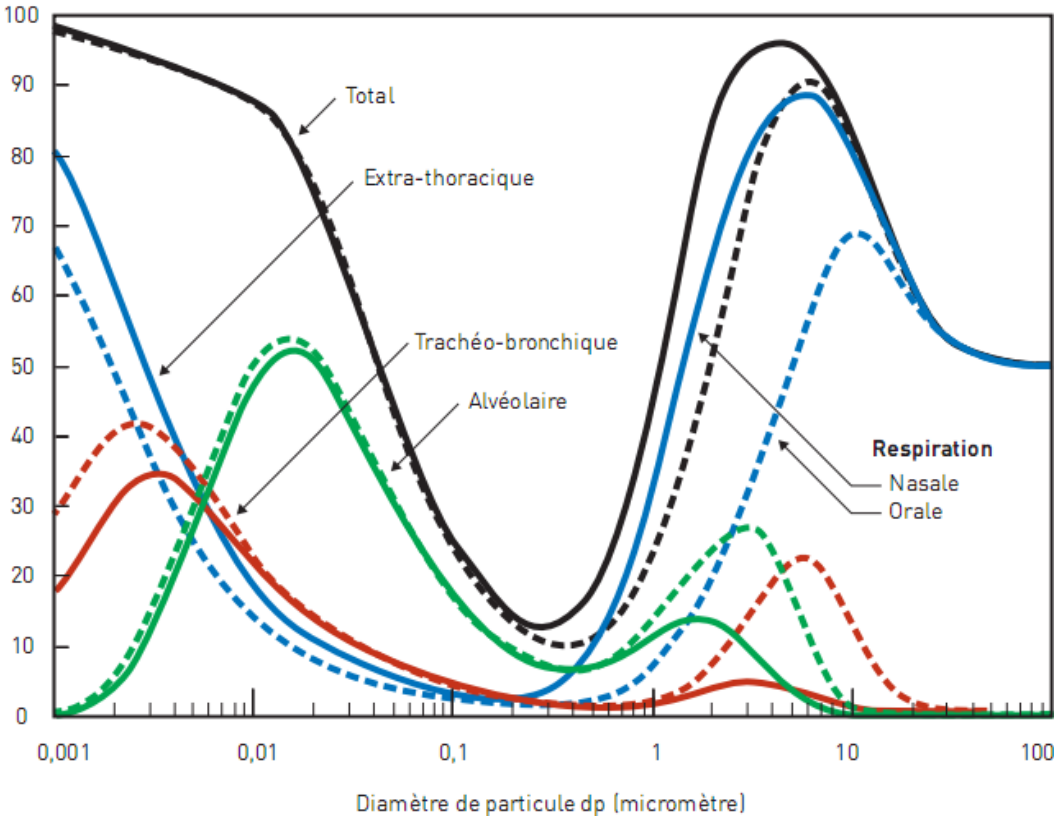


Figure 1.7 : dépôt prédit de particules inhalées de différentes tailles par respiration orale ou nasale, en considérant les particules comme sphériques et non agglomérées.
Le dépôt au niveau alvéolaire est maximal pour des particules d'environ 10 nm, à 50% du total de particules inhalées. Adapté de [46].

On peut voir sur la Figure 1.7 que, d'après le modèle prédictif utilisé pour construire cette figure, le dépôt des particules au niveau alvéolaire varie entre 0 et 50% du total de particules inhalées, le maximum étant atteint pour un diamètre de 20 nm.

1.5.4.2) Devenir des nano-objets déposés

Le devenir des nano-objets déposés dans le poumon est variable. Il existe différents systèmes biologiques visant à épurer le tractus respiratoire des débris cellulaires ou des nano-objets déposés. La clairance[18] des nano-objets repose sur deux types de phénomènes complémentaires : une translocation physique et une épuration chimique. Cependant les mécanismes de clairance impliqués sont différents selon les régions de déposition des nano-objets, comme on le voit sur le Tableau 1.1.

[18] Nettoyage

	Région nasale	Région trachéobronchique	Région alvéolaire
Processus physiques			
Mouvement mucociliaire	x	x	
Phagocytose des macrophages		x	x
Endocytose des cellules épithéliales	x	x	x
Translocation interstitielle		x	x
Drainage lymphatique		x	
Passage dans la circulation sanguine			**x**
Passage dans les neurones sensoriels	x	x	
Processus chimiques			
Dissolution (particules solubles)	x	x	x
Lixiviation[19]	x	x	x
Liaison aux protéines	x	x	x

Tableau 1.1 : description et localisation des mécanismes de clairance de particules sphériques inhalées dans le tractus respiratoire.
x : phénomène existant dans la région indiquée. Adapté de [47].

Dans la région alvéolaire, le principal mécanisme de clairance des particules solides non solubles, quelle que soit leur taille, est la clairance par les macrophages alvéolaires, qui phagocytent ces particules. Ces macrophages sont recrutés par des facteurs chémotactiques sécrétés par les cellules présentes au niveau du site de dépôt des particules [48]. Une fois les particules internalisées, les macrophages se dirigent vers la région mucociliaire et vers le haut du tractus respiratoire. L'efficacité de cette clairance, dans les alvéoles, dépend de la capacité des macrophages à repérer le site de dépôt des particules et à les internaliser, ce dernier paramètre dépendant de la taille et la forme des particules. En effet, les NP sont très peu internalisées par les macrophages comparées aux particules plus grosses [49, 50]. En ce qui concerne les particules de TiO_2, une étude a démontré que des NP de TiO_2 inhalées de 20 nm de diamètre n'étaient presque pas internalisées par les macrophages alvéolaires [51]. De plus, il a été démontré que les objets de type fibreux, comme les nanotubes de carbone, sont beaucoup moins internalisés que les particules sphériques [52], et que la longueur de ces nanotubes influait sur leur internalisation, les nanotubes de moins de 1 µm de long étant plus internalisés [53].

[19] Extraction de particules solubles par le passage d'un liquide

Les nano-objets qui ne sont pas internalisés par les macrophages alvéolaires peuvent rester dans les alvéoles, mais également être transloqués dans l'épithélium ou la circulation sanguine (Figure 1.8) [47]. Les nano-objets sont donc susceptibles, du fait de leur translocation, de se retrouver au contact de nombreux types cellulaires composant le poumon, comme les fibroblastes. Ces derniers sont localisés à la base des cellules épithéliales, lesquelles sont elles-mêmes en contact avec la lumière des alvéoles. De plus, il a été démontré que certaines NP de carbone étaient transloquées depuis les fosses nasales jusqu'aux bulbes olfactifs en passant par les nerfs olfactifs [54]. Il est cependant à noter que ces dernières expériences ont été réalisées chez le rat, chez lequel la fosse nasale occupe une surface 10 fois supérieure à celle de l'Homme. Il faut donc prendre avec précaution ces résultats dans le contexte d'une exposition humaine.

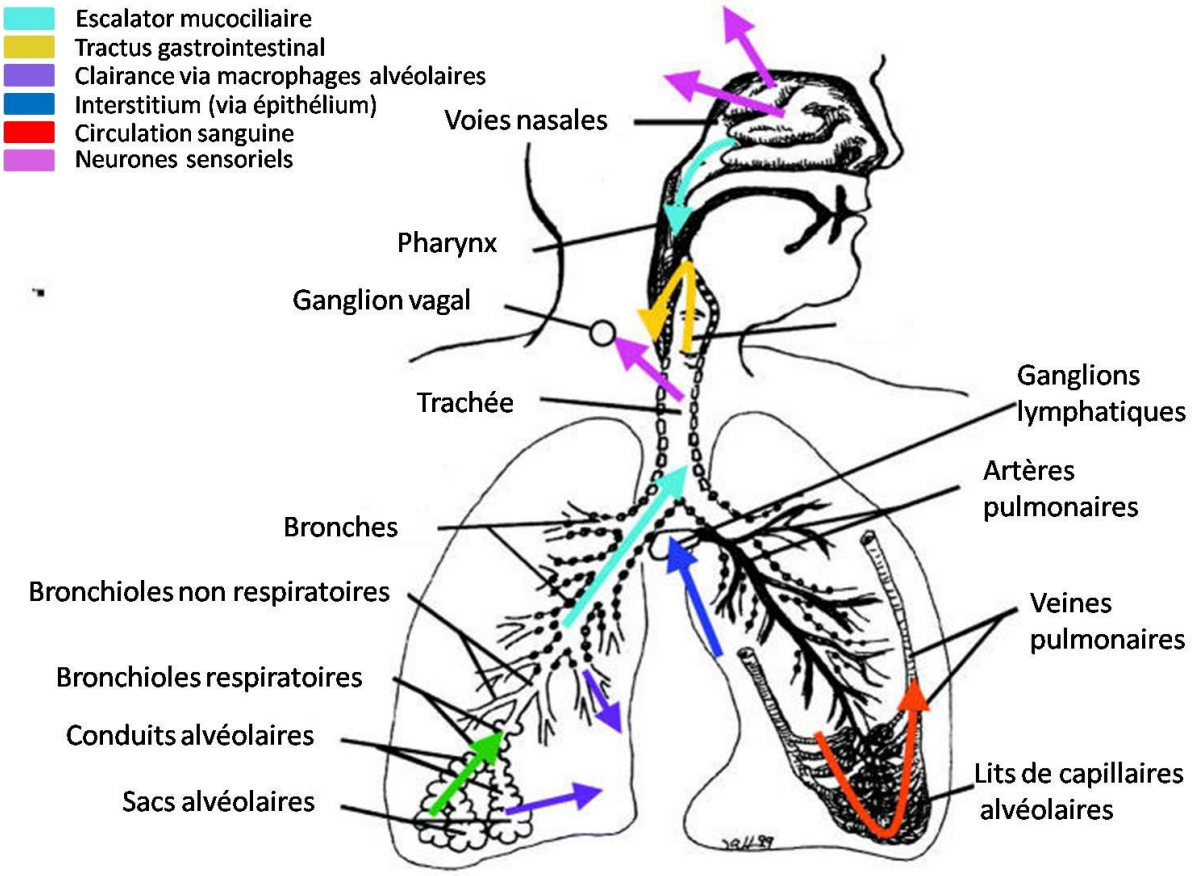


Figure 1.8 : mécanismes de devenir des particules solides inhalées dans et hors du tractus respiratoire.
En dehors de l'escalier mucociliaire, des passages existent vers la circulation sanguine, l'intersitium ou les neurones sensoriels. Adapté de [47].

Ces différents mécanismes aident à comprendre pourquoi on peut retrouver des traces de NP au niveau systémique et dans différents organes comme les ganglions lymphatiques, le foie, le cœur ou les reins après une exposition respiratoire à des NP (instillation intratrachéale ou inhalation) [12, 55]. En revanche, les résultats des études se révèlent plus controversés chez l'Homme : certaines études montrent que les NP peuvent se retrouver dans la circulation sanguine après inhalation et atteindre d'autres organes [13], mais d'autres n'observent pas de tel passage [56].

Bien que l'être humain puisse être amené à entrer en contact avec les nano-objets par toutes les voies d'exposition étudiées, la voie respiratoire est à la fois probablement la plus importante et la mieux documentée à l'heure actuelle.

2) Toxicité pulmonaire des NP de TiO_2 et de NC chez l'Homme

La toxicité pulmonaire chez l'Homme des NP de TiO_2 comme de NC peut s'observer à plusieurs niveaux. Les études épidémiologiques recensent les effets qui ont déjà été observés chez l'Homme. Les études *in vitro* permettent d'observer des phénomènes à l'échelle du type cellulaire, et les études *in vivo* permettent d'obtenir des résultats à l'échelle de l'animal.

2.1) Etudes épidémiologiques

2.1.1) Etudes épidémiologiques et TiO_2

Peu d'études concernant les effets du TiO_2, à l'échelle nanométrique ont été menées chez l'Homme à l'heure actuelle. En effet, il existe des études épidémiologiques réalisées concernant les effets du TiO_2, la plupart d'entre elles étant réalisées sur des travailleurs dans des usines de fabrication de TiO_2. Cependant, aucune de ces études ne mentionne les dimensions du TiO_2 concerné, ce qui laisse supposer, vu le faible nombre d'usines fabriquant du TiO_2 nanométrique [22], que le TiO_2 étudié est de taille micrométrique. Les auteurs de l'une d'elles ont observé un dépôt de TiO_2 dans les poumons des travailleurs, associé à une fibrose pulmonaire [57]. Dans une autre étude, un épaississement pleural a été observé chez des personnes travaillant dans une usine de TiO_2, mais ce résultat a fait l'objet de critiques car les travailleurs étaient également exposés à l'amiante [58]. En ce qui concerne le risque de cancers, une étude a rapporté une association entre exposition au TiO_2 et cancer de la vessie [59], mais une autre n'a pas trouvé d'association entre cancer du poumon et exposition au TiO_2 [60]. Enfin, plusieurs études de cohortes ont été réalisées, sans trouver d'association

entre exposition au TiO_2 et mortalité [61, 62]. En ce qui concerne le risque de cancer, le rapport de l'International Agency for Research on Cancer (IARC) a conclu à des preuves insuffisantes de la carcinogénicité du TiO_2 (micrométrique et nanométrique) chez l'Homme à partir des études épidémiologiques [63]. Le TiO_2 a été classé comme potentiellement cancérigène (catégorie 2B) pour l'Homme par l'IARC [63].

2.1.2) Etudes épidémiologiques et NC

En ce qui concerne le NC, différentes études ont été menées chez l'Homme, qui sont résumées dans le rapport de l'IARC [63]. Plusieurs études ont observé une association entre mortalité ou cancer et exposition au NC [64, 65] mais d'autres n'ont pas observé de lien [66-68]. De plus, les résultats de certaines de ces études sont discutables, du fait, en particulier, du manque de prise en compte d'autres facteurs d'exposition comme le tabac. Aucune de ces études ne précise les dimensions du NC étudié, ce qui laisse penser, étant donné que la fabrication de NC nanométrique est plus récente que celle de NC micrométrique, que le NC étudié est de taille micrométrique. Le rapport de l'IARC conclut que les preuves de la carcinogénicité du NC chez l'Homme à partir des études épidémiologiques sont insuffisantes. Le NC a été classé comme potentiellement cancérigène (catégorie 2B) pour l'Homme par l'IARC [63].

2.2) Etudes in vitro

De nombreuses études *in vitro* se sont intéressées aux conséquences d'une exposition au TiO_2 et au NC nanométriques. Elles peuvent être classées en deux catégories : celles qui s'intéressent aux effets des NP de TiO_2 et de NC, comme la cytotoxicité, la génotoxicité ou l'internalisation de ces derniers, et celles qui s'intéressent aux mécanismes impliqués dans ces effets, comme l'inflammation ou l'induction de stress oxydant.

2.2.1) Effets de l'exposition au TiO_2 et au NC nanométriques

2.2.1.1) Cytotoxicité

- Cytotoxicité et NP de TiO_2

Les études *in vitro* ont démontré que les NP de TiO_2 pouvaient induire une mort cellulaire : c'est le cas d'une étude de Hamilton et coll. [69], dans laquelle les auteurs ont exposé des macrophages alvéolaires de souris en culture primaire à plusieurs types de particules de TiO_2 : des nanosphères de TiO_2 (60-200 nm), des nanotubes courts de TiO_2 (60-300 nm* 0.8-4 µm) et des nanotubes longs de TiO_2 (60-300 nm*15-30 µm). La dose utilisée était de 50 µg/mL et

les temps d'exposition variaient entre 1 et 24 heures. Le test utilisé était un comptage des cellules marquées au bleu trypan, qui colore les cellules mortes. Les auteurs ont observé que les nanotubes longs induisaient une cytotoxicité, ce qui n'était pas le cas des autres types de TiO_2 utilisés [69]. Une étude de Park et coll. [70], réalisée sur des cellules de la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines (la lignée BEAS-2B) exposées jusqu'à 96 heures à des NP de TiO_2 de 21 nm, a démontré une cytotoxicité des NP de TiO_2 qui dépendait à la fois du temps d'exposition aux NP de TiO_2 et de la dose utilisée. Le test utilisé était le bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT), qui mesure l'activité mitochondriale. En revanche, d'autres études ont observé une cytotoxicité des NP de TiO_2 faible ou absente, comme celle de Simon-Deckers et coll. [71]. Les auteurs ont exposé des cellules épithéliales alvéolaires issues d'un carcinome de la lignée A549 à des types de NP de TiO_2 de taille différente. Les doses utilisées allaient jusqu'à 100 µg/mL, et le temps d'exposition allait de 24 à 72 heures. Les auteurs ont utilisé différents tests mesurant l'activité mitochondriale : le MTT, mais aussi le 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) ou le 4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzène disulfonate (WST-1). Ils ont également utilisé le test de la Lactate Déshydrogénase (LDH), qui mesure l'intégrité membranaire. La mortalité observée était faible pour les différents types de TiO_2 étudiés [71].

Cette toxicité due aux NP de TiO_2 peut s'expliquer par différents mécanismes. Les NP de TiO_2ont été démontrées comme pouvant induire de l'apoptose : c'est le cas dans l'étude de Park et coll. [70]. C'est aussi le cas dans une étude de Hussain et coll. [72], dans laquelle les auteurs ont exposé une lignée cellulaire de cellules épithéliales bronchiques, la lignée 16HBE, à des NP de TiO_2 de 15 nm et de CB de 13 nm à raison de 24 heures d'exposition à des doses allant jusqu'à 40 µg/cm². L'étude montre que les NP de TiO_2 comme de NC sont capables d'induire de l'apoptose [72]. Cependant, une étude de Fujita et coll. [73], dans laquelle a été évalué un profil d'expression de gènes sur des kératinocytes humains (la lignée HaCaT) exposés à des particules de TiO_2 de 7 nm, de 20 nm et 200 nm, a démontré que les gènes impliqués dans l'apoptose n'étaient pas surexprimés après exposition aux particules de TiO_2.

Les résultats de ces études montrent que la cytotoxicité des NP de TiO_2 semble dépendre de différents paramètres, comme le type cellulaire, la dose et la durée de l'exposition.

- Cytotoxicité et NP de NC

Les NP de NC peuvent également se révéler cytotoxiques : dans une étude de Hussain et coll. [72], l'exposition aux NP de NC comme de TiO_2 aboutissait à une baisse du pourcentage de

cellules vivantes comparé aux cellules nécrotiques et apoptotiques. Une étude de Val et coll. [74] observe également une cytotoxicité des NP de NC sur des cellules 16HBE dès une dose de 10 µg/cm². De plus, dans l'étude de Hussain et coll. [72], il a été observé qu'une exposition de cellules de la lignée 16HBE à une NP de NC de 13 nm pouvait entraîner de l'apoptose, et que cette apoptose était liée à un dysfonctionnement des mitochondries. Cependant, Don Porto Carero et coll. [75] ont étudié la cytotoxicité de NP de NC sur des cellules de la lignée A549 et des cellules issues d'une lignée de monocytes/macrophages humains, les THP-1 à des doses allant jusqu'à 16 µg/mL pendant 48 heures. Les auteurs n'ont pas observé de cytotoxicité liée aux NP de NC.

2.2.1.2) Génotoxicité

- Génotoxicité et NP de TiO_2

Le TiO_2 peut être génotoxique : Falck et coll. [76] ont exposé des cellules de la lignée BEAS-2B à différentes particules de TiO_2 de taille, de variété cristalline et de forme différentes, à des doses de 1 à 100 µg/cm² pendant 24 à 72 heures. Le test des comètes, qui permet de quantifier le nombre de cassures dans l'ADN des cellules, a démontré que tous les types NP de TiO_2 utilisés pouvaient induire un effet génotoxique. Le test des micronoyaux, qui permet de quantifier le nombre de micronoyaux[20] dans les cellules, a démontré que seules les NP d'anatase étaient capables d'induire une génotoxicité [76]. En revanche, une autre étude, réalisée par Bhattacharya et coll. [77] et utilisant le test des comètes, a démontré une absence de génotoxicité des NP de TiO_2 sur des cellules de la lignée BEAS-2B et de fibroblastes bronchiques humains (lignée IMR90) à des doses jusqu'à 50 µg/cm² pendant 24 heures.

- Génotoxicité et NP de NC

En ce qui concerne les NP de NC, une étude de Don Porto Carero et coll. [75] observe qu'une exposition de cellules de la lignée A549 comme de la lignée THP-1 à des NP de NC entraîne des dommages à l'ADN. Cette génotoxicité est confirmée par une étude de Mroz et coll. [78], qui ont étudié les effets de particules de NC de 14 nm et 260 nm ainsi qu'une NP de NC à la surface de laquelle a été greffé du benzo(a)pyrène (BAP) sur des cellules de la lignée A549 à la dose de 100 µg/mL, pendant des temps d'exposition allant de 1 à 24 heures. Les auteurs ont observé des dommages de l'ADN, ainsi qu'une modification de la cinétique du cycle

[20] Fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose et formant de petites entités bien individualisées dans le cytoplasme des cellules en interphase

cellulaire. La littérature ne contient pas d'études reportant une absence de génotoxicité de NP de NC.

2.2.1.3) Internalisation

- Internalisation et NP de TiO_2

Un certain nombre d'études a étudié l'internalisation de particules de TiO_2 dans les cellules. Dans l'étude de Hamilton et coll. [69], les auteurs ont observé l'internalisation de plusieurs types de particules de TiO_2 de taille nanométrique et de différentes formes pour une dose de 50 µg/mL dans des macrophages alvéolaires de souris en culture primaire par Microscopie Electronique à Transmission (MET). Les résultats ont indiqué la présence de NP (60-200 nm) ainsi que de nanotubes courts (60-300 nm* 0.8-4 µm) dans les cellules, inclus dans des structures de type lysosome. En revanche, les auteurs ont observé que les nanotubes longs (60-300 nm*15-30 µm) étaient présents dans des structures de type lysosome mais également libres dans le cytoplasme. Une autre étude, conduite par Hussain et coll. [79], a observé l'internalisation d'une NP de TiO_2 de 15 nm ainsi que plusieurs types de NP de NC de tailles différentes sur des cellules de la lignée 16HBE pour une dose de 5 µg/cm², et a observé que les NP de TiO_2 de 15 nm pouvaient être, après 24 heures d'exposition, aussi bien présentes dans les cellules dans des vésicules que libres dans le cytoplasme, ce qui n'était pas le cas des NP de NC. D'autres études, comme celle réalisée par Gibbs-Flournoy et coll. [80], ont observé la présence de NP de TiO_2 dans le noyau, après avoir exposé pendant 5 minutes ou 2 heures des cellules de la lignée BEAS-2B à 0.5 ou 2.5 µg/mL de NP.

Le mécanisme précis d'internalisation des NP n'est pas encore bien connu.

Un schéma récapitulatif des différents mécanismes d'internalisation est présenté sur la Figure 1.9.

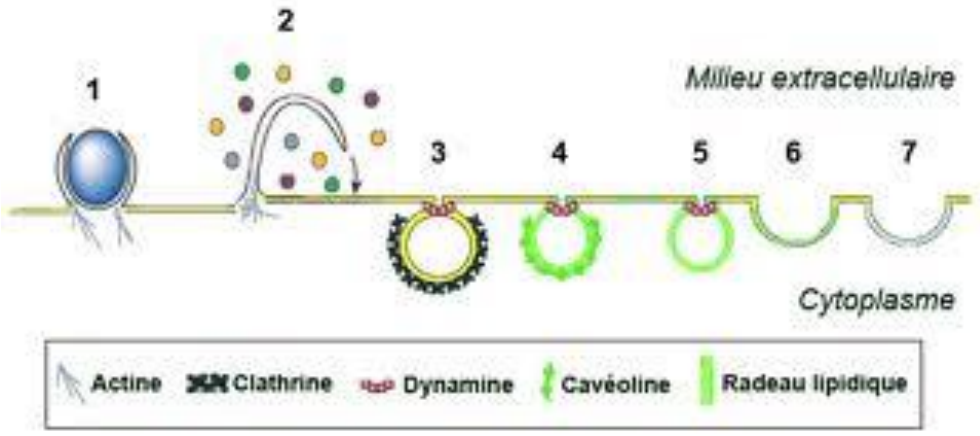


Figure 1.9 : mécanismes d'internalisation.

(1) la phagocytose, (2) la macropinocytose, (3) l'endocytose classique par les puits de clathrine, (4) l'endocytose par les cavéoles, (5) l'endocytose par les radeaux lipidiques de type cavéolaire, (6) l'endocytose par les radeaux lipidiques indépendante de la dynamine, et (7) l'endocytose indépendante des puits de clathrine, des cavéoles, des radeaux lipidiques et de la dynamine[21].

Une étude de Hussain et coll. [79] mentionne des mécanismes d'endocytose et de macropinocytose en ce qui concerne les mécanismes liés à l'internalisation de NP de TiO_2. Une autre étude, réalisée par Singh et coll. [81], a observé l'internalisation de particules de TiO_2 de tailles différentes (20-80 nm et 40-300 nm) sur des cellules de la lignée A549 à raison de 4 heures d'exposition à des doses de 16 ou 80 µg/cm². Elle a démontré que les particules de TiO_2 de taille micrométrique étaient internalisées par phagocytose, alors que les NP de TiO_2 pouvaient également être internalisées par une endocytose dépendante de la clathrine. Dans l'étude de Hamilton et coll. [69], les auteurs ont mesuré l'influence du Macrophage Receptor with Collagenous structure (MARCO) sur l'internalisation des différents nano-objets de TiO_2 en utilisant des macrophages alvéolaires de souris Knock Out (KO) pour ce récepteur. Le récepteur MARCO peut jouer un rôle dans l'internalisation de particules comme celles de silice [82]. Il est apparu que le récepteur MARCO était nécessaire pour l'internalisation des NP de TiO_2, mais pas des nanotubes de TiO_2. Enfin, une étude réalisée par Pan et coll. [83] sur des fibroblastes dermiques humains a observé l'internalisation de particules d'anatase (200 nm de diamètre) et de rutile (15-60 nm de diamètre) après exposition à des doses de 0.4 à 0.8 mg/mL pendant 6 jours, et a constaté que, si le TiO_2 agrégé était internalisé par endocytose, les particules de TiO_2 individualisées pénétraient dans la cellule en l'absence d'endocytose, et ce pour les NP comme pour les particules de taille micrométrique.

L'internalisation du TiO_2 nanométrique peut être importante pour ses effets biologiques : en effet, le fait de bloquer l'internalisation des particules et des NP de TiO_2, par exemple avec la cytochalasine D qui bloque la polymérisation des filaments d'actine, peut également bloquer les effets du TiO_2 en termes de sécrétion d'IL-1β [84].

- Internalisation et NP de NC

L'internalisation des NP de NC a elle aussi été étudiée. Hussain et coll. [79] ont observé que le NC était internalisé dans les cellules de la lignée 16HBE, et était principalement observé dans des vésicules. Saxena et coll. [85] ont évalué la quantité internalisée de NP de NC de 12 nm sur des cellules issue d'une lignée de cellules épithéliales pulmonaires de souris (lignée

[21] Adapté de http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/23548/ch01.html, site consulté en ligne le 18 août 2011

LA4) ainsi que sur une lignée de macrophages alvéolaires de souris (lignée MHS), après 3 à 24 heures d'exposition au NC à une dose de 50 µg/mL. Pour ce faire, ils ont mesuré, par la méthode Thermo-Optique de Transmittance[22], la quantité de carbone présent dans les échantillons. Il s'est avéré que les NP de NC étaient plus internalisées par les cellules de la lignée MHS. Cette internalisation était dépendante de l'actine, car l'ajout de cytochalasine D a conduit à une diminution de l'ordre de 80% de la quantité de carbone internalisé. L'internalisation des NP de NC, dans cette étude, se réaliserait grâce à un mécanisme de type phagocytose.

2.2.2) Mécanismes pouvant expliquer les effets des NP de TiO_2 et de NC

2.2.2.1) Inflammation

L'inflammation est un phénomène de défense de l'organisme contre des agressions, visant à la destruction des agents pathogènes et des cellules infectées ou agressées, ainsi qu'à la réparation des tissus lésés. Il repose sur une interaction complexe entre cytokines proinflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α), l'interféron-γ, l'interleukine-1β (IL-1β), ou le Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et antiinflammatoires, comme le Transforming Growth Factor-β (TGF-β) ou l'IL-10 et les cellules de l'inflammation (neutrophiles, lymphocytes, macrophages, cellules présentatrices d'antigènes, mastocytes…) [86]. Une inflammation chronique peut également donner lieu à des pathologies comme le cancer [87], des maladies cardiovasculaires [88], neurodégénératives [89] ou encore être impliquée dans des maladies dites autoimmunes [90].

- Inflammation et NP de TiO_2

Une exposition à des NP de TiO_2 peut être suivie de la sécrétion de différents facteurs proinflammatoires : par exemple, l'étude de Park et coll [70] a démontré une expression accrue d'IL-8 par les cellules en réponse au TiO_2 de 21 nm. De plus, Val et coll [74] ont exposé des 16HBE à des NP de TiO_2 et de NC à des doses de 10 à 160 µg/cm² pendant 24heures, et ont observé une expression accrue d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8, de GM-CSF, de TNF-α, ou encore de Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), appelé aussi Macrophage Inflammatory Protein 2-α (MIP2-α).

[22] Technique qui consiste à prélever une partie de l'échantillon, l'oxyder, la méthaniser, puis la brûler afin de connaître la quantité de carbone présente dans l'échantillon.

- Inflammation et NP de NC

L'exposition à des NP de NC peut entraîner la sécrétion de différents facteurs proinflammatoires, comme le GM-CSF observé dans l'étude de Hussain et coll. [79], ou l'expression d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8, de GM-CSF, de TNF-α, de CXCL2 dans l'étude de Val et coll. [74]. Øvrevik et coll. [91] ont observé l'expression de plusieurs facteurs proinflammatoires après exposition de cellules issues des lignées A549 et BEAS-2B à des doses entre 1 et 20 µg/cm² de NP de NC, et ont constaté une surexpression de CXCL-8, -10 et -11 après 10 heures d'exposition aux NP de NC.

- Inflammation et IL-1β

Les études ont montré qu'à la fois les NP de TiO_2 et de NC étaient capables d'induire la sécrétion d'IL-1β. L'IL-1β peut avoir des différents types d'effets, comme par exemple une infiltration de neutrophiles après injection locale ou une modification de la réponse immunitaire [92]. L'IL-1β est également connue pour modifier l'expression de nombreux gènes, des cytokines mais aussi des facteurs de croissance ou des oncogènes [92].

Du fait de ses propriétés inflammatoires, la sécrétion de l'IL-1β est étroitement contrôlée, en particulier via son activation par l'inflammasome, lequel ne s'active qu'en présence de signaux de type Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP). L'inflammasome est un complexe multiprotéique cytosolique capable de se former en réponse à la détection de PAMP, lesquels sont des structures moléculaires caractéristiques du « non-soi » comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries. Une fois mis en place, l'inflammasome va agir en réponse à ces signaux en clivant l'un de ses composants, la caspase-1. La caspase-1 (appelée aussi ICE pour IL-1β Converting Enzyme), est une protéase riche en cystéines, qui est sécrétée à l'état de zymogène, ou procaspase. Une fois clivée par l'inflammasome, les fragments de la procaspase-1 (2 fragments appelés p20 et 2 autres appelés p10) vont former un hétérotétramère doté d'une activité enzymatique [92].

Le rôle principal de la caspase-1 est d'activer les cytokines proinflammatoires, comme l'IL-1β, l'IL-18 ou l'IL-33. Ces cytokines sont elles aussi sécrétées sous forme de zymogènes inactifs, et sont activées lors de leur clivage par la caspase-1 [93].

Il existe plusieurs inflammasomes ; le plus étudié est NACHT, LRR and PYD domains-containing protein-3 (NALP-3, aussi appelé NLRP-3). C'est le seul inflammasome qui ait été décrit comme activé après exposition aux NP de TiO_2 et de NC [94, 95]. Il peut être activé par

des stimuli très variés comme des composés d'origine bactérienne (ARN bactérien par exemple), des molécules endogènes comme l'acide urique, l'ATP ou d'autres molécules exogènes comme l'alun, la silice, ou l'amiante [96].

Plusieurs inhibiteurs endogènes de l'IL-1β et de sa signalisation existent : en particulier, l'Interleukin-1 Receptor antagonist (IL-1 Ra), qui est un inhibiteur compétitif de la réaction de fixation de l'IL-1β à son récepteur ; de plus, il existe deux récepteurs de l'IL-1β, l'Interleukin-1 I Receptor (IL-1 IR), qui active la voie de signalisation de l'IL-1β, et l'IL-1 IIR, qui n'active pas de voie de signalisation [92].
La voie de signalisation de l'IL-1β fait intervenir le facteur de signalisation NF-κB. Une fois que l'IL-1β a activé le récepteur IL-1 IR, celui-ci, avec l'aide de l'Accessory Membrane-spanning Protein (AcP), va activer un complexe protéique formé de la protéine TNFR-Associated Factor 6 (TRAF6), et de l'Interleukin-1 Receptor Activated Kinase (IRAK). L'IRAK va phosphoryler une Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) appelée NF-κB-Inducing Kinase (NIK). Cette kinase va à son tour phosphoryler deux autres kinases, les NIK-interacting Protein Kinase, appelées IκB Kinase (IKK)-α et -β. Ces kinases vont phosphoryler un complexe formé de l'IκB-α ainsi que deux protéines qui composent le facteur de transcription NF-κB : p65 et p50. Une fois IkB-α phosphorylée, elle est dégradée, ce qui permet à p65 et p50 d'être transloquées dans le noyau. Un résumé de la voie de signalisation de l'IL-1β est présenté Figure 1.10.

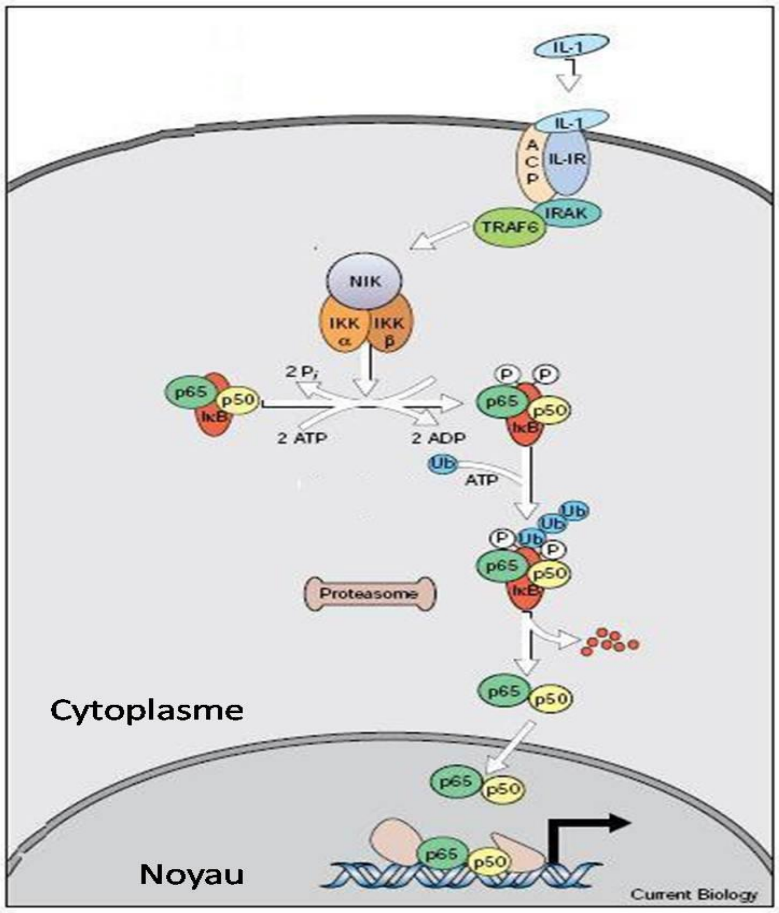


Figure 1.10 : voie de signalisation de l'IL-1β.
Lorsque l'IL-1β se lie à son récepteur, celui-ci active IKK-α et IKK-β, lesquelles vont phosphoryler IκB-α, aboutissant à sa dégradation. Cette dégradation permet à p65 et p50 de transloquer dans le noyau.
IL-1R : IL-1Receptor, AcP : Accessory Membrane-spanning Protein, TRAF6 : TNFR-Associated Factor 6, IRAK : IL-1R Activated Kinase, MAPKKK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase, NIF : NF-κB-Inducing Kinase, IKK : IκB Kinase. Adapté de [97].

2.2.2.2) Induction de stress oxydant

- Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)

Par ROS, on entend un composé dérivé de l'oxygène comportant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe de valence. Parmi les ROS, on compte l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, le radical hydroxyle $HO^{\cdot}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, l'acide hypochlorique HOCl, ainsi que les radicaux peroxydes de type $ROO^{\cdot}$ [98]. L'ion $O_2^{\cdot -}$ est produit au niveau des mitochondries des cellules, du fait d'une « fuite » d'électrons dans la chaîne respiratoire [99]. Certains types cellulaires comme les polynucléaires neutrophiles sont également capables d'activer leur métabolisme oxydatif (on parle de « respiratory burst ») en présence de bactéries. La synthèse de ROS se fait via une famille d'enzymes multiprotéiques appelée Nicotine adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase ou Nox) [100, 101].Les différentes ROS et leur origine sont présentées Figure 1.11.

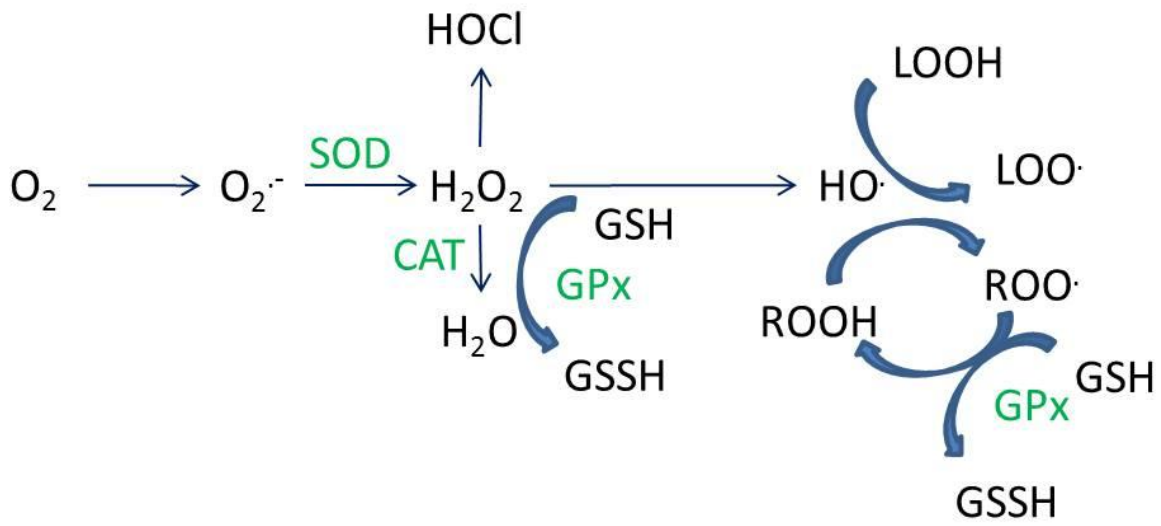


Figure 1.11 : mécanismes de formation des principales ROS ainsi que les réactions catalysées par les enzymes antioxydantes.
Les enzymes antioxydantes sont indiquées en vert.
$O_2^{\cdot -}$: anion superoxyde, $HO^{\cdot}$: radical hydroxyle, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, SOD : Superoxyde Dismutase, Cat : Catalase, GPx : Glutathion Peroxydase, GSH : gluthathion, GSSH : glutathion réduit.

Les ROS, à haute concentration, peuvent causer des lésions sur les structures cellulaires, les acides nucléiques, les protéines et les lipides. L'anion $O_2^{\cdot -}$ est connu pour réagir avec de nombreux composants de la molécule d'ADN. La lésion à l'ADN la plus étudiée est la formation de 8-Hydroxyguanosine (8-OH-G) [102]. Les ROS peuvent aussi modifier les composants cellulaires, comme par exemple les acides gras polyinsaturés [103]. De plus, la cystéine et la méthionine sont des acides aminés sensibles à l'oxydation via les ROS [104].

Un excès de ROS a été associé à des pathologies diverses comme certaines maladies cardiovasculaires, le cancer, des troubles neurologiques comme la maladie de Parkinson, ou encore le diabète [105-108].

L'organisme dispose de systèmes de défense contre les ROS, et ce à différents niveaux. Tout d'abord, il existe des systèmes visant à limiter la formation de ROS : par exemple, certaines enzymes comme la ribonucléotide réductase ont une structure tridimensionnelle qui leur permet d'empêcher les ROS qu'elles produisent de se propager dans le milieu [109].

Ensuite, il existe des systèmes permettant de transformer les ROS en métabolites non toxiques. Il existe deux types de ces systèmes dits antioxydants : des enzymes antioxydantes et des composés antioxydants non enzymatiques. Les enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la glutathion peroxydase (GPx). La SOD catalyse la dismutation de l'anion $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2, moins réactif, la CAT catalyse la conversion du H_2O_2 en eau, et la GPx réduit le H_2O_2ou les peroxydes $ROO^{\cdot}$en H_2O ou en ROH, tout en

oxydant le glutathion (GSH sous sa forme oxydée, GSSH sous sa forme réduite) [98]. On peut également compter d'autres enzymes qui, bien que n'étant pas directement antioxydantes, participent à l'élimination des ROS, comme l'Hème-Oxygénase-1 (HO-1). Cette dernière catalyse une des étapes de la dégradation de l'hème pour donner du fer, du monoxyde de carbone et de la biliverdine. Cette dernière est convertie en bilirubine, un puissant antioxydant [110].

Les antioxydants non enzymatiques comprennent l'acide ascorbique (Vitamine C), l'α-tocophérol (Vitamine E), le GSH, les caroténoïdes, et les flavonoïdes. Ces molécules ont la capacité de piéger les ROS dans leur structure, et donc protègent les autres composants cellulaires des effets des ROS [98].

Enfin, il existe des systèmes capables de réparer les lésions provoquées par les ROS : des lipases ou protéases sont capables de reconnaître et de dégrader les lipides ou protéines modifiées par les ROS, et il existe des systèmes capables de réparer l'ADN [111, 112].

- Production de ROS suite à l'exposition aux NP de TiO_2 et de NC

La production de ROS par des cellules exposées aux NP a été observée pour un certain nombre de NP [113, 114]. C'est également le cas pour le TiO_2, à la fois *in vivo* [115] et dans différents types cellulaires : fibroblastes [116], cellules épithéliales [117], microglie [118]… En revanche, d'autres études montrent que les NP de TiO2 n'induisent pas de stress oxydant [73, 113]. En ce qui concerne les NP de NC, plusieurs études, à la fois *in vitro*, sur des cellules de la lignée 16HBE [79] et *in vivo* sur des rats [119] ont démontré que les NP de NC étaient capables d'induire du stress oxydant.

Une des voies de signalisation modifiées par les ROS est la voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) [120]. Cette voie implique l'activation de facteurs de transcription nucléaire, lesquels contrôlent l'expression d'un très grand nombre de gènes. Parmi ces facteurs de transcription, on compte NF-κB, qui est impliqué dans la réponse inflammatoire ; l'Activator Protein-1 (AP-1), qui contrôle des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, l'inflammation, l'apoptose et la différenciation. On compte également p53, une protéine suppresseur de tumeurs qui joue de nombreux rôles dans la défense cellulaire qui peut également avoir un rôle pro ou antioxydant, ou le Nuclear Factor of activated T Cells qui régule la formation des cytokines, la croissance musculaire, l'angiogénèse et l'adipogénèse. Enfin, il existe l'Hypoxia Inducible Factor, qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans le cancer comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [120].

La production de ROS par les cellules exposées aux NP est donc susceptible d'avoir des conséquences sur l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier, les gènes de l'inflammation du fait de l'activation potentielle de NF-κB et AP-1 [121, 122].

Un tableau récapitulatif des effets *in vitro* des NP de TiO_2 et de NC est présenté dans les Tableaux 1.2 et 1.3, respectivement.

Référence	Particules (taille)	Modèle cellulaire, dose, durée d'exposition	Paramètres évalués	Principaux résultats
Hamilton et al. 2009 [69]	TiO_2 NP (60-200 nm). NT courts (60-300 nm*0.8-4 µm). NT longs (60-300*15-30 µm).	Macrophages alvéolaires de souris normales et de souris KO pour MARCO (culture primaire). 50-100 µg/mL. 1h-24h.	MET. Toxicité (bleu trypan). Stress oxydant (peroxydation lipidique). Sécrétion IL-1β, IL-18 (ELISA).	NT courts et NP internalisés dans lysosomes. NT longs dans lysosomes et libres dans cytoplasme. Internalisation indépendante de MARCO. Tous les TiO_2 induisent du stress oxydant. NT longs cytotoxiques et induisent la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18.
Park et al. 2008 [70]	TiO_2 (21 nm).	BEAS-2B (lignée de cellules épithéliales bronchiques). 5-40 µg/mL. 24h-96h.	Toxicité (MTT). Stress oxydant (DCFH-DA, GSH). Apoptose (activité Caspase-3, condensation des chromosomes). Expression de gènes de l'inflammation et du stress oxydant (RT-PCR).	Toxicité temps- et dose- dépendante. Stress oxydant dose-dépendant. Sécrétion d'IL-8. Apoptose.
Simon-Deckers et al. 2008 [71]	Al_2O_3 (25 nm). TiO_2 (12 nm, 25 nm, 142 nm). NT de TiO_2 (6*68 nm). MWCNT, (0.1-12 µm*10-160 nm et 0.1-3.5 µm*10-160 nm).	A549 (lignée de cellules épithéliales alvéolaires cancéreuses). 0.1-100 µg/mL. 24h-72h.	Toxicité (MTT, LDH, WST-1, XTT). MET.	Toxicité du MWCNT > Al_2O_3 et TiO_2. Internalisation et distribution dans le cytoplasme et dans les vésicules.
Hussain et al. 2010 [72]	TiO_2 (15 nm). NC (13 nm).	16HBE (lignée de cellules épithéliales bronchiques). 10-40 µg/cm². 30 min-24h.	MET. Toxicité : Fluorescéine diacétate et bromure d'éthidium. Stress oxydant (hydroéthidine, DCFH-DA, peroxydation lipidique). Apoptose (fragmentation ADN, activité des caspases 3, 7 et 8). Potentiel mitochondrial. Perméabilité lysosomale (acridine orange).	Apoptose. Stress oxydant. NC : diminution du potentiel mitochondrial, relargage de cytochrome c des mitochondries. TiO_2 : peroxydation lipidique, déstabilisation des lysosomes, relargage de cathepsine B.
Fujita et al. 2009 [73]	TiO_2 (7 nm). TiO_2 (20 nm). TiO_2 (200 nm).	HaCaT (lignée de kératinocytes humains). 47-60 µg/mL. 2h-24h.	Toxicité (MTT). Analyse microarray.	Toxicité. Gènes surexprimés : inflammation, adhésion cellulaire. Pas de surexpression de gènes du stress oxydant ou de l'apoptose. TiO_2 7 nm : surexpression MMP-9, MMP-10, fibronectine-1, intégrine-6, mucine-4

Référence	Particules (taille)	Modèle cellulaire, dose, durée d'exposition	Paramètres étudiés	Principaux résultats
Falck et al. 2009 [76]	TiO_2 : rutile (10*40 nm). Anatase (<25 nm). Rutile (<5 µm).	BEAS-2B. 1-100 µg/cm². 24h-72h.	Test des comètes. Test micronoyaux.	Test des comètes : anatase > rutile 5 µm > rutile 10*40 nm. Test micronoyaux : seule l'anatase a un effet.
Bhattacharya et al. 2009 [77]	TiO_2 (<100 nm). Fe_2O_3 (<100 nm).	BEAS-2B. IMR90 (Lignée fibroblastes bronchiques). 2-50 µg/cm². 6h-24h.	MET. Toxicité (bleu trypan). Génotoxicité (test des comètes). Stress oxydant (spectroscopie par résonance paramagnétique, DCFH-DA, mesure de 8-OHdG).	NP dans cellules, pas dans noyau ou mitochondries. Toxicité : Fe_2O_3 > TiO_2. Test des comètes : pas d'effet du TiO_2, effet du Fe_2O_3. Stress oxydant : TiO_2 > Fe_2O_3.
Hussain et al. 2009 [79]	TiO_2 (15 nm). TiO_2 (25-75 nm). NC (13nm). NC (21 nm). NC (96 nm).	16HBE. 5-20 µg/cm². 4h-24h.	MET. Stress oxydant (dithiothreitol ethydroéthidine). Sécrétion GM-CSF (ELISA, RT-PCR).	Internalisation dose-dépendante. Stress oxydant intracellulaire. CB NP seules produisent du stress oxydant. Production GM-CSF. Effet dépendant du stress oxydant, de la surface spécifique et de la quantité de NP.
Gibbs-Flournoy et al. 2011 [80]	TiO_2 (27 nm).	BEAS-2B. 0.5-2.5 µg/mL. 5 min-2h.	Microscopie à champ sombre et microscopie confocale à balayage laser.	Internalisation temps-dépendante TiO_2 dans le noyau.
Singh et al. 2007 [81]	TiO_2 (20-80 nm). TiO_2 (40-300 nm) + avec méthylation de surface	A549 16-400 µg/cm². 2h-24h.	MET. Stress oxydant (spectroscopie par résonance paramagnétique). Sécrétion d'IL-8 (RT-PCR, ELISA)	Internalisation : endocytose et endocytose clathrine dépendante (NP de TiO_2) Stress oxydant pour NP de TiO_2 Sécrétion d'IL-8 pour NP de TiO_2 à 400 µg/cm² Peu d'effet de la méthylation
Pan et al. 2009 [83]	TiO2 Rutile (15-60 nm). Rutile traité (15-60 nm). Anatase (200 nm).	Lignée (fibroblastes dermiques humains). 0.4-0.8 mg/mL. 6 jours.	Aire des cellules. Prolifération cellulaire. Force de traction cellulaire. Migration cellulaire. Contraction d'un gel de collagène. MET. Présence d'α-actine (Western Blot). Stress oxydant (H_2O_2).	Diminution de l'aire des cellules, de la prolifération, de la mobilité, et la contraction des gels de collagène, stress oxydant. Internalisation dans des vésicules. Traitement de surface : pas d'internalisation, baisse du stress oxydant, diminue les effets du TiO_2 seul.
Val et al. 2009 [74]	TiO_2 (15 nm). NC (13 nm).	16HBE. 10-160 µg/cm². 24h.	Toxicité (WST-1). Mesure de cytokines inflammatoires (ELISA, RT-PCR). Test d'adsorption des cytokines sur les NP.	Toxicité. Sécrétion d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8, de GM-CSF, de TNF-α, de CXCL2. Adsorption des cytokines sur les NP, avec désorption par ajout de SVF ou d'ASB.

Tableau 1.2 : résumé des études décrivant les effets *in vitro* des NP de TiO_2.

8-OH-G : 8-Hydroxyguanosine, ASB : Albumine de Sérum Bovin, CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand, DCFH : 2,7 Dichlorofluoréscine Diacétate, DTT : dithiothreitol, ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay, Fe_2O_3 : Maghémite, GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor, GSH : gluthathion, IL : Interleukine, KO : Knock-Out, LDH : Lactate Déshydrogénase, MARCO : Macrophage Receptor with Collagenous structure, MET : Microscopie Electronique à Transmission, MTT : Bromure de de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium, MWCNT : Nanotube de Carbone Multifeuillet, NC : Noir de Carbone, NP : Nanoparticule, NT : Nanotube, PCR : Polymerase Chain Reaction, SVF : Sérum de Veau Fœtal, SWCNT : Nanotube de Carbone Monofeuillet, TiO_2 : Dioxyde de Titane, TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α, XTT : 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxyde, WST-1 : 4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzène disulfonate.

Référence	Particules (taille)	Modèle cellulaire, dose, durée d'exposition	Paramètres étudiés	Principaux résultats
Saxena et al. 2008 [85]	Particule Diesel (120 nm). NC (12 nm).	LA4 (lignée cellules épithéliales de souris). MHS (lignée macrophages alvéolaires de souris). 50 µg/mL. 3h-24h.	Analyse de la quantité de carbone internalisée dans les cellules (transmittance thermo optique). Utilisation de cytochalasine D (100 µg/mL).	Particule diesel : quantité internalisée égale dans les 2 types cellulaires. NC : MHS > LA4. Diesel plus internalisé que NC. Cytochalasine D : diminution de l'internalisation.
Don Porto Carero et al. 2001 [75]	NC (100 nm). Particule Diesel (400 nm). Particules de la pollution atmosphérique (4 µm).	A549. THP-1 (lignée monocytes /macrophages humains). 16 ng/mL-16 µg/mL. 48h.	Toxicité (Bleu Alamar). Test des comètes.	Pas de toxicité. Dommages à l'ADN.
Mroz et al. 2007 [78]	NC (14 nm). NC (14 nm) + Benzo(a)pyrène (BaPNC). NC (206 nm).	A549. 100 µg/mL. 1h-24h.	Test des comètes. Cycle cellulaire. Expression p53 (Western Blot). Liaison à l'ADN de NF-κB et AP-1 (EMSA). Antioxydant : NAC.	Dommages à l'ADN. Altération de la cinétique du cycle cellulaire. Phosphorylation de p53. Liaison de NF-κB et AP-1 à l'ADN. NC 14 nm > BaPNC > NC 260 nm. Effet NAC : diminue les effets du NC.
Øvrevik et al. 2009 [91]	NC (12-17 nm). SiO_2 (1.6 µm).	A549. BEAS-2B. 1.25-20 µg/cm². 5h-24h.	Expression de cytokines proinflammatoires (ELISA, RT-PCR). Utilisation de $ZnCl_2$, $FeSO_4$, 1-nitropyrene (1-NP) Lipopolysaccharide	En nombre de gènes induits, SiO_2, $ZnCl_2$, LPS > 1-NP > NC > FeSO4. NC : induction de CXCL-8, -10 et -11. Réponse commune : induction des chémokines au motif CXC.

Tableau 1.3 : résumé des études décrites sur les effets *in vitro* des NP de NC.

AP-1 : Activator Protein-1, CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand, ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay, EMSA : Electromobility Shift Assay, NAC : N-Acétyl Cystéine, NF-κB : Nuclear Factor-κB, NC : Noir de Carbone, PCR : Polymerase Chain Reaction, SiO_2 : silice.

2.3) Etudes in vivo

2.3.1) Modèles d'administration

Différents modèles d'exposition pulmonaire aux nano-objets ont été utilisés dans les études sur leurs effets. Le modèle d'exposition par inhalation reproduit le mieux la voie d'exposition réelle [123]. Cependant, et particulièrement lors d'études sur les nano-objets, le modèle par inhalation devient difficile à réaliser, en raison de l'évaluation de la quantité de produit déposée dans les poumons qui est moins évidente dans le cas des nano-objets. De plus, l'état d'agrégation des nano-objets peut varier entre le moment de leur synthèse et le moment où ils atteignent le poumon, ce qui fait que les nano-objets dans le poumon peuvent avoir des propriétés physicochimiques et donc potentiellement des effets biologiques différents de ceux des nano-objets dans l'air.

D'autres modèles ont donc été utilisés, en particulier l'instillation intratrachéale, au cours de laquelle les nano-objets en suspension sont directement injectés dans la trachée préalablement découverte. Ce modèle présente certains avantages par rapport à l'inhalation : il permet de mieux contrôler la quantité de produit déposée dans les poumons. Enfin, il est plus simple à réaliser que l'inhalation. Ces raisons font que, bien qu'il existe d'autres modèles d'exposition respiratoire, celui de l'instillation intratrachéale reste le modèle le plus utilisé à l'heure actuelle. Cependant, il présente des inconvénients : la technique de distribution du produit est invasive (puisqu'elle implique d'ouvrir la trachée des animaux) et peu représentative d'une exposition réelle, et la distribution du produit dans le tractus respiratoire peut s'avérer différente de celle observée lors d'une exposition par inhalation [123].

Une étude comparative de ces deux modèles a été effectuée sur des rats, qui étaient exposés à différentes particules de TiO_2. Les résultats ont indiqué que les particules induisaient les mêmes effets dans les deux modèles en termes de cytotoxicité et d'inflammation [124]. Cependant, une autre étude, qui portait sur les effets génotoxiques de NP de NC sur des souris gestantes, a indiqué des différences entre les résultats des deux modèles, à savoir qu'après l'inhalation des NP de NC on observait plus de cassures de brins d'ADN dans le foie des mères et de leurs petits, ce qui n'était pas le cas lorsqu'on instillait par voie intratrachéale les mères avec les mêmes NP de NC [125]. Ceci montre que le choix du modèle d'exposition est important.

Il existe d'autres modèles d'administration, moins utilisés que l'inhalation et l'instillation intratrachéale. Par exemple, l'instillation intranasale consiste à introduire le produit au niveau

des cavités nasales de l'animal. Un autre modèle d'administration est l'administration oropharyngée, dans lequel le produit est déposé dans le pharynx via une canule reliant le pharynx à la bouche de l'animal.

Les études concernant les effets *in vivo* des NP de TiO_2 et de NC ont observé différents paramètres : leur toxicité, leur capacité à induire une réponse inflammatoire, des modifications histologiques, ou diverses pathologies.

2.3.2) Cytotoxicité des NP de TiO_2 et de NC

2.3.2.1) Cytotoxicité des NP de TiO_2

Les études *in vivo* qui ont été menées ont permis de mettre en lumière plusieurs effets des particules de TiO_2, qu'il soit micrométrique ou nanométrique. Certaines ont démontré que les particules de TiO_2 pouvaient être cytotoxiques, en utilisant 2 techniques : le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH, une enzyme normalement cytoplasmique) dans le Lavage Bronchoalvéolaire[23] (LBA) des animaux, et la mesure de la perméabilité membranaire, qui se fait en dosant la quantité totale de protéines dans le LBA des animaux exposés. Si on dose une quantité de protéines plus importante dans le LBA d'un animal exposé par rapport à un animal contrôle, cela signifie que des cellules ont été lésées et ont relargué leurs protéines dans la lumière du tractus respiratoire. Différentes études ont observé une telle cytotoxicité : dans l'une d'elles, les auteurs ont exposé des rats à des particules de TiO_2 enrobé avec de l'aluminium par instillation intratrachéale pour une dose de 10 mg/kg et ont mesuré la réponse cytotoxique des particules de TiO_2 24 heures après cette instillation [124]. Dans une autre série d'études, les auteurs ont exposé des rats ou des souris à des NP de TiO_2 de 21 nm, par inhalation à une dose de 10 mg/ m^3 jusqu'à 13 semaines et ont observé une toxicité dans les deux espèces jusqu'à 13 semaines suivant la fin de l'exposition [126]. Les auteurs ont observé le même résultat en utilisant des particules de TiO_2 de 1.4 µm de diamètre administrées par inhalation à 50 mg/m^3 pendant 13 semaines de chez des rats et des souris [127]. Par contre, d'autres études ont démontré que ce n'était pas toujours le cas : Warheit et coll. [128] ont observé une absence de cytotoxicité de particules de TiO_2 de rutile de 150 nm de diamètre administrées à des doses de 1 et 5 mg/kg par instillation intratrachéale à des rats. De même, dans une étude de Warheit et coll., les auteurs ont observé une cytotoxicité après exposition de rats à des particules micrométriques et des NP de TiO_2 en exposant les animaux avec 2

[23] Liquide physiologique injecté dans les bronches et les alvéoles puis récupéré

protocoles différents : en sacrifiant les animaux 24 heures après une instillation intratrachéale de 2 à 10 mg/kg, et 24 heures après une inhalation à 4 semaines à 1130-1300 mg/m^3.
Une autre étude menée par Chen et coll. [6] a observé de l'apoptose dans les poumons de souris, 7 jours après une instillation intratrachéale de NP de TiO_2 de 20 nm de diamètre pour des doses de 0.1 à 0.5 mg/animal.

2.3.2.2) Cytotoxicité et NP de NC

Une étude a comparé les effets d'une instillation intratrachéale de 125 µg de particules de NC de 14 nm et 260 nm de diamètre chez des rats, et a observé que les NP de NC de 14 nm induisaient une cytotoxicité via le dosage de la LDH dans le LBA, ce qui n'était pas le cas pour les particules de NC de 260 nm de diamètre [129].

2.3.3) Induction d'une réponse inflammatoire par les NP de TiO_2 et de NC

2.3.3.1) Inflammation et NP de TiO_2

Pour mesurer l'induction d'une réponse inflammatoire chez l'animal, il existe différentes méthodes. Une première méthode consiste en la numération des cellules de l'inflammation présentes dans le LBA des animaux. Le LBA représente en effet un moyen simple d'observer des anomalies reflétant des lésions pulmonaires [130]. On peut soit mesurer la cellularité totale du LBA, soit la cellularité dite différentielle, qui correspond à la numération des différents types cellulaires. Une deuxième méthode consiste à doser une ou plusieurs cytokines de l'inflammation, dans le LBA ou dans les tissus des animaux. Certaines études s'intéressant à la toxicité des NP de TiO_2 ont observé une augmentation du nombre de cellules de l'inflammation dans le LBA des animaux suite à une exposition aux NP de TiO_2 : par exemple, l'étude de Chen et coll. [6] mentionne une augmentation du nombre de macrophages dans le LBA des souris ayant été instillées avec du TiO_2 nanométrique. C'est aussi le cas de l'étude de Ahn et coll. [131], dont les auteurs observent une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles chez des souris ayant reçu une instillation intratrachéale de NP de TiO_2 à une dose de 4 mg/kg. C'est également le cas d'une étude de Yazdi et coll. [132], dont les auteurs observent une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles présents dans le LBA de souris ayant reçu une instillation intranasale de NP de TiO_2. Cependant, certaines études n'ont observé, en analysant le LBA, qu'une inflammation faible, voire absente [128, 133]. D'autres, comme celles réalisées par l'équipe de Bermudez [126, 127], observent une inflammation dépendant du modèle

expérimental, les hamsters développant une réponse inflammatoire moins importante après exposition aux particules et NP de TiO_2 par rapport aux souris ou aux rats.
Le fait que certaines études observent une toxicité des NP de TiO_2 et pas d'autres peut s'expliquer par des différences entre les doses employées : les doses utilisées dans les études observant une forte inflammation s'échelonnaient entre 4 et 30 mg/kg, alors que les études observant une inflammation faible ou nulle se situaient entre 0.2 et 4 mg/kg. De plus, les études réalisées par l'équipe de Bermudez [126, 127] montrent bien l'importance de la cinétique de l'exposition, l'inflammation en réponse à l'inhalation de particules et de NP de TiO_2 étant, dans ces études, transitoire.

Il a été observé une augmentation de l'expression de certains facteurs de l'inflammation après exposition au TiO_2 : il a été observé une plus grande expression d'IL-13 après instillation intratrachéale de particules de TiO_2 de 290 nm de diamètre à une dose de 4 mg/kg sur des rats [131]. De plus, il a été observé, dans une étude de Yazdi et coll. [132], que l'instillation intranasale de NP de TiO_2 (15 mg/kg) sur des souris pouvait conduire à une augmentation de l'expression de l'IL-1α, de l'IL-1β, du TNF-α. Ces facteurs sont des cytokines inflammatoires [134]. De plus, dans l'étude de Chen et coll. [6], il a été observé une modification de l'expression de plus de 500 gènes. Parmi ces gènes, on observe l'augmentation de l'expression de plusieurs facteurs liés au VEGF, des G Protein Coupled Receptors (GPCR), des régulateurs de croissance cellulaire, ainsi que d'autres facteurs chémotactiques et immunitaires. Les auteurs mentionnent particulièrement l'augmentation de l'expression du Placenta Growth Factor (PlGF), du CXCL1, du CXCL5 ou du Chemokine C-C motif ligand 3 (CCL3). Ces facteurs sont des chémoattractants pour les neutrophiles et jouent, de ce fait, un rôle dans la réaction inflammatoire ; l'augmentation de leur expression dans les poumons des animaux indique donc l'induction d'une réponse inflammatoire suite à l'exposition aux NP de TiO_2.

2.3.3.2) Inflammation et NP de NC

Une étude de Li et coll. [129] a observé un afflux de polynucléaires neutrophiles persistant jusqu'à 7 jours après l'instillation de NP de NC de 14 nm chez des rats, résultat non observé après exposition aux particules de NC de 260 nm. Dans une autre étude réalisée par Shwe et coll. [135], les auteurs ont exposé des souris à 25 µg, 125 µg et 625 µg de NP de NC de 14 nm de diamètre et 125 µg de NP de NC de 95 nm de diamètre par instillation intratrachéale, à raison d'une instillation par semaine pendant 4 semaines, et ont étudié les effets de

l'exposition aux NP de NC sur les LBA et les poumons des animaux 4 heures après la dernière instillation. Ils ont observé, pour les NP de NC, une augmentation du nombre total de cellules ainsi que du nombre de macrophages, lymphocytes et neutrophiles chez les animaux exposés aux NP de NC, et ce de façon dose-dépendante. De plus, Teeguarden et coll. [136] ont étudié l'effet de NP de NC de 14 nm sur des souris exposées par aspiration pharyngée 2 fois par semaine pendant 3 semaines (40 µg par animal et par exposition) en termes de cellularité du LBA, de protéomique et d'histologie. L'exposition aux NP de NC a entraîné une augmentation du nombre total de cellules dans le LBA ainsi que du nombre de macrophages et de polynucléaires neutrophiles.

En ce qui concerne l'expression des marqueurs de l'inflammation, l'étude de Shwe et coll. a observé une augmentation de l'expression d'IL-1β, d'IL-6 et de TNF-α dans le LBA des animaux, et les poumons des animaux contenaient plus de CCL3. De plus, dans l'étude de Teeguarden et coll. [136] l'exposition aux NP de NC a entraîné une sécrétion accrue de facteurs impliqués dans l'inflammation comme l'IL-12, la Macrophage-Derived Cytokine ou le CCL3. Les auteurs ont également observé un dépôt de collagène dans les poumons des animaux, ainsi qu'une histiocytose[24]. L'exposition aux NP de NC a modifié l'expression de 184 protéines, regroupées en catégories relatives à l'inflammation, à la réponse immunitaire, à la fibrose, au remodelage pulmonaire, ou encore à l'apoptose.

2.3.4) Induction et aggravation de pathologies par les NP de TiO_2 et de NC

2.3.4.1) Induction et aggravation de pathologies par les NP de TiO_2

En ce qui concerne les modifications histologiques, l'étude de Chen et coll. [6] a démontré qu'une exposition à des NP de TiO_2 pouvait entraîner, chez la souris, des lésions histologiques qui ressemblaient à celles observées chez des animaux atteints d'emphysème pulmonaire. Ce dernier se caractérise par la destruction des parois alvéolaires. C'est la seule étude référencée à l'heure actuelle indiquant que les NP de TiO_2 peuvent entraîner un emphysème.

Enfin, plusieurs études, résumées dans le rapport de l'IARC [63] ont montré qu'une exposition chronique aux particules de TiO_2 pouvait donner lieu à des cancers. Par exemple, dans l'étude de Pott et Roller [137], les auteurs ont exposé des rats à des NP de TiO_2 par instillation intratrachéale et ont observé que la proportion de rats développant des tumeurs bénignes et malignes était supérieure chez les rats ayant été exposés au TiO_2.

[24] Accumulation dans les tissus de macrophages ou d'histiocytes (macrophages du tissu conjonctif)

Si de nombreuses études se sont intéressées aux effets de NP de TiO_2 sur des animaux sains, peu d'études se sont intéressées aux effets de NP de TiO2 sur un contexte de pathologie déjà instaurée. Hussain et coll. [133] ont observé les effets d'une administration oropharyngée de 0.8 mg/kg de NP de TiO_2 de 15 nm dans un modèle d'asthme induit par du toluène-2,4-diisocyanate chez la souris. Ils ont observé, 2 jours après l'administration des NP, que le TiO_2 avait pour conséquence une augmentation de l'Hyperréactivité Bronchique (HRB), un afflux de macrophages et de polynucléaires neutrophiles dans le LBA, ainsi que des lésions histologiques (œdème, lésions épithéliales, inflammation) [133]. Une autre étude, cependant, a porté surl'effet d'une inhalation à raison de 10 mg/m^3de deux particules de TiO_2 (une NP de dimensions 10*40 nm et une particule de diamètre inférieur à 5 µm) sur des souris normales ou dans un modèle d'asthme induit par ovalbumine (OA) [138]. Les auteurs ont observé, après 4 semaines d'exposition aux 2 types de TiO_2, que les LBA des animaux asthmatiques présentaient moins de leucocytes que leurs pendants non asthmatiques, une diminution de l'HRB dans leurs poumons, ainsi qu'une diminution de l'expression de presque tous les médiateurs impliqués dans l'inflammation étudiés, à l'exception de CXCL5, lequel était plus exprimé après exposition aux NP de TiO_2.

2.3.4.2) Induction et aggravation de pathologies par les NP de NC

Plusieurs études, qui sont résumées dans le rapport de l'IARC, indiquent qu'une exposition aux particules de NC peut entraîner à des cancers pulmonaires [63]. Par exemple, dans une étude de Pott et coll. [139], les auteurs ont exposé des rats à des NP de NC de 90 nm par instillation intratrachéale, à raison d'une instillation intratrachéale par semaine pendant 15 semaines, la dose utilisée étant de 3 mg par animal. A la fin de l'étude, 65% des animaux présentaient des tumeurs, ce qui n'était pas le cas des animaux contrôle.

Les effets du NC sur des pathologies préexistantes ont fait l'objet de plusieurs études. Il a été démontré qu'une instillation intratrachéale de 4 mg/kg de NP de NC de 14 nm pouvait, 24 heures après exposition, augmenter l'inflammation induite par une endotoxine bactérienne (le LPS) chez la souris. Cette exposition aux NP de NC aggravait également l'œdème pulmonaire et l'induction de l'IL-1β, de CCL3 et de MIP-2 par rapport aux animaux traités avec le LPS seul [119]. L'effet de NP de NC sur un modèle de maladie pulmonaire de type asthme a été évalué sur des souris : des NP de NC de 14 nm et 56 nm de diamètre ont été administrées par instillation intratrachéale à raison d'une instillation par semaine pendant 6 semaines (50 µg) en même temps que de l'ovalbumine (OA, dose 1 µg). Les NP de NC ont augmenté les effets

de l'OA en termes d'infiltration d'éosinophiles, de polynucléaires neutrophiles et de monocytes dans le LBA, d'augmentation du nombre de cellules caliciformes dans l'épithélium bronchique, de sécrétion d'IL-5, d'IL-6, d'IL-13, et de CCL2, les NP de 14 nm ayant plus d'effet que les NP de 56 nm. Les souris exposées aux NP de 14 nm présentaient des taux d'Immunoglobuline E (IgE) dans le sérum plus élevés comparées aux souris exposées aux NP de 56 nm. De plus, les NP de NC de 14 nm seules induisaient un afflux de cellules dans le LBA ainsi qu'une expression de Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1, également appelée CCL2) plus importante que chez le contrôle [140]. Il a également été démontré que les NP de NC de 14 nm, administrées par instillation intratrachéale (10 µg/animal) à des souris dans un modèle de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine, pouvaient aggraver les effets de cette dernière. En effet, ces NP de NC augmentaient la réponse à la bléomycine en termes de dépôt de collagène, de diminution de la compliance[25] du poumon, de modifications histologiques de type fibrotiques, de nombre de cellules inflammatoires dans le LBA et de cytokines de l'inflammation et les médiateurs profibrosants. En revanche, les NP de NC seules n'avaient pas d'effet sur les souris non traitées à la bléomycine [141]. Enfin, les NP de NC peuvent aggraver l'emphysème pulmonaire. Dans une étude d'Inoue et coll. [142], des NP de NC de 14 nm et 56 nm ont été instillées à raison de 4 mg/kg en même temps que de l'élastase pancréatique porcine. Il a été démontré que l'exposition aux NP de NC de 14 nm était suivie d'une inflammation pulmonaire sur les animaux n'ayant pas reçu d'élastase et qu'elle aggravait l'effet de l'élastase en termes d'infiltration de polynucléaires neutrophiles dans le LBA le lendemain de l'instillation, en même temps qu'une sécrétion d'IL-1β et de CXCL1. De plus, 14 jours après l'instillation, les NP de NC de 14 nm aggravaient l'effet de l'élastase en termes de modifications morphologiques de type emphysème. En revanche, les NP de 56 nm seules provoquaient une inflammation mais sans modifier l'effet de l'élastase.

Un récapitulatif des résultats des études citées concernant les effets *in vivo* des NP de TiO_2 et de NC est présenté dans les Tableau 1.4 et 1.5.

[25] Capacité du poumon à augmenter sa capacité (le volume pulmonaire) en réponse à une diminution de pression

Référence	Particules (taille)	Espèce animale/sexe	Modèle d'exposition	Paramètres étudiés	Principaux résultats
Warheit et al. 2005 [124]	6 TiO_2 (différents traitements de surface au SiO_2 et à l'Al_2O_3, taille jusqu'à 440 nm).	Rat *CD IGS.* Mâle.	Inhalation 4 semaines, 6h/jour, 5 jours/semaine. 1130-1300 mg/m^3. Observations 2 semaines à 1 an après. Instillation intratrachéale 2-10 mg/kg. Observations 24h à 3 mois après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Perméabilité pulmonaire (protéines LBA). Cytotoxicité (LDH). Histopathologie.	Inhalation: infiltration de macrophages contenant des NP. Hyperplasie des cellules épithéliales, dépôt de collagène. Instillation intratrachéale : infiltration de PN, macrophages contenant des NP. Cytotoxicité. SiO_2 et Al_2O_3 augmentent la toxicité.
Bermudez et al. 2004 [126]	TiO_2 (21 nm).	Souris *B3C3F1/CrlBR.* Rat *CDF (F344)/CrlBR.* Hamster *Lak: LVG BR.*	Inhalation 13 semaines, 6h/jour, 5 jours/semaine. 0.5, 2 ou 10 mg/m^3. Observations 4 à 52 semaines après.	Inflammation (LBA et histologie). Charge particulaire du poumon. Cytotoxicité (LDH) Perméabilité membranaire (protéines LBA).	Charge particulaire diminue avec le temps. Infiltration dans LBA (macrophages et PN). Cytotoxicité (sauf hamsters). Résultats dépendent de l'espèce (rats>souris>hamsters) et de la concentration.
Bermudez et al. 2002 [127]	TiO_2 (1.40 µm).	Souris *B3C3F1/CrlBR.* Rat *CDF (F344)/CrlBR.* Hamster *Lak: LVG BR.*	Inhalation 13 semaines, 6h/jour, 5 jours/semaine.. 10, 50 ou 250 mg/m^3. Observations 4 à 52 semaines après.	Inflammation (LBA et histologie). Charge particulaire du poumon. Cytotoxicité (LDH). Perméabilité membranaire (protéines LBA).	Diminution de la clairance des particules à haute concentration. Clairance plus efficace pour les hamsters. Réponse inflammatoire, plus sévère et persistante chez les rats. Cytotoxicité (moins importante chez hamsters). Résultats dépendent de l'espèce et de la concentration.
Warheit et al. 2007 [128]	TiO_2 Rutile (380 nm). Rutile (136 et 149 nm). 1 mélange anatase/ rutile (A/R, 129 nm).	Rat *CD IGS.* Mâle.	Instillation intratrachéale 1 et 5 mg/kg. Obervations 24h à 3 mois après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Perméabilité pulmonaire (protéines LBA). Cytotoxicité (LDH). Activité sécrétoire des cellules épithéliales (phosphatase alcaline). Histopathologie.	Infiltration de PN. Pas de cytotoxicité, d'augmentation de la perméabilité, d'augmentation de l'activité sécrétoire ou de changements morphologiques observés sauf pour mélange A/R.

Article	Particules (taille)	Espèce animale/sexe	Modèle d'exposition	Points clés	Principaux résultats
Chen et al. 2006 [6]	TiO_2 (18-21 nm). (180-250 nm).	Souris *ICR*. Mâle.	Instillation intratrachéale 0.1 et 0.5 mg/ animal. Observations 3 jours à 2 semaines après.	Analyse morphologique. Apoptose (TUNEL) Immunohistochimie (antiPCNA). Microarray, RT-PCR & Western Blot (P1GF).	Lésions emphysémateuses. Infiltration de macrophages contenant des NP. Apoptose. Induction de gènes de l'inflammation. Augmentation de PlGF. Pas de modification pour le TiO_2 micrométrique.
Ahn et al. 2005 [131]	TiO_2 (0.29 µm).	Rat *Sprague-Dawley*. Mâle.	Instillation intratrachéale 4 mg/kg. Observations 4h à 72h après.	Cellularité LBA. Nombre de cellules caliciformes. Expression de Muc5ac (indicateur de la sécrétion de muscus). Production d'IL-13. Histologie.	Augmentation des PN, éosinophiles et cellules caliciformes. Augmentation de l'expression de Muc5ac. Augmentation d'IL-13.
Yazdi et al. 2011 [132]	TiO_2 (20 et 80 nm).	Souris : normales, caspase-1 KO, IL1R KO, ASC KO, IL1α KO ou NLRP3 KO. *C57BL/6J*.	Instillation intranasale 7.5-30 mg/kg. Observations 6h après.	Cellularité du LBA, mesure d'IL-1α, mesure d'IL-1β, IL-6, TNF-α (ELISA) dans le LBA et dans le poumon total	Afflux de PN dépendant d'IL1R, de la Caspase-1 et d'ASC. Induction d'IL-1α, d'IL-1β, IL-6, et TNF-α dans LBA. Induction d'IL-1α et d'IL-1β dans le poumon total.
Hussain et al. 2011 [133]	TiO_2 (15 nm).	Souris *BALB/c*. Mâle.	Administration oropharyngée 0.8 mg/kg Modèle d'asthme : 0.3% TDI. Observations 24 après.	HRB Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Histologie du poumon. IgE dans le sérum.	Souris + TDI+TiO_2 vs souris+TDI : Augmentation de l'HRB, afflux de PN et macrophages, œdème, lésions épithéliales, inflammation.
Rossi et al. 2010 [138]	TiO_2 (10*40 nm). TiO_2 (< 5µm).	Souris *BALB/c*. Femelle.	Inhalation 4 semaines, 2h/jour, 3 jours/semaine. 10 mg/m^3. Modèle d'asthme à l'OA (20 µg). Observations 24h après.	HRB. LBA. Cytokines de l'inflammation (RT-PCR, Elisa, luminex). Anticorps du sérum (ELISA). Analyse du mucus.	Souris+OA+TiO_2 vs souris+OA : Diminution des éosinophiles/leucocytes. Diminution du nombre de cellules caliciformes. Diminution de l'HRB. Diminution de l'expression des cytokines observées (sauf CXCL5). Diminution des taux d'IgE.

Tableau 1.4 : résumé des études décrivant les effets *in vivo* des NP de TiO_2.

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand, HRB : Hyperréactivité Bronchique, IgE : Immunoglobuline E, IL : Interleukine, KO : Knock-Out, LBA : Lavage Bronchoalvéolaire, LDH : Lactate Déshydrogénase, Muc5a : Mucine5a, NC : Noir de Carbone, NP : Nanoparticule, OA : Ovalbumine, PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen, PlGF : Placenta Growth Factor, PN : Polynucléaire Neutrophile, TDI : Toluene Diisocyanate, TiO_2 : Dioxyde de Titane, TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α, TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

Référence	Particules (taille)	Animal/ sexe	Modèle	Paramètres étudiés	Principaux résultats
Li et al. 1999 [129]	NC (14 nm). NC (260 nm).	Rat *Wistar*. Mâle.	Instillation intratrachéale 25µg, 50µg, 125 µg. Observations 6h, 24h et 7j après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Perméabilité pulmonaire (protéines LBA). Cytotoxicité (LDH). Stress oxydant (GSH).	NP de NC : Infiltration de PN Production TNF-α et d'oxyde nitrique Cytotoxicité Diminution GSH Peu d'effet du NC micrométrique.
Shwe et al. 2005 [135]	NC (14 nm). NC (95 nm).	Souris *BALB/c*. Mâle.	4 instillations intratrachéales (1 par semaine) 25 µg, 125 µg, 625 µg. Observations 24h après	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Analyse des lymphocytes spléniques. Histologie. RT-PCR sur les ganglions lymphatiques.	NC de 14 nm: Infiltration de macrophages, PN, lymphocytes Sécrétion d'IL-1β, IL-6, TNF-α dans LBA Sécrétion MIP-1 α, CCL3 Dépôt de NC dans les ganglions lymphatiques Effet de la dose Peu d'effets du NC de 96 nm
Teeguarden et al. 2011 [136]	NC (14 nm). SWCNT (0.4-1.2 nm*0.5-2 µm). Crocidolite (210 nm).	Souris *C57BL/6*. Femelle.	2 aspirations pharyngées par semaine pendant 3 semaines. 40µg/ aspiration. Obervations 24h après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Collagène dans poumon total. Protéomique.	Infiltration de macrophages, PN, lymphocytes Sécrétion IL-12, Macrophage-Derived Cytokine, MIP-1á Accumulation de collagène, histiocytose Protéines sécrétées : inflammation, réponse immunitaire, fibrose, remodelage pulmonaire, apoptose En termes d'effets SWCNT > crocidolite > NC
Inoue 2006 et al. [119]	NC (14 nm). NC (56 nm).	Souris *IRC*. Mâle.	Instillation intratrachéale 4 mg/kg. Observations 24h après. LPS 2.5 mg/kg.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Histologie. Stress oxydant (8-OH-G)	NP de NC seules : Inflammation, œdème. NP 14 nm et LPS vs LPS seul : Inflammation, œdème. Sécrétion IL-1β, CCL3, CCL2, CXCL1. Stress oxydant.
Inoue et al. 2005 [140]	NC (14 nm). NC (56 nm).	Souris *IRC*. Mâle.	Instillation intratrachéale 1 par semaine pendant 6 semaines. 50 µg/animal. OA (1 µg). Observations 24h après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Cellules caliciformes. Stress oxydant.	NP de 14 nm seules : Infiltration cellules LBA. Sécrétion MCP-1. NP et LPS vs LPS seul : Infiltration cellules d LBA et des cellules caliciformes. Sécrétion d'IL-5, IL-6, L-13, MCP-1. Stress oxydant.

Référence	Particules (taille)	Animal/ sexe	Modèle	Paramètres étudiés	Principaux résultats
Kamata et al. 2011 [141]	NC (14 nm).	Souris *C57BL/6*. Femelle.	Instillation intratrachéale 10 µg/animal. Bléomycine (20 µg/souris). Observations 2 à 21 jours après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Stress oxydant : nitrotyrosine. Quantité de collagène. Fibrose. Compliance du poumon.	NP seules : pas d'effet NP et bléomycine vs bléomycine seule: Augmentation du collagène Fibrose Diminution compliance. Infiltration de PN. Sécrétion KC, IL-6, CCL2, TGF-β Stress oxydant
Inoue et al. 2011 [142]	NC (14 nm). NC (56 nm).	Souris *IRC*. Mâle.	Instillation intratrachéale 1.6 mg/kg. Elastase 1U/kg. Observations 24h et 14 jours après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Histologie : emphysème.	NP seules : Inflammation. NP 56 nm et élastase vs élastase seule: pas d'effet. NP 14 nm et élastase vs élastase seule : Infiltration de PN. Sécrétion IL-1â et CXCL1. Emphysème.

Tableau 1.5 : résumé des études décrivant les effets *in vivo* des NP de NC.

CCL : Chemokine C-C motif ligand, CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand, GSH : gluthathion, HRB : Hyperréactivité Bronchique, IL : Interleukine, KC : Keratinocyte Chemoattractant, LBA : Lavage Bronchoalvéolaire, LDH : Lactate Déshydrogénase, LPS : Lipopolysaccharide, MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1, MIP-2 : Macrophage Inflammatory Protein-2, NC : Noir de Carbone, NP : Nanoparticule, OA : Ovalbumine, PN : Polynucléaire Neutrophile, RT-qPCR : Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction, TiO_2 : Dioxyde de Titane, TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α, TGF-β : Transforming Growth Factor-β, 8-OH-G : 8-Hydroxyguanosine.

Comme on a pu le constater, les particules de TiO_2 et de NC nanométriques sont capables d'induire un certain nombre d'effets biologiques, qui sont résumés dans le Tableau 1.6.

TiO2	NC
In vitro	***In vitro***
Cytotoxicité	Cytotoxicité
Génotoxicité	Génotoxicité
Internalisation	Internalisation
Inflammation	Inflammation
Stress oxydant	Stress oxydant
In vivo	***In vivo***
Inflammation	Inflammation
Emphysème	Aggravation d'asthme,
Aggravation d'un asthme	d'emphysème, de fibrose
préexistant	préexistants

Tableau 1.6 : résumé des effets *in vivo* et *in vitro* des NP de TiO_2 et de NC.

2.4) Caractéristiques physicochimiques des nano-objets influant sur leurs effets biologiques

Il arrive que, dans les études déjà citées, certaines, qui traitent du même sujet, donnent des résultats contradictoires, par exemple sur la cytotoxicité des NP de TiO_2. Cette différence de résultats peut être due à des différences dans les protocoles utilisés, comme par exemple la dose de particules ou la durée d'exposition, mais il est également possible que les caractéristiques physicochimiques des particules utilisées jouent un rôle dans cette différence. En effet, il a été démontré que plusieurs facteurs physicochimiques des NP de TiO_2 et de NC sont susceptibles d'influer sur leurs effets biologiques, que cela soit *in vivo* ou *in vitro*.

2.4.1) La taille

L'incidence des dimensions des nano-objets sur leurs effets a plusieurs fois été démontrée. Par exemple, une étude de Renwick et coll. [50] montre que les NP de TiO_2 sont moins internalisées par les macrophages alvéolaires que les particules de TiO_2 de taille micrométrique. De plus, une étude de Ferin et coll. [49] observe que les NP induisent plus d'effets proinflammatoires que les particules de taille micrométrique. Cependant, une étude, menée par Horie et coll. [143], a observé les effets de particules de TiO_2 de 7, 20 et 200 nm sur une lignée de kératinocytes humains (lignée HaCaT) ainsi que sur des cellules de la lignée A549 à des doses de 3.7 à 100 µg/mL pendant des temps d'exposition de 2 à 24 heures. Ils n'ont pas observé de différence entre la toxicité des NP de TiO_2 et celle des particules de taille micrométrique. Une des raisons pour expliquer cette observation est que les particules

formaient, une fois en suspension, des agglomérats/agrégats de taille similaire (environ 200 nm de diamètre). En effet, les NP peuvent avoir tendance à s'agglomérer/s'agréger, et les structures ainsi formées peuvent être de taille bien supérieure à celle des particules seules. Par exemple, dans l'étude de Pan et coll. [83], les NP de rutile utilisées formaient, en suspension, des agrégats de plusieurs µm de diamètre pour une taille des NP de 15-60 nm. Ainsi, si la taille des nano-objets peut avoir une influence sur leurs effets biologiques, le fait que les nano-objets forment des agrégats/agglomérats peut également modifier leurs effets.

2.4.2) La forme

Une exposition à deux NP de TiO_2 ou de NC de formes différentes peut ne pas donner lieu aux mêmes effets. Par exemple, dans l'étude de Hamilton et coll. [69], les nanotubes longs de TiO_2 induisent plus d'effets cytotoxiques et proinflammatoires que les nanotubes courts et les nanosphères de TiO_2. De plus, les nanosphères et nanotubes courts sont observés dans des vésicules, alors que les nanotubes longs sont observés libres dans le cytoplasme [69]. Enfin, dans l'étude de Teeguarden et coll. [136], les auteurs ont utilisé des nanotubes de carbone monofeuillets, lesquels, bien que composés de carbone comme les NP de NC de la même étude, avaient plus d'effets proinflammatoires que les NP de NC.

2.4.3) La variété cristalline

Plusieurs études ont montré que, pour les particules de TiO_2, la variété cristalline anatase occasionnait plus d'effets que la variété cristalline rutile. C'est le cas d'une étude de Sayes et coll. [144] qui portait sur des NP de TiO_2 de différentes variétés cristallines mises en contact avec des cellules de la lignée A549 ou des fibroblastes de peau humains (lignée HDF) à des doses de 0.3 à 3000 µg/mL pendant 1 à 48 heures. Cette étude a permis d'observer que les NP d'anatase pouvaient être jusqu'à 100 fois plus toxiques que leur équivalent de variété cristalline rutile [144]. De même, dans une étude de Warheit et coll. de 2007, le mélange anatase/rutile avait plus d'effets inflammatoires que la forme rutile pure [128]. Cependant, Morishige et coll. ont étudié l'impact de doses de 20 à 500 µg/mL de NP de TiO_2 de différentes variétés cristallines sur une lignée de monocytes-macrophages humains, la lignée THP-1, pendant 24 heures, et ont observé que la variété rutile avait plus d'effets proinflammatoires que la variété anatase [94]. Il n'est donc pas sûr que la variété anatase soit celle qui induise le plus d'effet.

2.4.4) La surface spécifique

Plusieurs études ont démontré que la surface spécifique des nano-objets pouvait influer sur leurs effets biologiques. Par exemple, dans une étude de Stoeger et coll. [145], les auteurs ont exposé des souris à 6 types de NP de carbone, dont 2 NC, par instillation intratrachéale, à des doses allant de 5 à 50 µg/animal. Les auteurs ont observé que, parmi les NP qu'ils avaient utilisées, celles ayant la surface spécifique la plus élevée avaient le plus d'effet au niveau de la cellularité du LBA ainsi qu'au niveau des cytokines proinflammatoires présentes dans le LBA, 24 heures après l'exposition. De plus, Monteiller et coll. [146] ont exposé des cellules de la lignée A549 à des particules de différentes tailles et composition chimique, de 4 à 24 heures d'exposition à des doses de 15 à 250 µg/mL. Les auteurs ont observé que les cellules qui produisaient le plus d'IL-8 suite à une exposition à des NP étaient celles qui avaient été exposés aux NP présentant la surface spécifique la plus importante.

2.4.5) Le traitement de surface

Le traitement de surface peut également modifier les effets des nano-objets. Par exemple, dans l'étude de Pan et coll. [83], le fait d'enrober les NP de TiO_2 avec un polymère antioxydant, hydrophobe et anionique ne modifie pas la prolifération cellulaire, alors que les NP de TiO_2 non enrobées diminuent cette proflifération.. A contrario, il a été démontré que le fait d'enrober la surface de NP de TiO_2 avec de la silice (SiO_2) pouvait entraîner des effets plus importants que ceux engendrés par les particules de TiO_2 seules. C'est le cas dans une étude de Rossi et coll., qui ont exposé des souris par inhalation en utilisant différentes NP de TiO_2 à 10 mg/m^3 pendant des durées allant jusqu'à 4 semaines. Certaines de ces NP de TiO_2 avaient reçu un enrobage de SiO_2, et ces particules étaient les seules à augmenter le nombre total de cellules dans le LBA des souris [147]. De plus, dans une étude de Warheit et coll. [124], les particules ayant le plus d'effets proinflammatoires étaient les particules de TiO_2 contenant, à leur surface, la plus grande quantité de SiO_2 et d'alumine (Al_2O_3). Ainsi, il semble que, si le traitement de surface peut modifier les effets des NP, ces modifications dépendent de la nature chimique du composé utilisé pour traiter la surface des NP.

Un récapitulatif des effets des différents paramètres physicochimiques des NP de TiO_2 et de NC est présenté dans le Tableau 1.7.

	Référence	Particules (taille)	Animal/type cellulaire	Modèle d'exposition	Paramètres étudiés	Résultats
Effet taille	Renwick et al. 2001 [50]	TiO_2 (29 nm, 250 nm) NC (14 nm, 260 nm)	J774.2 (lignée de macrophages murins)	0.0975–0.78 mg/mm$^{2.}$ 8 h.	Cytotoxicité. Mesure du nombre de macrophages avec des particules.	Les NP diminuent la phagocytose, pas les particules micrométriques.
	Ferin et al. 1992 [49]	TiO_2 (21 nm). (23 nm). (230 nm). (250 nm).	Rat *Fischer*. Mâle	Instillation intratrachéale 500 µg/animal. Observations 24h après. Inhalation 6 h/jour, 5 jours/semaine 12 semaines 23 mg/m^3. Observations 4 à 64 semaines après.	Inflammation (LBA & histologie). Charge particulaire du poumon+ clairance des particules.	Inflammation pulmonaire supérieure pour les NP.
	Horie et al. 2010 [143]	TiO_2 (7 nm). (20 nm). (200 nm).	HaCaT	3.7 à 100 µg/ml. 2 h-24 h.	Cytotoxicité (MTT) Apoptose (Annexine V/FITC, activité des caspases-3 et -9) Stress oxydant (DCFH-DA, DPPP, GSH)	Pas de différences d'effets entre les différents TiO_2.
Effet forme	Hamilton et al. 2009 [69]	TiO_2 NP (60-200 nm). NT courts (60-300 nm*0.8-4 µm). NT longs (60-300*15-30 µm).	Macrophages alvéolaires de souris normales souris KO pour MARCO (culture primaire)	50-100 µg/mL. 1h-24 h.	MET Toxicité (bleu trypan) Stress oxydant (peroxydation lipidique) Sécrétion IL-1β, IL-18 (ELISA)	En termes d'effets (inflammation, stress oxydant, toxicité), NT longs > NT courts > NP
	Teeguarden et al. 2011 [136]	NC (14 nm.). SWCNT (0.4-1.2 nm*0.5-2 µm). Crocidolite (210 nm.).	Souris *C57Bl/6*. Femelle.	2 aspirations pharyngées /semaine pendant 3 semaines. 40 µg/animal. Observations 24 h après.	Inflammation (cellularité LBA & cytokines). Quantité de collagène dans poumon total. Protéomique.	En termes d'effets (inlammation, quantité collagène, protéomique), SWCNT>Crocidolite>NC
	Sayes et al. 2008 [144]	TiO_2 Rutile (20 nm). Anatase/ Rutile (20 nm).	HDF (lignée de fibroblastes dermiques humains). A549.	0.3 à 3000 µg/ml 1 h-48 h	Cytotoxicité (LDH, MTT). Inflammation (ELISA). Production de ROS *ex vivo* (luminol, Rouge Congo).	En termes d'effets (toxicité, inflammation, stress oxydant), Anatase/Rutile > Rutile
cristalline	Warheit et al. 2007 [128]	TiO_2 Rutile (380 nm). 2 rutiles (136 et 149 nm). 1 mélange Anatase/ Rutile (A/R, 129 nm).	Rat *CD IGS*. Mâle.	Instillation intratrachéale 1 et 5 mg/kg. Observations 24 h à 3 mois après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Perméabilité pulmonaire (protéines LBA). Cytotoxicité (LDH). Sécrétoire des cellules épithéliales (phosphatase alcaline) Histopathologie	En termes d'effets (inflammation, toxicité, activité sécrétoire, anomalies histopathologiques), Anastase > Rutile

	Référence	Particules (taille)	Animal/type cellulaire	Modèle d'exposition	Paramètres étudiés	Résultats
Effet variété	Morishige et al. 2010 [94]	Anatase (<50 µm). Anatase (<25 nm). Anatase (10 nm). Rutile (< 5 µm). Rutile (30–40 nm) Rutile(10 nm × 40 nm).	THP-1	20-500 µg/ml. 24 h.	Sécrétion de TNF-α et IL-1β (ELISA) Utilisation d'inhibiteurs.	Plus d'effets de sécrétion d'IL-1β et de TNF-α pour anatase de 10 nm et rutile < 5µm
Effet surface spécifique	Stoegger et al. 2006 [145]	Particules de la pollution (18-30 nm). NC (30-60 nm, 12-17 nm et 7-12 nm). Suie (8-16nm, 8-14nm)	Souris *BALB/c*. Femelles	Instillation intratrachéale. 5 à 50 µg/rat. Observations 24 h après.	Analyse du LBA : Cellularité. Production IL-1β, TNF-α, MIP-2, CXCL1.	En termes d'effets (inflammation), NP de 7-12 nm > Suies > NP de NC > particules de la pollution.
	Monteiller et al. 2007 [146]	NC micrométrique NP de NC TiO_2 micrométrique NP de TiO_2 $BaSO_4$, Quartz	A549	15-250 µg/mL. 4 h-24 h.	Cytotoxicité (LDH). Stress oxydant (GSH). Production d'IL-8 (RT-qPCR, ELISA).	En termes d'effets (cytotoxicité, stress oxydant, inflammation), Quartz > NP > particules micrométriques.
Effet traitement de surface	Pan et al. 2009 [83]	TiO_2 Rutile (15*60 nm) Rutile enrobé avec un polèmère (15*60 nm). Anatase (200 nm).	Lignée (fibroblastes dermiques humains)	0.4-0.8 µg/mL. 6 jours.	Aire des cellules. Prolifération cellulaire. Force de traction cellulaire. Migration cellulaire. Contraction d'un gel de collagène. α-actine (Western Blot). Stress oxydant (H_2O_2).	L'enrobage avec le polymère diminue les effets du TiO_2.
	Rossi et al. 2010 [147]	Rutile/SiO_2 (10*40 nm). Anatase (< 25 nm). Rutile (< 5µm). SiO_2 (30*40 nm) Rutile (30*40 nm). Anatase/brookite (21nm)	Souris *BALB/c*. Femelle.	Inhalation 2 h/jour, 4 jours/semaine. 4 semaines. 10 mg/m^3. Observations 4 h à 24 h après.	Analyse du LBA : Sécrétion de cytokines de l'inflammation (RT-PCR). Sécrétion de TNF-α (ELISA). Mesure de la quantité de TiO_2 dans les tissus	pour TiO_2/SiO_2 : afflux de PN, sécrétion TNF-α, CXCL-1 et CXCL-8.
	Warheit et al. 2005 [124]	6 TiO_2 (traitements de surface avec SiO_2 et avec Al_2O_3, taille jusqu'à 440 nm)	Rats *CD IGS*. Mâle.	Inhalation : 4 semaines 6 h/jour, 5 jours/semaine. 1130-1300 mg/m^3. Observations 2 semaines à 1 an après. Instillation intratrachéale 2-10 mg/kg. Observations 24 h à 3 mois après.	Inflammation (cellularité LBA et cytokines). Perméabilité pulmonaire (protéines LBA). Cytotoxicité (LDH). Histopathologie.	Effet du traitement de surface : SiO_2 et Al_2O_3 augmentent la toxicité du TiO_2

Tableau 1.7 : résumé des différentes études *in vitro* et *in vivo* sur les caractéristiques physiocochimiques des NP de TiO_2 et de NC impliquées dans leurs effets biologiques.

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand, DCFH : 2,7 Dichlorofluoresécine Diacétate, DPPP : 1,3-Bis(diphenylphosphino) propane, ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay, GSH : gluthathion, IL : Interleukine, LBA : Lavage Bronchoalvéolaire, LDH : Lactate Déshydrogénase, MARCO : Macrophage Receptor with Collagenous structure, MET : Microscopie Electronique à Transmission, MIP-2 : Macrophage Inflammatory Protein-2, MTT : Bromure de de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium , NC : Noir de Carbone, NP : Nanoparticule, NT : Nanotube, ROS : Espèce Réactive de l'Oxygène, SWCNT : Nanotube de Carbone Monofeuillet,TiO_2 : Dioxyde de Titane.

De manière générale, s'il semble que plusieurs caractéristiques physicochimiques des NP soient capables de moduler leurs effets, il est difficile, à l'heure actuelle, de déterminer l'influence exacte de chaque paramètre dans les effets biologiques des NP. Ceci est à relier au fait que, pour étudier exactement l'influence d'un paramètre physicochimique sur les effets d'une NP, il faudrait pouvoir utiliser des NP ne différant que sur ce paramètre, ce qui reste difficile à réaliser.

3) La MMP-1

3.1) Généralités sur les MMP

3.1.1) Substrats des MMP : les composants de la Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) correspond à l'ensemble des molécules présentes dans le milieu extracellulaire. Elle regroupe la matrice interstitielle et la membrane basale, qui sépare les différents tissus. Elle assure un rôle de soutien à la cellule, mais a d'autres rôles comme la séparation des différents tissus, la communication intercellulaire ou la régulation de la dynamique cellulaire. De plus, elle sert de réservoir à de nombreux facteurs de croissance et cytokines, comme le VEGF, ou le TGF-β [11]. La formation de la MEC est un processus important, en particulier pour la croissance et la réparation tissulaire.

La MEC est constituée de deux classes de macromolécules : les protéoglycanes et les protéines fibreuses. Ces molécules sont sécrétées localement et forment un réseau complexe en association étroite avec les cellules qui les ont sécrétées.

Les protéoglycanes sont constitués le plus souvent d'une protéine axiale sur laquelle sont branchées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) longues et non ramifiées. Ces chaînes sont souvent constituées de la répétition de deux sucres, un acide glucuronique ou iduronique et un acide aminé ou sulfaté. Leurs nombreuses charges négatives (groupements sulfate ou carboxyl) leur permettent d'attirer les molécules d'eau, formant ainsi un réseau hydraté. On distingue différents types de GAG : l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate/l'héparane sulfate, le dermatane sulfate, et le kératane sulfate. Ces différents types de GAG, ainsi que la quantité relative d'eau dans le réseau, conditionnent les propriétés de la MEC. En plus de leur propriétés structurales, ils peuvent réguler l'activité de protéines sécrétées (comme les facteurs de croissance) ou servir de corécepteurs [11].

On distingue 4 classes de protéines dans la MEC :

- **Le collagène** est synthétisé sous la forme de procollagène, qui, une fois excrété, est assemblé en hélice (tropocollagène), avant de s'assembler encore pour donner le collagène. Il existe différentes familles de collagène en fonction de la structure qu'ils forment, mais toutes servent de support aux cellules.

- **L'élastine** donne son élasticité aux tissus. Elle est synthétisée sous forme de tropoélastine, qui s'assemble en réseaux lâches reliés par des liaisons covalentes.

- **La fibronectine** est une molécule constituée de parties rigides reliées par des parties flexibles. Les domaines rigides permettent des interactions avec les autres composants de la MEC, alors que les parties flexibles peuvent relier la cellule, via une classe de protéines appelée intégrines. Ceci permet aux cellules d'adhérer plus facilement à la MEC mais facilite également leur migration, en particulier pendant le développement.

- **La laminine** est un constituant de la lame basale (assemblage glycoprotéique sur lequel reposent les cellules épithéliales). Elle aide aussi à l'adhésion cellulaire.

Un schéma récapitulatif des différents composants de la MEC est présenté Figure 1.12.

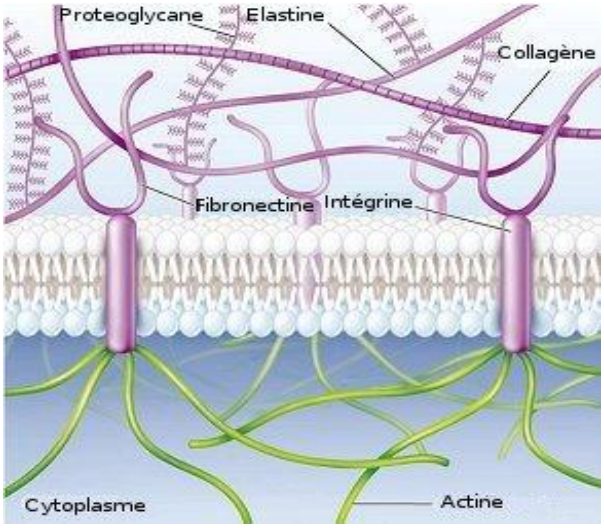


Figure 1.12 : représentation d'une partie de la matrice extracellulaire.
La MEC se situe en haut de l'image, et le cytoplasme en bas. Les intégrines font le lien structural entre MEC et cellule[26].

[26]Adapté du site http://autoimmunity-bible.com, consulté en ligne le 17 juillet 2011

3.1.2) Les MMP et leur fonction

Les composants de la MEC sont, pour la plupart, synthétisés par un type cellulaire appelé fibroblaste, qui les excrète ensuite par exocytose [11]. Mais d'autres types cellulaires, comme les myofibroblastes, peuvent également sécréter les composants de la MEC.

La MEC est sujette à un remaniement constant, que ce soit au cours du développement, pour régénérer un tissu lésé, ou pour permettre la migration des cellules. Cela implique de détruire la MEC déjà existante et d'en resynthétiser une nouvelle. Différentes classes d'enzymes peuvent participer à la dégradation des composants de la MEC, mais toutes sont des protéases sécrétées localement. Elles peuvent être sécrétées par une grande variété de cellules : cellules épithéliales, fibroblastes, myofibroblastes, chondrocytes, ostéoclastes, cellules endothéliales, macrophages ou encore leucocytes [11].

L'une de ces classes de protéases a un rôle particulièrement important dans le remodelage matriciel : il s'agit des Matrix Metalloproteases, du fait de leur capacité à dégrader presque tous les composants de la MEC.

Un récapitulatif des différentes MMP et de leurs substrats est présenté dans le Tableau 1.8.

Nom	Substrat
Collagénases interstitielles	
MMP-1 (collagénase-1)	Collagène I, II, II, VII, VIII, X, agrécane, gélatine, pro-MMP-2, pro-MMP-9
MMP-8 (collagénase-2)	Collagène I, II, III, VII, VIII, X, agrécane, gélatine
MMP-13 (collagénase-3)	Collagène I, II, III, agrécane, gélatine
MMP-18 (collagénase-4)	Inconnu
Gélatinases	
MMP-2 (Gélatinase-A)	Collagène I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, gélatine, élastine, fibronectine, agrécane
MMP-9 (Gélatinase-B)	Collagène IV, V, VII, X, XIV, gélatine, pro-MMP-9, pro-MMP-13, élastine, agrécane
Stromélysines	
MMP-3 (Stromélysine-1)	Collagène II, III, IV, IX, X, XI, élastine, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13
MMP-10 (Stromélysine -2)	Collagène III, IV, V, gélatine, fibronectine
MMP-11 (Stromélysine -3)	Fibronectine, laminine, gélatine, agrécane
MMPs membranaires	
MMP-14 (MT1-MMP)	Pro-MMP-2, pro-MMP-13, collagène I, II, III, gélatine, agrécane, fibronectine, laminine
MMP-15 (MT2-MMP)	Pro-MMP-2, gélatine, fibronectine, laminine
MMP-16 (MT3-MMP)	Pro-MMP-2
MMP-17 (MT4-MMP)	Inconnu
MMP-24 (MT5-MMP)	Pro-MMP-2
MMP-25 (MT6-MMP)	Gélatine
Autres	
MMP-7 (matrilysine-2)	Collagène II, III, IV, IX, X, XI, élastine, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13, gélatine, agrécane, fibronectine, laminine
MMP-26 (matrilysine)	Collagène IV, gélatine, fibronectine
MMP-12 (métalloélastase)	Elastine
MMP-19	Tenascin, gélatine, agrécane
MMP-20 (énamelysine)	Enamel, gélatine
MMP-21	Inconnu
MMP-23	Inconnu
MMP-27	Inconnu
MMP-28 (épilysine)	Inconnu

Tableau 1.8 : les Matrix Métalloprotéases et leurs substrats.
Adapté de [148].

Les MMP peuvent également activer des cytokines présentes à l'état de zymogène dans la matrice, comme le VEGF ou le TGF-β [149] ou modifier l'interface cellule/MEC [150]. On comprend donc que les MMP jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques, en particulier la réparation des tissus et leur remodelage [150], mais aussi le développement et la réponse immunitaire, ou le comportement de la cellule, en clivant les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, ou en clivant des molécules de surface qui sont impliquées dans la signalisation cellulaire [151].

3.1.3) La MMP-12

Une MMP fortement impliquée dans le développement de pathologies associées au remodelage est la MMP-12.

3.3.1) Synthèse, structure et fonction

La MMP-12 est synthétisée par différents types cellulaires, en particulier les macrophages alvéolaires (mais pas les monocytes dont sont issus les macrophages), mais aussi les cellules épithéliales bronchiques ou les cellules musculaires lisses [152], lesquelles sont présentes dans les parois alvéolaires des poumons.

La MMP-12 contient 3 domaines :

- Un prodomaine, qui contient un grand nombre de résidus cystéines et qui interagit avec l'ion zinc de l'enzyme sous sa forme pro-enzyme, et qui maintient la MMP-12 sous sa forme de zymogène.
- Un domaine catalytique, qui contient l'ion zinc, ainsi que 3 résidus histidine qui entourent cet ion zinc, l'ion et les résidus donnant son activité catalytique à la MMP-12.
- Un domaine haemopexin-like carboxy terminal, qui comporte des homologies de séquence avec l'haemopexine. Ce domaine détermine la reconnaissance du substrat et l'interaction de la MMP-12 avec les TIMP [153].

Parmi les substrats de la MMP-12, on trouve, en plus de l'élastine, d'autres composants de la MEC comme le collagène de type IV, la fibronectine ou l'élastine, mais aussi d'autres MMP. La MMP-12 clive, par exemple, la proMMP-2 ou la proMMP-3 [153]. Ainsi, l'activation de la MMP-12 peut mener au clivage potentiel d'un grand nombre de composants de la MEC, et donc à un remodelage matriciel important. La MMP-12 peut également dégrader des molécules n'appartenant pas à la MEC comme l'α-1 antitrypsine ou le plasminogène [152].
La MMP-12 peut être impliquée dans le développement de pathologies comme le cancer, mais également de plusieurs autres pathologies plus spécifiquement pulmonaires, dont certaines associées au remodelage matriciel comme l'asthme, la fibrose ou l'emphysème [153]. Un point commun entre ces pathologies est l'inflammation impliquant l'infiltration de macrophages, principaux sécréteurs de la MMP-12.

3.3.2) Régulation

L'expression de la MMP-12 est, comme celle des autres MMP, régulée à différents niveaux : gène, sécrétion de la pro-enzyme, et activation.

Le promoteur du gène de la MMP-12 dispose de 6 sites de liaison à des facteurs de transcription, parmi lesquels un site pour le facteur AP-1. Or des cytokines comme l'IL-1β, le GMCSF ou le PDGF peuvent induire AP-1, donc induire l'expression de la MMP-12 [153]. De plus, le TGF-β est capable d'inhiber la sécrétion de MMP-12 : en réponse au TGF-β, Smad 3 est capable de se lier à aux membres de la famille Jun, qui font partie d'AP-1 [154].

Après la traduction, la proMMP-12 est stockée dans des vésicules cytoplasmiques, et n'est sécrétée que suite à une stimulation. Parmi les molécules permettant la sécrétion de proMMP-12 dans les macrophages, on trouve le Proteinase Activated Receptor-1, lui-même activé par des protéines comme la plasmine et la thrombine. Comme ces protéines sont fortement relarguées dans les pathologies inflammatoires, cela peut expliquer la sécrétion de MMP-12 dans les pathologies liées au remodelage pulmonaire [153]. L'α-1 antitrypsine, en inhibant la plasmine et la thrombine, a été démontrée comme empêchant le relargage de la MMP-12 [155].

Finalement, l'activation de la MMP-12 peut se faire par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes : des modifications non protéolytiques, comme par exemple en présence de stress oxydant [156], ou bien des clivages par d'autres protéases, comme la plasmine [157].

Enfin, les TIMP, en particulier TIMP-1, sont capables d'inhiber la MMP-12 [158].

3.2) La MMP-1

3.2.1) Structure

La protéine MMP-1 est constituée de différents domaines [10]. Le prédomaine est constitué d'aminoacides et est retiré lorsque l'enzyme sort de la cellule. Le propeptide est la séquence qui sert à maintenir l'enzyme inactive. Il est constitué d'un résidu cystéine qui est placé à l'opposé de l'atome de zinc dans le site actif de l'enzyme. Le domaine catalytique, quant à lui, comporte d'un atome de zinc, relié à la séquence HELGHXXGXXH par trois résidus histidine. Le domaine catalytique est relié au domaine carboxyterminal. L'enzyme active comprend 5 feuillets â, 3 hélices á, 2 atomes de zinc et un de calcium. La structure de la MMP-1 est présentée dans la Figure 1.13.

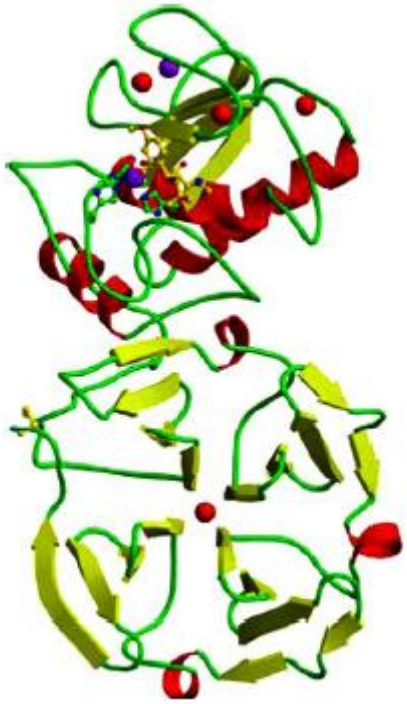


Figure 1.13 : structure de la Matrix Métalloprotéase-1 porcine avant activation.
Flèche verte : feuillet β, hélice rouge : hélice α, point rouge : atome de calcium, point violet : atome de zinc
Adapté de [10].

3.2.2) Fonction

Parmi les différentes MMP, la MMP-1, la première MMP décrite et aussi appelée collagénase-1, a un rôle important [10]. Elle est en effet responsable de la dégradation de nombreux types de collagène, en particulier les collagènes I et II qui sont difficilement dégradés par les autres collagénases. De plus, elle est capable de dégrader d'autres composants de la MEC, comme l'agrécane ou la gélatine. Elle est donc d'une importance particulière pour le remodelage tissulaire. Elle peut être synthétisée par plusieurs types cellulaires, dont les fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales ou cellules épithéliales. Comme la plupart des MMP, elle est synthétisée sous forme d'une proMMP, qui peut se trouver sous 2 formes : une forme non glycosylée d'environ 57 kD, et une forme glycosylée minoritaire d'environ 61 kD.

En situation non pathologique, la MMP-1 est peu exprimée, mais son expression peut être élevée lors de processus tels que la réparation tissulaire, ou le remodelage [159].

En plus de ses rôles de dégradation des éléments de la MEC, la MMP-1 joue également un rôle dans le relargage de différents facteurs présents dans la MEC : par exemple, en dégradant le perlécane la MMP-1 peut relarger le Fibroblast Growth Factor (FGF) qui lui était lié [160]. Enfin, la MMP-1 peut cliver des molécules de surface qui ne sont pas des composants de la MEC, comme l'Insulin Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) et l'IGFBP-5, l'IL-1β ou le TNF-α [161].

3.2.3) Régulation de l'activité de la MMP-1

L'activité des MMP est contrôlée à plusieurs niveaux : lors de leur transcription, lors de leur activation, en les confinant grâce à des récepteurs de surface cellulaire, et lors de leur interaction avec des inhibiteurs. Un schéma récapitulatif des niveaux de régulation des MMP est présenté Figure 1.14.

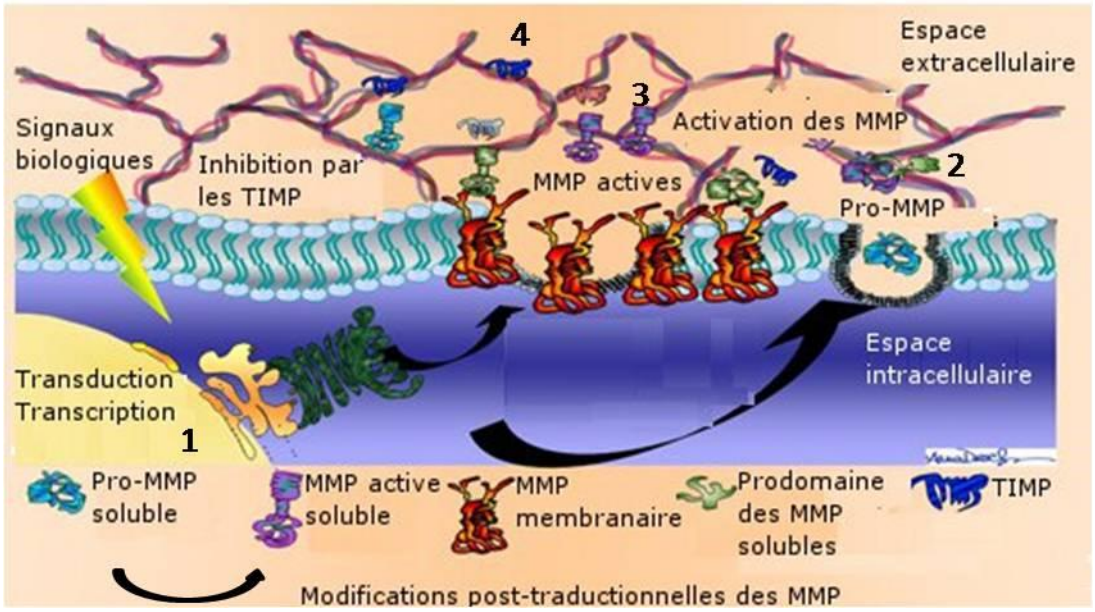


Figure 1.14 : niveaux de régulation de l'expression de la Matrix Métalloprotéase-1.
1 : régulation via la transcription, 2 : régulation via l'activation, 3 : régulation via la compartimentalisation, 4 : régulation via les inhibiteur, MMP : Matrix Metalloprotéase, TIMP : Tissue Inhibitor of Matrix Métalloprotéase. Adapté de [162].

3.2.3.1) Régulation de l'activité de la MMP-1 via sa transcription

La séquence du promoteur de la MMP-1 comprend un site de liaison d'AP-1, ce qui fait qu'AP-1 est susceptible d'induire l'expression de la MMP-1. De plus, différentes cytokines sont capables d'induire l'expression de la MMP-1, comme l'Epidermal Growth Factor, le FGF-1, le FGF-2, le FGF-7, le FGF-9, l'Hepatocyte Growth Factor, le GM-CSF, le Placenta-Derived Growth Factor, le TGF-α, ainsi que l'IL-1, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, et l'IL-10 [4]. Un autre inducteur de la MMP-1 est l'Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer (Emmprin), une glycoprotéine, qui est connue pour induire, en plus de MMP-1, MMP-2 et MMP-3, et dont le rôle est particulièrement important dans le développement de pathologies de type cancer [163]. En revanche, les acides rétinoïques trans dérivés de la vitamine A ainsi que le TGF-β sont capables de diminuer l'expression de la MMP-1. Le TGF-β agit via un domaine appelé TGF-β Inhibitory Element [164].

3.2.3.2) Régulation de l'activité de la MMP-1 via son activation

La plupart des MMP sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, qui ne sont activés que lorsque le prodomaine est physiquement éloigné du site catalytique. Cet éloignement peut se réaliser de deux façons : le clivage du prodomaine par différentes protéases dont la trypsine, la cathepsine G, la plasmine, la sérine, ou d'autres MMP [165], et une activation dite allostérique, au cours de laquelle le prodomaine est éloigné du site catalytique sans être lysé. L'activation de la proMMP-1 a lieu, le plus souvent, par l'action de 2 protéases, la Plasminogen Activator Urokinase et la stromelysine-1 [166]. La pro-MMP-1 peut également être activée par l'action des ROS [167]. Les activations ont la plupart du temps lieu dans les espaces péricellulaire et extracellulaire [165].

3.2.3.3) Régulation de l'activité de la MMP-1 via sa compartimentalisation

Un autre moyen de régulation de la MMP-1 est de la confiner dans des endroits bien spécifiques de la cellule (on parle de compartimentalisation). Certaines MMP peuvent être liées à la surface de la cellule : la MMP-1, comme la MMP-2 et la MMP-9 peuvent se lier à des protéines de surface spécifiques, respectivement la $\alpha v\beta 3$-intégrine, $\alpha 2\beta 1$-intégrine, ou le CD44 [168].

3.2.3.4) Régulation de l'activité de la MMP-1 via des inhibiteurs

Enfin, il est possible de réguler l'activité des MMP via leurs inhibiteurs. Les MMP disposent en effet de différents types d'inhibiteurs [168]. En particulier, la classe des Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases (TIMP) est composée, à l'heure actuelle, de 4 membres (TIMP-1 à TIMP-4), qui n'ont pas tous la même affinité pour les différentes MMP et sont, à l'exception de TIMP-3 qui est fixé dans la MEC, également sécrétés par les cellules [169]. C'est donc l'équilibre entre les MMP et les TIMP qui influe sur l'activité résultante de la MMP-1.

3.2.3) Pathologies associées à la régulation de l'activité des MMP

Une surexpression de la MMP-1 a été associée au développement de certaines pathologies : arthrite [170], hypertrophie cardiaque [171], cancers [172], fibrose pulmonaire [173] ou encore emphysème [174].

Parmi les pathologies liées à une activation des MMP dans le poumon en dehors du cancer, deux sont particulièrement liées au remodelage de la MEC : la fibrose et l'emphysème.

3.2.3.1) Fibrose

La fibrose correspond à une accumulation de collagène dans l'espace interstitiel. Au niveau du parenchyme pulmonaire, elle a pour conséquence l'épaississement des parois alvéolaires, et donc une diminution des échanges de gaz entre l'alvéole et le sang [175].

Parmi les différents types cellulaires impliqués dans le développement de la fibrose pulmonaire, les myofibroblastes ont une place importante car ils synthétisent des quantités importantes de composants de la MEC, même comparés aux fibroblastes. Ils sont caractérisés, entre autres, par la présence d'α-actine. En temps normal, ils sont activés suite à une lésion, et servent à sécréter rapidement la MEC pour permettre la régénération tissulaire, avant d'entrer en apoptose. Cette apoptose ne se produit pas lors de la fibrose et les myofibroblastes sécrètent un excès de MEC qui ne sera pas dégradé. Un schéma récapitulatif de la réparation tissulaire et de la fibrose est présenté Figure 1.15.

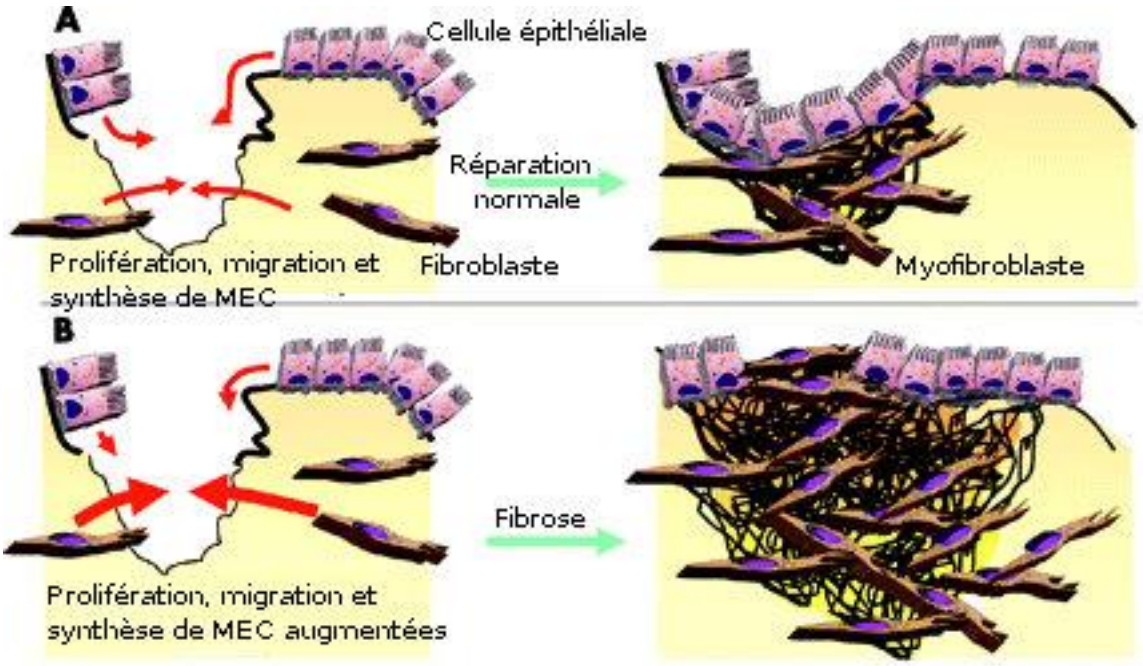


Figure 1.15 : représentation schématique de A) la réparation tissulaire normale et B) la fibrose : rôle des fibroblastes.
En situation de fibrose, on observe un nombre anormalement élevé de myofibroblastes, lesquels sécrètent plus de composants de la MEC. Adapté de [176].

De très nombreux facteurs influent sur le développement de la fibrose, en particulier le TGF-β [175]. Entre autres propriétés, il permet le recrutement des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes, mais augmente également leur contractilité, ainsi que le dépôt de composants de la MEC. Il induit l'expression de gènes comme celui du collagène [177] mais

peut également diminuer l'expression de MMP, comme la MMP-1 [178] tout en induisant l'expression des TIMP [179].

Parmi les voies de signalisation du TGF-β, la voie des Smad a été démontrée comme étant activée lors de l'induction de TIMP-1 et de l'α-actine par le TGF-β [179, 180]. Le TGF-β se fixe à son récepteur, lequel est constitué de 2 parties : le TGF-β Receptor de type I (TGFRI) et le TGFRII. Le TGFRII est activé en premier, ce qui a pour conséquence sa phosphorylation. Il phosphoryle le TGFRI, qui phosphoryle à son tour deux protéines de la famille des Smad 2 et Smad 3, via la protéine SMAD Anchor for Receptor Activation (SARA). Ces Smad phosphorylées vont former un complexe avec Smad 4, pour ensuite transloquer dans le noyau pour y activer ou y réprimer des gènes. Un schéma de la voie de signalisation du TGF-β est présenté Figure 1.16.

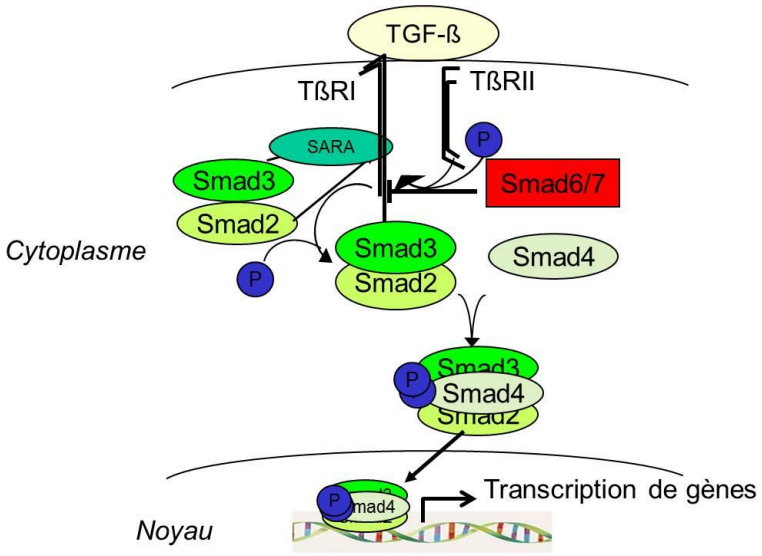


Figure 1.16 : voie de signalisation du Transforming Growth Factor-β faisant intervenir les Smad.

Le récepteur du TGF-β, une fois phosphorylé en présence de TGF-β, phosphoryle Smad 2 et Smad 3 en présence de SARA. Smad 2 et Smad 3 forment un complexe avec Smad 4, complexe qui transloque dans le noyau pour moduler l'expression de gènes.

SARA : SMAD anchor for receptor activation , TGF-β : Transforming Growth Factor-β, TGFR : Transforming Growth Factor Receptor. Adapté de [181].

3.2.3.2) Emphysème

Une autre pathologie associée au remodelage de la MEC est l'emphysème pulmonaire. Il s'agit d'une pathologie dégénérative chronique caractérisée par un déséquilibre entre la destruction et la réparation de la paroi alvéolaire, ce qui aboutit à la destruction progressive des alvéoles.

Différents processus sont impliqués dans la destruction alvéolaire lors de l'emphysème.

L'exposition à la fumée de cigarette, à des oxydants, à du LPS ou à d'autres matériaux dans le cadre d'expositions professionnelles, comme certaines poussières métalliques ou organiques [182] va induire une inflammation, via les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, tout en occasionnant des lésions dans le tissu pulmonaire. Une exposition prolongée peut activer 3 phénomènes interactifs : la destruction des alvéoles via un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases, la sénescence et l'apoptose des cellules ainsi qu'un stress oxydant [183].

Parmi les protéases impliquées dans le développement de l'emphysème, on peut citer l'élastase sécrétée par les neutrophiles. Les macrophages sécrètent en réponse à l'élastase des neutrophiles différentes protéases, y compris plusieurs MMP : la MMP-1, la MMP-2, la MMP-9 et la MMP-12 [184]. La MMP-12, en particulier, a été démontrée comme étant indispensable au développement de l'emphysème après exposition à la fumée de cigarette sur un modèle de souris [185]. De même, il a été démontré que des souris exprimant la MMP-1 humaine développaient un emphysème [174]. Les MMP sont également responsables de la dégradation de l'α_1-antitrypsine, un inhibiteur de l'élastase sécrétée par les neutrophiles [184]. De fait, une déficience en α_1-antitrypsine a été démontrée comme étant un facteur de risque génétique pour l'emphysème [186]. Il a également été démontré que les macrophages alvéolaires des patients atteints d'emphysème synthétisaient moins de TIMP-1 comparativement aux macrophages de patients non atteints d'emphysème [187]. L'augmentation de la sécrétion des MMP, associée à la diminution de sécrétion des TIMP, est susceptible de faire pencher la balance MMP/TIMP en faveur des MMP et donc de mener à la destruction de la matrice des alvéoles. Les différentes enzymes impliquées dans le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases sont présentées dans la Figure 1.17.

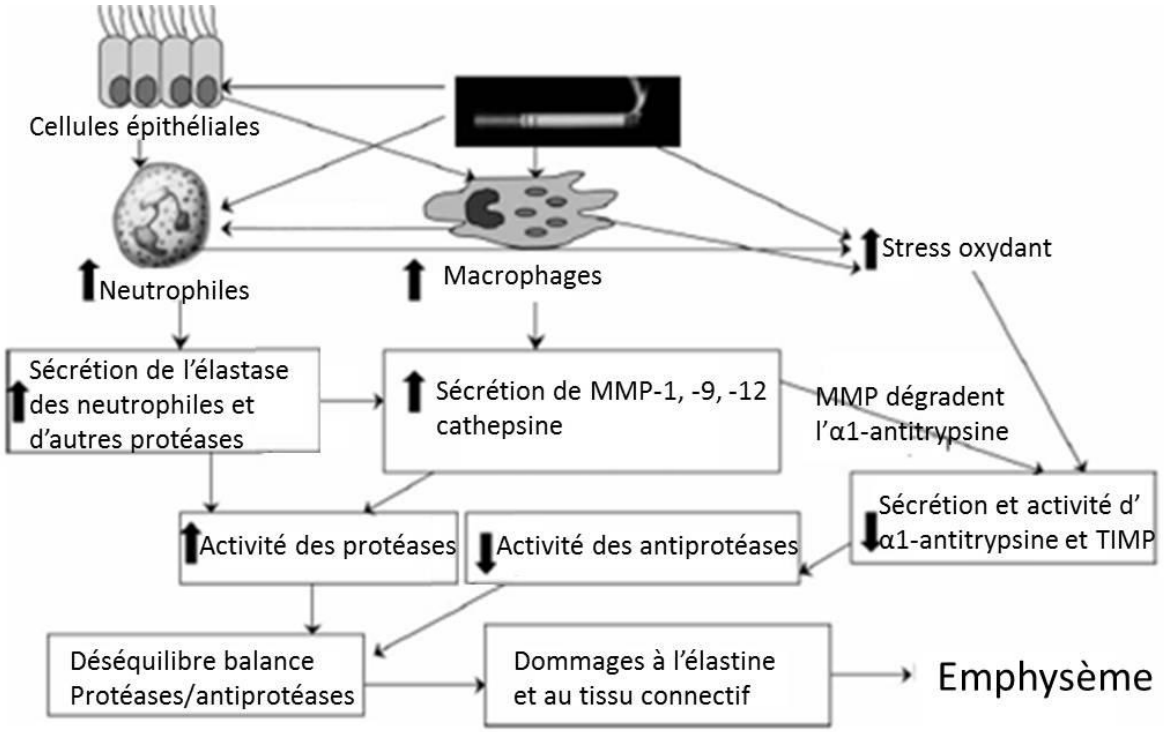


Figure 1.17 : mécanismes menant au déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases dans le poumon.
Adapté de [184].

On retrouve, dans le développement de la fibrose comme de l'emphysème, l'importance de différents membres de la famille des MMP, et en particulier la MMP-1. Une modulation de l'expression de la MMP-1 suite à une exposition aux NP de TiO_2 ou de NC est donc susceptible d'avoir des conséquences en termes de développement de ces pathologies.

Résumé du chapitre : questions non résolues au début de ces travaux de thèse, en octobre 2008

Quels sont les effets de NP de TiO_2 et de NC sur l'expression de la MMP-1 ?

L'étude de Chen et coll. [6] démontre que l'exposition aux NP de TiO_2 est susceptible d'entraîner une dégradation de la MEC. Les études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'exposition aux NP de TiO_2 pouvait entraîner une synthèse de MMP [6]. La MMP-1 joue un rôle important dans la dégradation de la MEC, bien que son expression suite à une exposition à des NP de TiO_2 n'ait pas été étudiée. En ce qui concerne l'expression de la MMP-1 après exposition aux NP de NC, il a été rapporté une expression de la MMP-1 après exposition à des NP de NC de 95 nm de diamètre sur des cellules de la lignée A549 à une dose de 10 µg/cm² [8]. Les auteurs n'ont pas observé d'effet du NC sur l'expression de la MMP-1.

Quels sont les effets de NP de TiO_2 et de NC sur le développement de pathologies respiratoires, ou sur des pathologies déjà existantes comme l'emphysème ?

S'il est possible que l'exposition aux NP de TiO_2 et de NC induise un remodelage matriciel, alors l'exposition à ces NP est donc susceptible d'induire ou d'aggraver des pathologies respiratoires. La seule étude reliant exposition aux NP de TiO_2 et pathologies pulmonaires était celle de Chen et coll., laquelle montrait que l'exposition par instillation intratrachéale de souris à des doses de 0.5 mg de NP de TiO_2 à des souris donnait lieu à des lésions pulmonaires de type emphysème [6]. L'effet aggravant des NP de NC sur des modèles de pathologies de type fibrose avait déjà été décrit [141], de même que son effet sur des pathologies de type asthme [140]. En revanche, son effet sur des pathologies de type emphysème n'était pas connu en 2008.

Quel est l'impact des caractéristiques physicochimiques des NP de TiO_2 et de NC sur leurs effets biologiques ?

Plusieurs caractéristiques physicochimiques des NP de TiO_2 et de NC ont été démontrées comme pouvant influer les effets biologiques des NP. Cependant, le déterminant principal des effets biologiques des NP n'est pas connu à l'heure actuelle. La difficulté de faire varier un seul paramètre physicochimique des NP dans les études, de manière à pouvoir évaluer l'impact précis de ce dernier, associé au manque de caractérisation des NP dans les études les plus anciennes, font qu'il était, en 2008, difficile de savoir s'il existe un déterminant principal des effets biologiques des NP.

Matériels et méthodes

1) Caractérisation des particules

Afin de pouvoir relier les effets biologiques des particules à leurs propriétés physicochimiques, il est important d'avoir une caractérisation précise de paramètres physicochimiques comme la composition chimique, la forme, la surface spécifique ou l'état d'agrégation de ces NP. Nous avons voulu caractériser les particules utilisées de façon plus approfondie que les informations données par les fournisseurs. Cette caractérisation a été réalisée lorsque les NP sont sous forme de poudre, mais également lorsqu'elles sont en solution et à l'intérieur des cellules.

Les données des 5 NP de TiO_2, de la NP de NC et du TiO_2 de taille micrométrique sont détaillées dans le tableau 2.1, telles qu'elles nous ont été transmises par les fournisseurs.

Particule	Origine	Composition	Forme	Variété cristalline (pour TiO_2)	Dimensions	Surface spécifique (m^2/g)
FW2	Evonik	NC	Sphérique		13 nm	350
Micro	Accros Organics	TiO_2	Sphérique	Anatase	200 nm	ND
A10	Nanoamor	TiO_2	Sphérique	Anatase	10 nm	120
A15	Sigma Aldrich	TiO_2	Sphérique	Anatase	<15 nm	190-290
A/R	Sigma Aldrich	TiO_2	Sphérique	Anatase/rutile	25-75 nm	20-25
Rrond	Nanoamor	TiO_2	Sphérique	Anatase 80% /rutile 20% (a)	30-40 nm	30
Rbâton	Nanoamor	$TiO_2 + SiO_2$	Forme de bâton	Rutile	10*40 nm	160

Tableau 2.1 : caractéristiques physicochimiques des particules utlisées lors de l'étude, telles que transmises par les fournisseurs.

ND : non disponible.

(a) : renseignement apporté en 2011. Au moment de l'achat, la fiche technique indiquait rutile. NC : Noir de Carbone, TiO_2 : Dioxyde de Titane.

1.1) Microscopie Electronique en Transmission

Les objectifs de cette technique sont multiples : notamment vérifier la forme et la taille des particules, leur état d'agrégation en absence de cellules.

Matériels

Les NP ont été dispersées dans l'eau à raison de 100 µg/mL et 10 µL de solution ont été déposées sur des grilles de cuivre recouvertes de formvar/carbone et effluvées (rendues hydrophiles). Les grilles ont été directement observées.

L'appareil utilisé a été un microscope Philips EM 208 (Centre Commun de Microscopie Electronique, UMR 8080, CNRS/université Paris XI). Les observations ont été réalisées au grossissement 25000, sous une tension d'accélération maximale de 80 kV.

1.2) Analyse Dispersive en Energie (EDS)

Principe

Cette technique est utilisée pour détecter la présence éventuelle d'impuretés à la surface de particules, à la suite de la microscopie électronique en transmission.

Lorsque les particules sont bombardées par les électrons du microscope, celles-ci réémettent, entre autres, des rayons X (ce phénomène est appelé fluorescence X). Les énergies de réémission des rayons X sont spécifiques des éléments chimiques présents dans la matière, donc le spectre des rayons X émis par la particule est spécifique de sa composition.

Protocole

Les suspensions de particules sont diluées dans de l'eau à raison de 100 µg/mL, déshydratées et montées sur des grilles de microscopie électronique en transmission en cuivre recouvertes d'un film formvar/carbone et effluvées. Le microscope utilisé est un Jeol 1200 EX II (Jeol, Tokyo, Japon). L'appareil permettant de réaliser l'EDS, appelé spectromètre X à énergie dispersive, est un EDS oxford, link Isis 300 (Oxford instruments Abingdon Royaume Uni). Ces analyses ont été effectuées par le Laboratoire d'Etude des Particules Inhalées (LEPI).

1.3) Méthode Braunauer, Emmett et Teller (BET)

L'objectif de cette technique est de déterminer la surface spécifique[27] d'une particule en poudre.

Principe

Cette technique est basée sur la théorie de l'adsorption de l'azote à basse température, développée par Brunauer, Emmett et Teller [188]. Cette théorie permet, à l'aide du volume d'azote adsorbé par une particule en poudre, de calculer le volume d'azote adsorbé, en monocouche, à la surface de l'échantillon. L'aire de cette monocouche, qui correspond à la surface de l'échantillon, est alors calculée à l'aide de l'aire d'une molécule d'azote et de la formule suivante :

[27] La surface réelle, comparée à la surface apparente. Cf page 6.

$$S = \frac{N_A * V_{monocouche} * A_{Azote}}{V_M}$$

Avec S la surface totale de l'échantillon en m², N_A le nombre d'Avogadro, $V_{monocouche}$ le volume de la monocouche adsorbée en m^3, A_{Azote} l'aire de l'azote en m² et V_M le volume molaire de l'échantillon en m^3.
On en déduit la surface spécifique de l'échantillon en divisant la surface obtenue par la masse d'échantillon (en g).

Protocole

L'appareil utilisé est le Micromeritics Flowsorb 2300 (Micromeritics, Norcross, USA), et les expériences ont eu lieu au CEA de Saclay, au laboratoire Francis Perrin. L'échantillon, sous forme de poudre, est d'abord pesé puis dégazé sous vide pendant 30 minutes à 200°C pour éliminer les molécules déjà déposées à la surface de l'échantillon. Ensuite, l'échantillon est refroidi, puis de l'azote gazeux est injecté et se fixe à la surface de l'échantillon. L'échantillon est réchauffé pour libérer le gaz auparavant adsorbé, dont le volume est mesuré. L'appareil en déduit le volume adsorbé ainsi que la surface de l'échantillon. L'échantillon est repesé de manière à obtenir sa masse finale après dégazage et pouvoir en déduire sa surface spécifique.

1.4) Mesure du potentiel zêta

Définition du potentiel zêta

Le potentiel zêta ζ représente la charge que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent lorsqu'elle se trouve en suspension. Une particule chargée négativement est, en solution, entourée d'une couche d'ions chargés positivement. Si on s'éloigne de la particule, le potentiel va varier pour finalement atteindre la neutralité. Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique, c'est-à-dire au niveau du plan de cisaillement[28]de la particule. Un schéma indiquant les charges et potentiels d'une particule en suspension est présenté Figure 2.1.

[28] Plan de cisaillement : limite à partir de laquelle le liquide qui entoure la particule ne la suivra pas si celle-ci se déplace

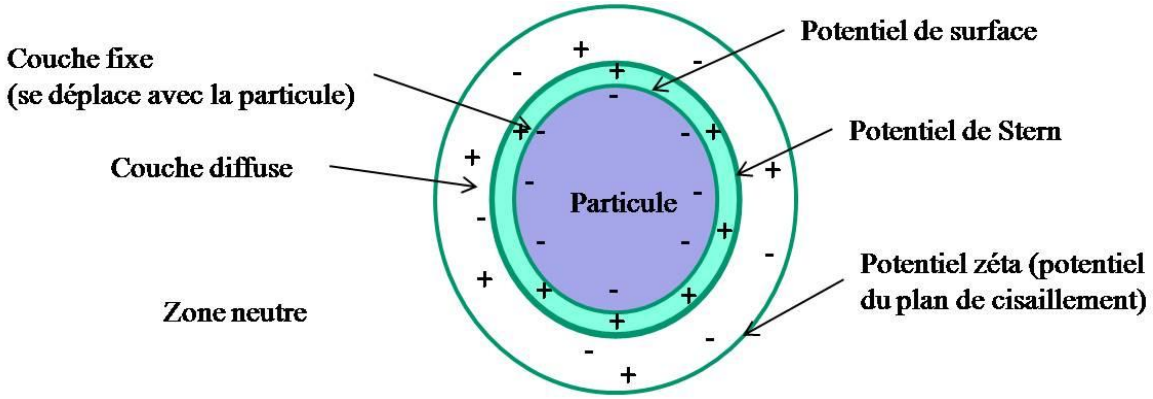


Figure 2.1 : charges et potentiels d'une particule en suspension.

En pratique, plus ce potentiel est élevé en valeur absolue, plus la charge s'intensifie. De ce fait, les particules chargées se repoussent l'une l'autre lorsqu'elles sont proches les unes des autres, ce qui assure une stabilité à la suspension (c'est-à-dire que la suspension ne s'agglomère pas). A l'inverse, si le potentiel zêta est faible en valeur absolue, les particules vont se retrouver peu chargées, et peuvent se retrouver en contact plus facilement que lorsque le potentiel zêta est élevé. Les probabilités de collision, et donc d'agglomération, se retrouvent donc augmentées et la stabilité de la suspension diminuée. Ainsi, le potentiel zêta est souvent considéré comme un indicateur de la stabilité de la suspension. Globalement, on considère qu'une solution est stable lorsque son potentiel zêta est inférieur en valeur absolue à 20 mV [189].

Le principal paramètre influant sur le potentiel zêta est le pH. En effet, lorsque le pH est acide, les particules tendent à acquérir des charges positives, et lorsqu'il est basique, les particules tendent à acquérir des charges négatives. De ce fait, on définit le point isoélectrique pI comme le pH pour lequel le potentiel zêta est nul.

Principe de la mesure

La mobilité des particules dépend, entre autres, de leur charge propre et de la charge du cortège d'ions qui les entoure, donc de leur potentiel zêta. En calculant la vitesse de déplacement des particules dans un milieu donné, on peut donc obtenir leur potentiel zêta. Pour ce faire, l'appareil applique un champ électrique dont le signe change régulièrement dans la suspension, ce qui entraîne le déplacement des particules d'un pôle à l'autre. La mesure de leur vitesse se fait grâce à la technique de vélocimétrie laser Doppler, technique qui repose sur la mesure du décalage en fréquence de faisceaux laser éclairant la solution.

Protocole

Ces expériences ont eu lieu au laboratoire Francis Perrin. L'appareil utilisé est le ZetaSizer HS 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Les particules sont diluées à 100 µg/mL dans du DMEM sans rouge de phénol et directement injectées dans l'appareil en faisant attention de ne pas introduire de bulles pour ne pas perturber la mesure.

Pour la détermination du point isoélectrique, 50 mL de suspension de particules à 100 µg/mL sont préparés. La sonde pH est d'abord calibrée, puis on rajoute à la suspension 0.5 mL de NaCl à 10 mM pour vérifier qu'il y a assez de contre-ions. La titration est réalisée entre pH 3 et pH 10.

1.5) Spectroscopie par corrélation de photons (SCP)

Cette technique, appelée aussi diffusion dynamique de la lumière ou diffusion quasi élastique de la lumière, est la seule permettant d'obtenir le diamètre hydrodynamique (diamètre prenant en compte la couche de solvatation au voisinage des particules) de particules en suspension de taille comprise entre 3 nm et 3 µm [190].

Principe

Lorsqu'une suspension colloïdale est traversée par un faisceau de lumière monochromatique et focalisée (un rayon laser), les particules dispersent une partie de ce faisceau dans toutes les directions. L'intensité du faisceau ainsi dispersé varie en fonction du temps, du fait du mouvement brownien[29] et donc de l'éloignement des particules. A l'aide d'un photomultiplicateur, l'appareil analyse les fluctuations d'intensité pour en déduire le coefficient de diffusion des particules. On obtient ensuite le diamètre hydrodynamique des particules à partir de leur coefficient de diffusion grâce à l'équation de Stokes-Einstein, en supposant que les particules soient sphériques.

Protocole

Ces expériences ont eu lieu au laboratoire Francis Perrin. L'appareil utilisé est le ZetaSizer HS 3000.

[29] Mouvement aléatoire dû aux chocs avec les petites molécules du fluide

Les particules sont diluées à une concentration de 100 µg/mL : toutes les particules sont diluées dans le milieu de culture des cellules. De plus, les NP A15 et FW2, qui sont utilisées diluées dans de l'Albumine de Sérum Bovin (ASB) dans les études sur les rats, sont également diluées dans l'ASB. Les différentes suspensions sont soniquées comme pour une stimulation de cellules, c'est à dire 10 minutes dans un bain à ultrasons Elmasonic S30H, Elma 50-60 Hz. Les suspensions sont ensuite mélangées par pipetage/refoulement, et la lecture est faite immédiatement. L'expérience est réalisée 3 fois pour chaque particule.

1.6) Production per se de ROS : plasmide phiX174 RFI

Principe

La capacité des particules à générer des ROS par elles-mêmes, c'est-à-dire en dehors de tout contexte cellulaire, a été mesurée. Pour cela, nous avons utilisé les propriétés de l'ADN du plasmide phiX174 RFI. Cet ADN est en effet superenroulé, et il a la capacité de se désenrouler lorsqu'il se trouve en présence de ROS [191]. De plus, il peut être linéarisé s'il se trouve en présence d'endonucléase.

Protocole

290 ng d'ADN de plasmide (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) ont été mis en présence de particules à 1000 µg/mL diluées dans de l'eau, pendant 8 heures à 37°C. Un contrôle positif a été réalisé en incubant le plasmide avec une endonucléase de restriction, la PstI (Life Technologies). Un contrôle négatif a été réalisé, sans enzyme de restriction ni particules.

Après l'incubation, les différentes formes de l'ADN (superenroulé, désenroulé, linéarisé) sont séparées sur un gel d'agarose à 0.8% pendant 16 heures à 30 mV.

1.7) Evaluation de la présence d'endotoxines : test Limulus Amebocyte Lysate

Principe

Les endotoxines sont des composants de la membrane externe des bactéries Gram négatives, et sont composées de lipides, glucides et LPS. Le LPS est reconnu comme ayant le plus d'effets biologiques parmi les différentes endotoxines. La présence d'endotoxines est un paramètre important à examiner sur les particules de l'étude, car ces endotoxines peuvent induire des effets inflammatoires forts, en particulier via l'activation de l'inflammasome [192].

Protocole

Les particules de la solution stock ont été soniquées pendant 10 minutes, avant d'être centrifugées à 18000 g pendant 10 minutes. Les surnageants ont été récupérés, avant d'être centrifugés une deuxième, puis une troisième fois. La quantité d'endotoxine des surnageants finaux a été réalisée avec le kit QCL-1000 (Lonza, Basel, Suisse).

L'absorbance a été mesurée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan Ex, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA).

2) Culture cellulaire

2.1) Cellules

2.1.1) Lignée cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé dans cette étude est la lignée MRC-5 (CCL-171, ATCC, Manassas, VA, USA). Il s'agit de fibroblastes non transformés, dérivés de tissus pulmonaires fœtaux humains. Les cellules sont cultivées dans un milieu Dubelcco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM, Life Technoligies) contenant 4.5 g/L de glucose, supplémenté en antibiotiques (streptomycine : 100 µg/mL et pénicilline : 100 U/mL, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Autriche) et en Sérum de Veau Fœtal (SVF, PAA) à 10%, à 37°C dans un incubateur humidifié à 5% de CO_2. Des images représentatives des cellules en culture sont représentées Figure 2.2.

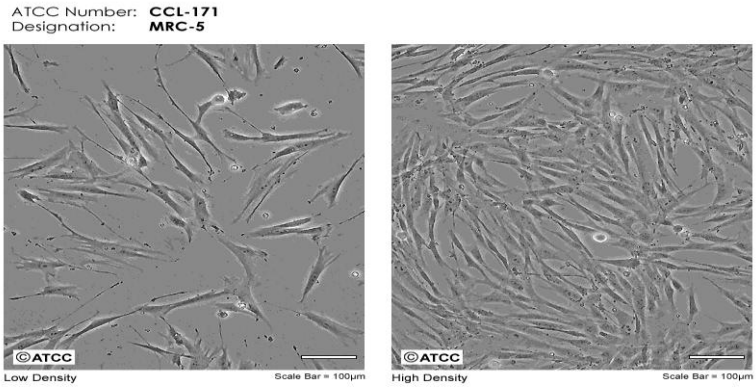


Figure 2.2 : cellules MRC-5 à faible densité (à gauche) et forte densité (à droite) observées en microscopie optique[30].
Barre d'échelle : 100 µm

[30] Adapté du site internet http://www.lgcstandards-atcc.org/Attachments/1752.jpg, consulté en ligne le 23 août 2011

Dans toutes les expériences, les cellules sont ensemencées à une densité permettant 80 % de confluence en 3 jours (soit $1.6x10^4$ cellules par cm^2).
Toutes les expériences ont été réalisées entre le 18ème et le 22ème passage des cellules.

2.1.2) Fibroblastes primaires

Des fibroblastes humains ont été obtenus à partir de biopsies de poumons de 3 patients non fumeurs opérés pour une exérèse de cancer du poumon. Les fibroblastes ont été obtenus à l'hôpital Xavier Bichat, à Paris, d'un fragment de poumon situé à distance de la zone tumorale et isolés comme décrit par l'équipe d'Akamine [193]. L'exposition aux particules a eu lieu au passage 5.

2.2) Exposition des cellules aux particules

Les particules sont préparées dans du DMEM sans SVF ni rouge de phénol, à des doses de 2 mg/mL. Elles sont ensuite aliquotées et congelées à l'abri de la lumière.
Avant chaque exposition aux particules, les cellules sont rincées avec du milieu sans SVF, afin d'éliminer toute trace de ce dernier. En effet, le SVF est connu pour être un agent dispersant des particules [194] et nous avions décidé de ne pas utiliser d'agent dispersant, afin d'observer les effets de particules sans qu'elles aient subi de modification. Après leur décongélation, les particules sont soniquées : 10 minutes dans un bain à ultrasons Elmasonic S30H, Elma 50-60 Hz. Elles sont ensuite diluées dans du DMEM sans SVF pour atteindre leur concentration finale. Les concentrations utilisées vont de 0.2 à 400 µg/cm^2.
Selon les expériences, les cellules sont exposées aux particules dans des puits de différentes surfaces, et c'est pour conserver le ratio entre le volume de milieu de culture et la surface occupée par les cellules que la concentration des particules est exprimée en µg par la surface occupée par les cellules. La quantité de milieu de stimulation est donc fixée, ici à 200 µL/cm^2.

Dans certaines expériences, les cellules ont été prétraitées avant leur exposition aux particules : avec de la N-Acétyl Cystéine (NAC, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) à 5 mM pendant 1 heure, avec de l'IL-1 Ra (R&D System Europe, Abingdon, UK) à 50 ng/mL pendant 2 heures. Enfin, dans d'autres séries d'expériences, les cellules ont été traitées avec 10 ng/mL de TGF-β (R&D Systems) après leur exposition aux particules.

3) Etude *in vivo*

3.1) Animaux

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (Ineris), de Verneuil en Halatte.

L'étude a porté sur 240 rats Sprague-Dawley mâles âgés de 6 à 8 semaines, pesant entre 250 et 300 grammes. Ils ont été obtenus auprès de Janvier (Le Genest Saint Isle, France) et ont été logés dans l'animalerie conventionnelle de l'Ineris, à Verneuil en Halatte. Ils ont été gardés dans une animalerie avec air conditionné (22°C, 60% d'humidité relative) et ont eu accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité local d'éthique pour l'expérimentation animale.

3.2) Exposition des animaux

L'expérimentation a été réalisée selon le protocole suivant :

Au temps J1, après une anesthésie avec un mélange de kétamine (1.6 mg, Merial, Lyon, France) et de xylazine (300 µg, Bayer, Puteaux, France), la mise en place d'une canule et la mise sous respirateur (UGO BASILE) à une fréquence de 150 mouvements par minute pendant 30 secondes, 120 rats ont été instillés par voie intratrachéale avec 150 µL de sérum physiologique à 0.9% et 120 autres avec de l'élastase pancréatique porcine à 150 U (Elastin Products Company, Owensville, USA).

Au temps J7, dans chacun des deux groupes, les rats ont été instillés avec de l'ASB à 0.5 mg/mL, des NP A15, ou des NP de FW2. Les NP ont été mises en suspension dans de l'ASB, le volume de NP instillé étant de 150 µL. Deux séries d'expériences ont été réalisées : une dans laquelle la quantité de NP instillée était de 100 µg par animal, et l'autre dans laquelle la quantité était de 500 µg par animal.

La moitié des rats de chaque groupe a été sacrifiée à J8, soit le lendemain de l'instillation des NP et l'autre moitié à J21, soit 14 jours après l'instillation des NP. Le sacrifice a été réalisé par injection par voie intrapéritonéale de 0.5 mL de penthobarbital. Au total, 24 groupes expérimentaux de 10 rats ont ainsi été obtenus. Le protocole expérimental est résumé sur la Figure 2.3.

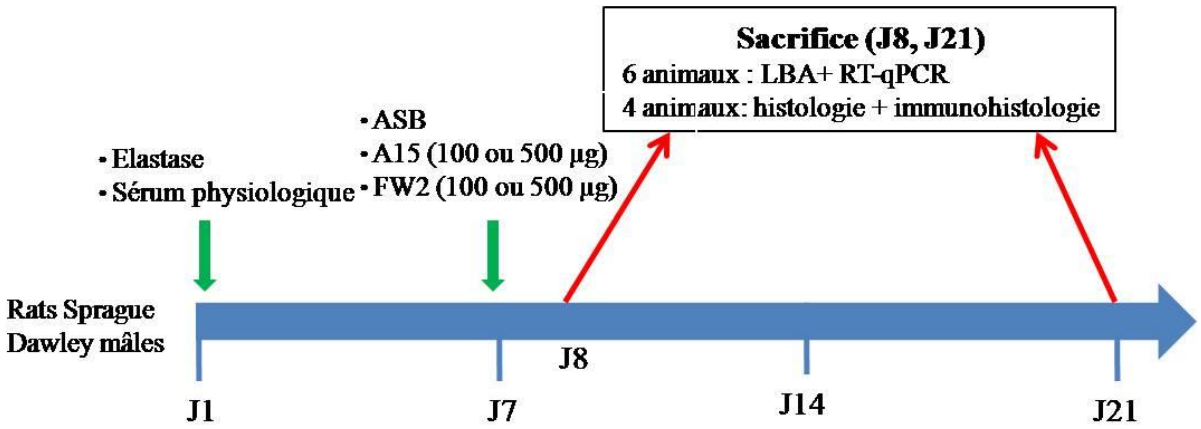


Figure 2.3 : protocole expérimental de l'étude *in vivo* : exposition des animaux et prélèvements/analyses réalisés.
ASB : Albumine de Sérum Bovin, LBA : Lavage Bronchoalvéolaire, PCR : Polymerase Chain Reaction.

Les animaux de chaque groupe sont répartis comme suit :

- Pour 6 rats de chaque groupe ont été effectués un recueil du liquide de LBA et un prélèvement d'une partie du parenchyme pulmonaire afin de permettre l'étude de l'expression en ARNm de différents marqueurs grâce à la technique de Polymérase Chain Reaction quantitative en temps réel (RT-qPCR).

- Pour 4 rats de chaque groupe, les poumons ont été fixés et conservés avec du formaldéhyde à 4%, puis inclus en paraffine. Les poumons sont coupés de façon sagittale en coupes de 5 µm d'épaisseur, de la même manière pour tous les animaux. Certaines lames ont été gardées « blanches » pour permettre des analyses en immunohistochimie, d'autres ont été colorées à l'Hématoxyline-Eosine (HE) pour les analyses morphologiques.

Pour réaliser le LBA, les poumons ont été lavés 3 fois avec 9 mL de Phosphate Buffered Saline (PBS, Life Technologies). Le LBA obtenu a été centrifugé (5 minutes, 150 g à +4°C). Le comptage des cellules a été réalisé, après coloration au bleu trypan, sur des cellules de comptage May-Grünwald-Giemsa.

4) Cytotoxicité

Deux tests ont été utilisés afin de mesurer la toxicité induite par les particules utilisées. Le premier test, le WST-1, mesure l'activité mitochondriale des cellules. Le deuxième test,

réalisé grâce au Hoechst, un intercalant de l'ADN, est utilisé afin de quantifier le contenu en ADN des cellules.

4.1) WST-1

Principe

Le test WST-1 (Roche, Grenoble) a pour but d'évaluer la toxicité cellulaire au niveau mitochondrial. Le WST-1 (4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzène disulfonate) est un sel de tétrazolium de couleur rose. Sous l'action des succinate réductases de la chaîne respiratoire mitochondriale, il est réduit en formazan, composé jaune qui absorbe à 450 nm. Comme seules les mitochondries des cellules vivantes peuvent réduire le WST-1, l'absorbance à 450 nm est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Protocole

Les cellules sont exposées aux particules à des concentrations de 0.2 µg/cm², 2 µg/cm², 10 µg/cm², 20 µg/cm², 100 µg/cm² ou 400 µg/cm² pendant 6, 24 ou 48 heures. Elles sont rincées avec du DMEM sans Hépès, ni rouge de phénol, ni SVF, puis mises en contact avec 100 µL par puit de WST-1 dilué au 1/10ème dans du milieu de culture. Après une incubation à 37°C à l'obscurité pendant 2 heures, l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Multiskan Ex, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA). Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules non traitées (cellules contrôle). Afin de vérifier l'absence d'interférences entre les particules et le test, 400 µg/cm² de particules ont été mises en contact avec le réactif en l'absence de cellules. Aucune interférence n'a été observée.

4.2) Quantification de l'ADN

Principe

La quantification de l'ADN se fait à l'aide de la bisbenzimide (ou Hoechst 33258), marqueur fluorescent qui se lie aux séquences AT de l'ADN double brin. Elle donne une indication du nombre de cellules vivantes.

Protocole

Les cellules sont exposées aux particules à des concentrations de 0.2 µg/cm², 2 µg/cm², 10 µg/cm², 20 µg/cm², 100 µg/cm² ou 400 µg/cm² pendant 6, 24 ou 48 heures. Elles sont ensuite rincées au milieu DMEM sans Hépès ni rouge de phénol ni SVF. Le milieu est remplacé par

200 µL d'une solution de Hoechst à 0.4 µg/cm² (DNA quantification kit fluorescence assay, Sigma Aldrich). La lecture se fait avec un lecteur de plaque à fluorescence (TriStar LB 941, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), la longueur d'onde d'excitation est à 360 nm et celle d'émission à 460 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (cellules contrôle).

Afin de vérifier l'absence d'interférences entre les particules et le test, une concentration connue d'ADN a été mise en contact avec les particules. Aucune interférence n'a été détectée.

5) Mesure de la production de ROS

Principe

La mesure de la production de ROS par les cellules a été réalisée à l'aide de la sonde 2'–7' dichlorodihydrofluorescéine diacétate (DCFH-DA). Cette sonde, lorsqu'elle est internalisée par les cellules, est clivée par les estérases cellulaires pour donner le DCFH. Ce sont ensuite les ROS produits par la cellule qui l'oxydent en DCF, composé fluorescent.

Protocole

Le DCFH est suspendu dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration 8 mM. Il est dilué au 1/100ème dans du milieu de culture, avant d'être mis en présence des cellules pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite rincées et exposées aux particules à la dose 10 µg/cm² pendant 1, 3, 6, 24 ou 48 heures. La lecture est réalisée sur un fluorimètre TriStar LB 941 à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm (longueur d'onde d'émission de 520 nm). Les résultats sont rapportés à ceux du témoin sans particules.

6) Etude de la transcription de gènes par RT-qPCR

6.1) Extraction des ARNm

6.1.1) A partir des cellules

Les cellules sont exposées pendant 6, 24 et 48 heures aux doses de 10 et 100 µg/cm².

L'extraction d'ARNm est réalisée à l'aide du kit Nucleospin RNA II^{TM} (Macherey-Nagel GmbH& Co. KG, Düren, Allemagne) conformément aux instructions du fournisseur.

6.1.2) A partir des poumons de rats

Les poumons des rats ont été broyés suivant le protocole indiqué par le kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne) et 30 mg de poumon total de chaque animal a été récupéré. L'ARNm a ensuite été extrait conformément aux instructions du kit.

La qualité des ARNm obtenus, que ceux-ci proviennent des cellules ou des poumons des rats, a été vérifiée en les faisant migrer sur un gel contenant 1.6% d'agarose. Ceci permettait de séparer les sous unités 18S et 28S des ARNm.

6.2) Transcription inverse

La transcription inverse, qui donne lieu à la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire, est ensuite réalisée. Pour ce faire, un mélange d'oligodT (0.4 µL), de random hexamer (0.4 µL), et d'eau (1.2 µL) est rajouté à 1 µg d'ARN préalablement dosé. De l'eau DNAse et RNAse free est ensuite ajoutée afin d'obtenir un volume final de 30 µL. Ce mélange est dénaturé 2 minutes à 70°C. La température est ensuite diminuée afin de permettre l'hybridation des oligonucléotides avec l'ARNm. La transcription reverse est enfin réalisée en ajoutant l'enzyme MMLV (2 µL de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Life Technologies) en présence de dNTP (2 µL à 10 mM), de son tampon (10 µL tampon MMLV, Invitrogen) et d'eau RNase et DNase free (5 µL), pendant 2 heures à 37°C. L'ADNc obtenu est directement utilisable pour la PCR, au cours de laquelle il sera amplifié.

6.3) PCR

Les ADNc obtenus sont amplifiés à l'aide d'un kit de détection Sybr QPCR Supermix (Life Technologies). Pour ce faire, 5 µl d'ADNc dilué au 1/10ème, dans de l'eau DNase et RNase-free, sont ajoutés à 15 µl d'un mélange contenant du SybrGreen (qui émet un signal fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN), la JumpTaq polymérase, du ROX (servant de fluorochrome passif permettant de normaliser les résultats), de l'eau et les primers des gènes à étudier (à 43 ng/ml).

La PCR est réalisée avec un appareil ABI PRISM 7000 Sequence (Life Technologies). Elle se déroule en trois étapes : un premier cycle de 2 minutes à 94 °C pour activer l'enzyme, suivi de 40 cycles de 30 secondes à 94°C et de 1 minute à 60°C, afin d'amplifier la séquence correspondant aux amorces. Enfin, 1 minute à 94°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 94°C permettent de dissocier l'ADN, obtenant ainsi la courbe de dissociation qui sert à vérifier la qualité de l'amplification obtenue.

Une particularité de cette technique est le choix d'un gène de référence ou gène de ménage. Il permet de normaliser les différences liées à la qualité et à la quantité des acides nucléiques extraits. Ce gène doit être un gène endogène d'expression constante et être amplifié par PCR avec une efficacité similaire à celle du gène cible. Il est important de valider la stabilité d'expression du gène choisi comme référence en vérifiant que les niveaux d'expression de ce gène sont équivalents dans les différentes conditions expérimentales.
Deux gènes de ménage ont été sélectionnés : chez l'Homme, il s'agit du Splicing factor 3A subunit 1 (SF3A1). Chez le rat, le gène de ménage sélectionné est celui de l'Hypoxanthine Phosphoribosyltransférase (HPRT).

Les séquences des amorces utilisées pour les différents gènes étudiés sont décrites dans les Tableaux 2.2 (amorces humaines) et 2.3 (amorces de rat). Les résultats sont exprimés en rapportant les résultats obtenus pour les différents gènes d'intérêt aux résultats obtenus pour le gène de ménage.

Nom	Numéro d'accès Genbank	Séquences (5'-> 3')	Taille du produit (bp)
SF3A1	NM_005877 NM_001005409	Sens : GCAGGATAAGACGGAATGGAAACTGA Antisens : TAGTAAGCCAGTGAGTTGGAATCTTTG	179
MMP-1	NM_002421	Sens : ACTGCCAAATGGGCTTGAAG Antisens : GTCCCTGAACAGCCCAGTACTT	92
α-actine	NM_001613 NM_001141945	Sens : CCTGTGAAGCAGCTCCAGCTA Antisens : TTTTGTCCCATTCCCACCAT	175
Procollagène-1 α1	NM_000088	Sens : CCAGAAGAACTGGTACATCAGCAA Antisens : CGCCATACTCGAACTGGAATC	95
MMP-2	NM_004530 NM_001127891	Sens : GCGGCGGTCACAGCTACTT Antisens : AGTCGGATTTGATGCTTCCAA	96
TIMP-1	NM_003254	Sens : AGACCTACACTGTTGGCTGTGAG Antisens : GACTGGAAGCCCTTTTCAGAG	130
HO-1	NM_002133	Sens : TTCTTCACCTTCCCCAACATTG Antisens : CAGCTCCTGCAACTCCTCAAA	164
NOX-1	NM_013955 NM_007052	Sens : GGCTCCAAACCACCTCTTGA Antisens : ACATTCAGCCCTAACCAAACAAC	90
NOX-2	NM_000397	Sens : CCAGTGAAGATGTGTTCAGCTATGA Antisens : AACCACTCAAAGGCATGTGTGT	169
NOX-3	NM_015718	Sens : CCCTGGAAACACGGATGAGT Antisens : GTCCACAGAAGAACACGCCAAT	237
NOX-4	NM_016931 NM_001143836 NM_001143837	Sens : CCATCTAGTCAAGACTCCGAAATTC Antisens : GATTCCTCAAATGGACTTCCAAA	98
NOX-5	NM_024505	Sens : CGGCCCCCTTTTTTTCACTA Antisens : GCCTTGGGACCGAATGTG	144
TGF-β	NM_000660	Sens : GGCCTTTCCTGCTTCTCATG Antisens : GGTCCTTGCGGAAGTCAATG	153
IL-1β	NM_000576	Sens : GACTCACAGCAAAAAAGCTTGGT Antisens : TCAACACGCAGGACAGGTACA	187

Tableau 2.2 : séquences des amorces des différents gènes humains étudiés.

Nom	Numéro d'accès Genebank	Séquences (5'-> 3')	Taille du produit (bp)
HO-1	NM_012580.2	Sens : TGCTGACAGAGGAACACAAAGA Antisens : CGGTCGCCAACAGGAAACT	186
IL-1β	NM_031512.2	Sens : CTGTGACTCGTGGGATGATG Antisens : GGGATTTTGTCGTTGCTTGT	210
MCP-1	NM_031530	Sens : CCAGAAACCAGCCAACTCTCA Antisens : TGTGAACAACAGGCCCAGAAG	90
MIP-2	NM_053647.1	Sens : AGGATCGTCCAAAAGATACTGAACA Antisens : TTGATTCTGCCCGTTGAGGTA	90
MMP-1	NM_001134530.1	Sens : GCCAACAGGTGCAACAACAC Antisens : GCATCAAGTTTACCTGGCAGATT	186
MMP-12	NM_053963.2	Sens : CCCCAACACATTTCGTCTCTCT Antisens : GGATTTGTCAAGGATGGGTTT	90
HPRT	NM_012583.2	Sens : TGCTGAAGATTTGGAAAAGGTGT Antisens : TTATGTCCCCCGTTGACTG	261

Tableau 2.3 : séquence des amorces des différents gènes de rat étudiés.

7) Etude de l'expression protéique

7.1) Western-Blot

Principe

Le Western Blot est une technique permettant l'identification d'une protéine spécifique dans un échantillon. Il permet également de quantifier celle-ci, mais d'une manière semi-quantitative.

7.1.1) Recueil des cellules

Après exposition des cellules aux particules, les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X, puis, 150 µL de tampon de lyse sont ajoutés. La composition du tampon de lyse est la suivante :

NaCl 150 mM

Hepes 10 mM

Saccharose 500 mM

Na_2 EDTA 1 mM

Nonidet (Igepal) 1%

Un cocktail anti-protéases (Sigma Aldrich) a été rajouté à 1X, ainsi qu'un cocktail anti-phosphatases (Sigma Aldrich) à 1X. Les boîtes de culture sont ensuite 'grattées' et les lysats récupérés, puis congelés.

7.1.2) Western Blot

La concentration en protéines est déterminée par la technique de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Des quantités égales de protéines (25 µg) sont déposées et migrent sur un gel de polyacrylamide à 10%, avant d'être transférées sur une membrane de PolyVinylidène DiFluoride (PVDF, Bio-Rad) pendant la nuit à 20 V à 4°C. Les sites non spécifiques des membranes sont bloqués à l'aide d'une solution de Tris-buffered saline + 0.2% Tween (TTBS) et lait à 10% pendant une heure à température ambiante. Puis, après 3 lavages de 10 minutes dans du TTBS, les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire + BSA 1% dans du TTBS à la dilution 1 :1000 pendant une heure à température ambiante. Après 3 lavages dans le TTBS, elles sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la péroxydase (anti souris ou anti lapin, GE Healthcare, Little Chalfont, Angleterre) dilué dans du TTBS+BSA 1%, pendant une heure à même température. Après 3 autres lavages, la

détection est faite en utilisant l'Enhanced Chemi Luminescence (ECL, BioRad) pendant 5 minutes, puis la révélation est effectuée sur une développeuse (AGFA Curix 60, Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgique). Un récapitulatif des différents anticorps utilisés est présenté dans le Tableau 2.4.

Protéine	Concentration finale	Origine	Référence fournisseur
MMP-1	0.5 µg/mL	R&D	MAB901
HO-1	1 µg/mL	Enzo life sciences	HC3001
Smad 2	1 µg/mL	Cell Signaling	3103
Smad 2P	1 µg/mL	Cell Signaling	3108
Smad 3	1 µg/mL	Cell Signaling	9513
Smad 3P	1 µg/mL	Cell Signaling	9520
Smad 7	1 µg/mL	R&D Systems	MAB2029
Emmprin	0.5 µg/mL	BD Pharmingen	555961
Caspase-1	1 µg/mL	Cell Signaling	2225
IκB-α	1 µg/mL	Cell Signaling	9247
β-actine	1 µg/mL	Sigma-Aldrich	A5316

Tableau 2.4 : Anticorps utilisés en Western Blot.

Pour les Smad 2 et 3, l'intensité de la bande pour la protéine phosphorylée est rapportée à l'intensité obtenue pour la protéine non phosphorylée. Pour la caspase-1, dont on mesure l'activation, l'intensité de la bande clivée (p20) est rapportée à l'intensité observée pour la procaspase-1. Pour les autres protéines étudiées, l'intensité est rapportée à celle de la β-actine, qui sert de référence.

7.2) Immunohistochimie

Principe

L'immunohistochimie est une technique permettant de détecter et d'identifier une protéine spécifique dans une coupe de tissu.

Protocole

Les coupes de poumon gardées « blanches » sont déparaffinées par du xylène, puis réhydratées par une succession de bains d'alcool à concentration décroissante. Les sites spécifiques sont démasqués par l'action d'acide citrique 10 mM à pH 6 pendant 30 minutes. Ces sites aspécifiques sont ensuite bloqués par l'action de 1.5% de sérum correspondant à l'espèce de l'anticorps secondaire pendant 1 heure. Après rinçage au PBS, l'anticorps primaire est rajouté sur la nuit à +4°C.

La liste des anticorps utilisés est présentée dans le Tableau 2.5.

Protéine	Concentration finale	Origine	Référence fournisseur
MMP-12	0.2 µg/mL	Santa Cruz Biotechnology	SC-8839
CD68	0.5 µg/mL	Abcam	ab31630

Tableau 2.5 : Anticorps utilisés en immunohistochimie.

Nous avons utilisé deux anticorps primaires : le premier, de chez Santa Cruz Biotechnology CA, USA) est dirigé contre la MMP-12, et est dilué au 1/100ème, pour une concentration finale de 0.2 µg/mL. Le second, de chez Abcam (Cambridge, Royaume-Uni), est dirigé contre un marqueur des macrophages, le CD68, et est dilué au 1/100ème, pour une concentration finale de 0.5 µg/mL.

Après rinçage de l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire biotinylé, dilué à 5µg/mL, est incubé avec les coupes pendant 30 minutes. Les coupes sont ensuite rincées, et incubées 30 minutes avec le complexe avidine/biotine (Vector Avidine Phosphatase, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Après une autre étape de rinçage, on rajoute le substrat Vector Red (Vector Laboratories) pendant 20 minutes. Les lames sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer (Vector Laboratories) pendant 20 secondes avant d'être déshydratées et montées. Un contrôle négatif a été réalisé en remplaçant l'anticorps primaire par du sérum correspondant à l'espèce de cet anticorps. La quantification a été réalisée via le logiciel ImageJ [195].

7.3) ELISA

Principe

L'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est une technique visant à détecter et à quantifier précisément la présence d'une cytokine dans un échantillon biologique.

Protocole

Les cellules ont été exposées aux particules à 10 ou 100 µg/mL pendant 6, 24 ou 48 heures. Elles ont été rincées avec du DMEM, puis mises en contact avec du PBS contenant 1% de Nonidet et 1% d'anti-protéases (Sigma Aldrich), centrifugées à 250 rotations par minute (rpm) pendant 1 heure à 4°C. Le contenu des puits a été récupéré par « grattage » avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 15000 g à +4°C. La quantité d'IL-1β présent dans ces surnageants a été déterminée à l'aide de l'ELISA dirigé contre l'IL-1β (R&D Systems) selon le protocole du fournisseur.

7.4) Mesure de l'activité de la MMP-1

Principe

La mesure de l'activité de la MMP-1 permet d'évaluer la quantité d'enzyme active.

Protocole

Les cellules ont été exposées aux particules à 10 ou 100 µg/mL pendant 6, 24 ou 48 heures. Leur surnageant a été récupéré, aliquoté et congelé à -80°C. L'activité de la MMP-1 présente dans ces surnageants a été mesurée à l'aide du kit Human Active MMP-1 Fluorescent Assay (R&D Systems, référence F1m00).

8) Etude morphologique des cellules

8.1) Microscopie optique

Protocole

Les cellules sont exposées pendant 48 heures à 2 µg/cm² de particules, avant d'être fixées par du paraformaldéhyde à 4%. Elles sont ensuite colorées à l'aide d'une solution de Giemsa (Sigma Aldrich) diluée au 1/20 dans l'eau, puis montées et observées au grossissement 20 avec un microscope Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen,Germany). L'observation a porté sur la totalité des cellules contenues dans le puit.

8.2) Microscopie électronique à transmission dans les cellules

Protocole

Les cellules sont exposées pendant 48 heures à 10 µg/cm² de particules. Elles sont ensuite rincées, fixées dans une solution à 2% de glutaraldéhyde, puis post-fixées dans une solution à 1% d'osmium. Une déshydratation est réalisée en plaçant les cellules dans des bains d'alcool de concentration croissante, avant d'inclure les cellules dans une résine Epon (kit 45359-1EA-F, Sigma Aldrich). Des coupes ultrafines (70-90 nm d'épaisseur) des échantillons sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Leica EM FC6 (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA) équipé d'un couteau diamant Diatome (Diatome AG, Bienne, Suisse). L'observation a été réalisée sur un microscope Philips EM 208 du Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay, au grossissement 2000. L'observation a porté sur la totalité des cellules présentes sur une coupe.

9) Analyses histologiques sur tissu pulmonaire

Deux types d'analyses histologiques ont été réalisés dans cette étude : la quantification de différents paramètres d'inflammation pulmonaire et la quantification de l'emphysème pulmonaire. Les lésions inflammatoires et emphysémateuses ont été observées au microscope optique Zeiss Axiophot. Leur quantification a été effectuée par une étude morphométrique informatisée à l'aide du logiciel *Zeiss Axiovision 40*.

9.1) Inflammation pulmonaire

L'étude histologique de l'inflammation a porté sur la totalité de la coupe colorée en HE. Le repérage des lésions à type d'alvéolite, d'œdème périvasculaire et d'infiltrats périvasculaire et péribronchique, qui sont des critères habituellement décrits dans la littérature [196] a été effectué au grossissement 5 et la taille de la surface contourée a été fournie directement grâce au logiciel *Axiovision 40*. La pertinence des observations effectuées a été validée avec le Dr J. Fleury, anatomopathologiste à l'hôpital Tenon, à Paris.

9.2) Emphysème

La quantification de l'emphysème a été réalisée sur neuf champs par coupe, à raison d'une coupe par animal. Ces champs ont été observés et photographiés au grossissement 40. Trois champs se trouvaient sur la région crâniale, trois sur la région médiane et trois sur la région caudale, et ce en excluant les champs sur lesquels on observait des gros vaisseaux ou bronches. L'emphysème a ensuite été quantifié grâce au logiciel ImageJ, en mesurant la longueur moyenne de corde des alvéoles, qui correspond à la moyenne des dimensions des alvéoles. Plus la longueur de corde est élevée, plus l'emphysème est important.

10) Statistiques

Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois de façon indépendante. Les résultats sont comparés à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi, lorsqu'une différence était détectée, par un test de Mann-Whitney pour une comparaison des différents groupes deux à deux. Le seuil de 5% a été utilisé pour considérer les résultats comme statistiquement significatifs. Le logiciel utilisé est GraphPadPrism 4.0 (La Jolla, CA, USA).

Résultats

Première étude

Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur l'expression et l'activité de la Matrix Metalloprotease-1 dans un modèle de fibroblastes pulmonaires humains

Lucie Armand, Esther Belade, Angélique Simon-Deckers, Sabine Le Gouvello, Corinne Duprez, Chantal Tharabat, Jean-Claude Pairon, Jorge Boczkowski, Sophie Lanone

Soumis à Environmental Health Perspectives

Résumé de l'article

Introduction

L'objectif de cette étude est de répondre au premier objectif de la thèse : examiner les effets des NP de TiO_2 en termes d'expression et d'activité de la MMP-1, dans un modèle expérimental de lignée cellulaire de fibroblastes fœtaux pulmonaires humains.

Le but de cette étude est également de déterminer les mécanismes impliqués dans ces effets, et d'évaluer leurs déterminants physicochimiques, en utilisant des NP de TiO_2 de taille, forme et variété cristalline différentes, et en comparant leurs effets à ceux d'une particule de TiO_2 micrométrique ainsi que d'un autre type de NP, le noir de carbone (NC).

Matériels et méthodes

L'étude est réalisée avec sept particules du commerce : 5 NP de TiO_2 (appelées A10, A15, A/R, Rrond et Rbâton) choisies du fait de leurs différences en termes de diamètre (10 à 75 nm), de forme (rond ou bâton), et de variété cristalline (anatase, rutile, mélange anatase/rutile), une particule de TiO_2 de taille micrométrique (appelée Micro) et enfin une NP de NC (appelée FW2). Ces particules ont été caractérisées en termes de composition chimique, forme, surface spécifique, état d'agrégation et contenu en endotoxine.

Le modèle cellulaire utilisé est la lignée de fibroblastes pulmonaires fœtaux humains MRC-5. Les cellules ont été exposées aux particules pendant 6, 24 ou 48 heures, à des concentrations de particules de 10 et 100 µg/cm². La viabilité cellulaire a été étudiée, ainsi que l'expression en ARNm de différents marqueurs: procollagène-1, α-actine, MMP-1, MMP-2 et TIMP-1.

L'expression de la MMP-1 a également été observée au niveau protéique ; de plus, son activité a été mesurée. Nous avons utilisé des fibroblastes pulmonaires primaires humains en culture afin de confirmer les résultats obtenus sur les cellules de la lignée MRC-5, et avons mesuré leur expression en ARNm de la MMP-1 et de l'α-actine après exposition aux particules à la dose de 10 µg/cm² pendant 48 heures. L'implication de différents facteurs connus comme capables d'influer sur l'expression de la MMP-1 a été évaluée sur les cellules MRC-5 : le stress oxydant, Emmprin et l'IL-1β comme activateurs potentiels de l'expression de la MMP-1, et le TGF-β comme inhibiteur potentiel de l'expression de la MMP-1. L'influence du stress oxydant a été évaluée de plusieurs façons : par l'évaluation de la production de ROS avec l'ADN superenroulé du plasmide phiX174RF1 et la sonde DCFH-DA, par l'évaluation de l'expression en ARNm d'enzymes impliquées dans le stress oxydant (HO-1 et les Nox), ainsi que par l'utilisation de la NAC, un antioxydant. L'implication du

TGF-β a été évaluée en quantifiant la phosphorylation de Smad 2 et Smad 3 ainsi que l'expression de Smad 7 après exposition aux particules, ces trois Smad étant impliquées dans la voie de signalisation du TGF-β. L'expression protéique d'Emmprin a été mesurée. L'expression de l'IL-1β a été mesurée, à la fois en termes d'ARNm et de protéine. Un inhibiteur de la signalisation de l'IL-1β, l'IL-1 Ra a été utilisé avant exposition aux particules. Enfin, l'expression de IκB-α, une protéine inhibitrice impliquée dans la voie de signalisation de l'IL-1β, a été quantifiée.

Résultats

La forme, la surface spécifique et la composition chimique des particules ont été confirmées par rapport aux données des fournisseurs. Les particules en suspension forment des agrégats de diamètre similaire, autour de 1 µm. De plus, il n'a pas été détecté d'endotoxine sur les particules.

Les particules de TiO_2, à la fois de taille micrométrique et nanométrique, sont non cytotoxiques, contrairement aux NP de NC. L'exposition aux NP de TiO_2 entraîne une induction de l'expression de la MMP-1 (en termes d'ARNm et de protéine) plus importante que celle provoquée par le TiO_2 micrométrique, et le NC n'a pas modifié l'expression de la MMP-1. L'activité de la MMP-1 a été augmentée suite à l'exposition des cellules aux particules de TiO_2 micrométrique, ainsi qu'aux NP d'A/R et de Rrond, l'augmentation de l'activité après exposition aux deux NP de TiO_2 étant plus importante que celle observée après exposition des cellules aux particules de TiO_2 micrométriques. Les NP de TiO_2 ont diminué l'expression du procollagène-1 et de l'α-actine, contrairement aux particules de TiO_2 micrométrique et aux NP de NC. Aucune particule n'a modifié l'expression de la MMP-2 ou de TIMP-1. Les résultats obtenus concernant l'expression en ARNm de l'α-actine et de la MMP-1 sur la lignée MRC-5 ont été confirmés sur les fibroblastes pulmonaires humains en culture primaire.

Les différentes expériences visant à évaluer l'implication du stress oxydant dans l'induction de la MMP-1 observée après exposition des cellules MRC-5aux particules et NP de TiO_2, n'ont pas montré d'implication du stress oxydant : toutes les particules ont produit la même quantité de ROS, mesurée par le désenroulement de l'ADN superenroulé du plasmide phiX174RF1. En revanche, l'exposition aux particules n'a pas induit de production de ROS dans les cellules, comme l'indiquent les résultats obtenus avec la sonde DCFH-DA. De plus, l'exposition aux particules n'a pas modulé l'expression des systèmes pro ou antioxydants étudiés. Enfin, l'induction de l'expression de la MMP-1 après exposition aux particules de

TiO_2 n'est pas modifiée par le traitement à la NAC. La voie du TGF-β n'a pas été inhibée par l'exposition des cellules aux particules, ce qui signifie que le TGF-β ne semble pas, dans cette étude, impliqué dans l'induction de l'expression de la MMP-1. L'expression d'Emmprin n'est pas modifiée après exposition des cellules aux particules. L'expression d'IL-1β (en ARNm et en protéine) est augmentée après exposition aux NP de TiO_2, et ce dès un temps plus précoce (24 heures) que celui auquel on observait l'induction de la MMP-1 (48 heures). Le prétraitement avec l'IL-1 Ra avant l'exposition aux particules a conduit à une diminution de l'expression de la MMP-1 pour les NP de A/R et de Rbâton. De plus, une baisse de l'expression de IκB-α a été observée après exposition des cellules aux NP de NC, d'A15 et de Rbâton.

Conclusion

Cette étude a permis d'observer que l'exposition de la lignée fibroblastique MRC-5 aux NP de TiO_2 avait pour conséquence une augmentation de la MMP-1 dépendante de l'IL-1β pour l'A/R et le Rbâton, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la MMP-1 après exposition à l'A/R et au Rrond. Ces résultats étaient associés à une diminution de l'expression du procollagène-1 et de l'α-actine. On observe un effet de la taille des particules, puisque les particules de TiO_2 micrométrique n'induisaient pas la MMP-1 autant que les NP de TiO_2. De plus, cette induction ne semblait pas faire intervenir l'IL-1β. On observe un effet de la composition chimique, puisque les NP de NC n'ont pas induit la MMP-1.

Un récapitulatif des principaux résultats est présenté dans le Tableau 3.1.

	NP de TiO_2	TiO_2 micrométrique	NP de NC
Cytotoxicité	Non	Non	Oui
Expression de l'α-actine/du procollagène-1 α1	-	-	=
Expression de la MMP-1	++	+	=
Activité de la MMP-1	+	=	=
Induction du stress oxydant	Non	Non	Non
Influence du TGF-β sur l'induction de la MMP-1	Non	Non	Non
Influence d'Emmprin sur l'induction de la MMP-1	Non	Non	Non
Influence de l'IL-1β sur l'induction de la MMP-1	Oui	Non	Non

Tableau 3.1 : résumé des résultats observés lors de l'étude sur l'effet de l'exposition des cellules MRC-5 à des NP de TiO_2 en termes d'expression de la MMP-1.

- : diminution, = : pas de modification, + : augmentation modérée, ++ : forte augmentation

Titanium dioxide nanoparticles induce matrix metalloprotease-1 expression and activity in human pulmonary fibroblasts, via an interleukin-1β-dependent mechanism.

Lucie Armand [1, 2], Esther Belade [1, 2], Angélique Simon-Deckers [1, 2], Corinne Duprez [3], François Berrehar [3], Catherine Poillet [3], Chantal Tharabat [1], Sabine Le Gouvello [1,2,3], Jean-Claude Pairon [1, 2, 4], Jorge Boczkowski [1, 2, 4,5], Sophie Lanone [1, 2, 4]

[1] Inserm U955, Equipe 4, Créteil, 94000, France

[2] Université Paris Est, Faculté de médecine, Créteil, 94000, France

[3] AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Service d'Immunologie Biologique, 94010 Créteil, France

[4] Centre Hospitalier Intercommunal, Service de pneumologie et pathologie professionnelle, Créteil, 94000, France

[5] AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Service de Physiologie Explorations Fonctionnelles, 94010 Créteil, France

Corresponding authors:

Jorge Boczkowski, MD, PhD

Unité Inserm 955, Equipe 4

Faculté de Médecine de Créteil

8 rue du Général Sarrail

94000 Créteil

Phone: +331 49813658

Fax: +331 49813725

Email: jorge.boczkowski@inserm.fr

Sophie Lanone, PhD.

Unité Inserm 955, Equipe 4

Faculté de Médecine de Créteil

8, rue du Général Sarrail

94000 Créteil

Phone: +331 49 813725

Fax: +331 49813725

Email: sophie.lanone@inserm.fr

Lucie Armand: lucie.armand.inapg@gmail.com;

Esther Belade: esther.belade@inserm.fr;

Angélique Simon-Deckers: angelique.simon@gmail.com;
Corinne Duprez: pafl.immuno@hmn.aphp.fr
François Berrehar: transplant.immuno@hmn.aphp.fr
Catherine Poillet: pafl.immuno@hmn.aphp.fr
Chantal Tarabhat: tarabhat@hotmail.com
Sabine Le Gouvello: sabine.le-gouvello@hmn.aphp.fr
Jean-Claude Pairon: JC.Pairon@chicreteil.fr;
Jorge Boczkowski: jorge.boczkowski@inserm.fr;
Sophie Lanone: sophie.lanone@inserm.fr.

SHORT RUNNING TITLE

titanium dioxide and matrix metalloprotease-1

KEYWORDS

Matrix metalloprotease-1, nanoparticles, titanium dioxide, carbon black, interleukin-1β.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Nathalie Herlin and Aurélie Habert from the Atomic Energy Commission (Laboratoire Francis Perrin) for their support in nanoparticle characterization.
This work was supported by the "ABIES" PhD program for a PhD grant for Lucie Armand, and the "Agence nationale de sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail" (ANSES) for a PhD grant and funding for Esther Belade.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

ABBREVIATIONS LIST

CB : carbon black ; Emmprin : extracellular MMP inducer ; IL-1β : interleukin-1β ; IL-1 Ra : IL-1 Receptor antagonist ; TiO_2 : titanium dioxide ; NAC : N-acetyl cystein ; NP : nanoparticle ; MMP : metalloprotease ; ROS : reactive oxygen species ; TIMP : tissue inhibitor of metalloprotease ; TGF-β : transforming growth factor-β

ABSTRACT

Background: exposure to titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles (NP) can be associated to matrix degradation-phenotype, but the underlying mechanisms are yet unknown. Matrix metalloprotease (MMP)-1 is an important actor of matrix homeostasis in the lung and could participate in TiO_2 NP effects.

Objectives: our aim was to evaluate the effects of TiO_2 NP on MMP-1 expression and activity in lung pulmonary fibroblasts, and assess the importance of physicochemical characteristics of particles.

Methods/Results: human pulmonary fibroblasts (MRC5 cell line and primary cells) were exposed to 5 TiO_2 NP (various sizes, crystal phases, shapes), 1 micrometric TiO_2, and 1 carbon black (CB) NP. Cells were exposed to 10 or 100 µg/cm² particles for 6h, 24h or 48h. CB was the only cytotoxic NP. All TiO_2 particles induced MMP-1 expression (mRNA and protein) and repressed procollagen-1 and α-actin expression. Micrometric TiO_2 had lesser effects on MMP-1. Only anatase/rutile mix and rutile round TiO_2 NP induced MMP-1 activity, as well as, to a lesser extent, micrometric TiO_2. Induction of MMP-1 could not be linked to transforming growth factor (TGF)-ß pathway, the induction of an oxidative stress or extracellular MMP inducer (EMMPRIN). Interleukin (IL)-1ß expression was induced by all TiO_2 particles, and MMP-1 induction was dependent of IL-1ß for anatase/rutile mix and rutile needle TiO_2 NP.

Conclusions: TiO_2 NP are potent inducers of MMP-1 expression, partly via an IL-1β-dependent mechanism, and are regulators of MMP-1 activity. Considering the role of MMP-1 in matrix remodeling, these results give a new understanding of TiO_2 lung remodeling effects.

INTRODUCTION

Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles (NP) are one of the most abundantly produced NP [63]. Because of their optical, photocatalytic as well as self-cleaning properties, TiO_2 NP are already used in a wide range of commercially available products such as paints, pigments, and cosmetics (see http://www.nanotechproject.org/ for inventory). Moreover, titanium and its alloy are common biomaterials that are widely used in orthopedic, dental, and cardiovascular implants and prostheses [2], and nanoscale surface modifications with TiO_2 have been developed in the recent years [2, 4, 197] Long-term studies of hip and knee replacements however showed that loosening of joint replacements and bone-loss surrounding the replacement increase over time [5], posing the issue of long-term biocompatibility and titanium particle wear. Such matrix degradation-phenotype has also been observed after administration of TiO_2 NP in mice lungs [6]. Indeed, as soon as 14 days after the initial administration, mice showed a disruption of alveolar septa, epithelial cell apoptosis, along with features of pulmonary emphysema: an increase in mean linear intercept, mean airspace area and septal chord length [6]. These matrix-degradative effects in the lung are very important since they can compromise lung function. However, the underlying mechanisms of these matrix degradation effects, particularly in the lungs, have not yet been described.

Matrix metalloproteases (MMP) and their inhibitors (TIMP) are important actors of matrix homeostasis in the lung. Notably, overexpression of interstitial collagenase MMP-1 in alveolar epithelial cells has been shown to be involved in the loss of alveolar integrity in pulmonary emphysema [198, 199]. Studies using diesel particulate matter demonstrated an up-regulation of MMP-1 expression and activity in human alveolar epithelial cells [200] as well as in human bronchial epithelia [9]. MMP-1 is a highly regulated protein [10]; its expression and activity are regulated at the transcriptional as well as the post-translational levels by transforming growth factor-β (TGF-β) [178], oxidants [201], Interleukin (IL)-1β [202], and extracellular matrix metalloprotease inducer (EMMPRIN) [163].

MMP-1 upregulation after exposure to TiO_2 NP could be a mechanism explaining, at least in part, the matrix-degradation effects of TiO_2 NP in lung tissue. We therefore set-up a study aimed to evaluate the effects of TiO_2 NP on MMP-1 expression and activity in lung pulmonary fibroblasts. The rationale of this was that 1/ pulmonary fibroblasts are key cells in lung matrix homeostasis [175, 203, 204], 2/ TiO_2 NP can reach pulmonary interstitium [147, 205 {MacNee, 2000 #2362, 206], and 3/ TiO_2 NP can induce an oxidative stress and the overexpression of IL-1β, two known inducers of MMP-1 [79, 84, 94 {Yazdi, 2010 #3972, 144]. Finally, because physico-chemical characteristics of NP such as chemical composition,

size, crystal phase or shape could be important determinants of NP's biological effects [207], we used 5 different TiO_2 NP and compared their effects to those of carbon black (CB) NP and a micron-size TiO_2 particle.

METHODS

Particle characterization

We selected 7 different particles: 5 TiO_2 NPs (named A10, A15, A/R, Rround, Rneedle), of different crystal phases, shapes and dimensions as well as a micrometric TiO_2 particle, to and a carbon black NP. NPs were characterized both as powders and in solution.

Particle shape was observed using transmission electron microscopy (TEM), and specific surface area was measured using Brunauer Emmett Teller (BET) adsorption isotherms of nitrogen using a Micromeritics Flowsorb 2300 (Norcross, USA).

Particles were suspended at 2 mg/mL in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing 4.5 g/L glucose. Suspensions were sonicated (Elmasonic S30H, Elma 50-60 Hz) for 10 minutes under cooling conditions. The particle solutions were immediately vortexed and diluted at various concentrations in culture medium.

Suspension agglomeration state was measured by Photon Correlation Spectroscopy (PCS). Zeta potential was also measured. Both parameters were determined using a Malvern Zetasizer 3000HS (Malvern, Worcestershire, UK) equipped with a MPT-1 pH titrator.

It has to be noted that the PCS measure for Rneedle has to be taken as an indication of the real aggregation state of the suspension, since the PCS technique is not accurate for non-spherical particles. However, this approximation can be coupled with the zeta potential result to determine if Rneedle NP are agglomerated.

NP endotoxin content was examined using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay (Lonza, Basel, Switzerland) according to the manufacturer’s instructions.

Cell culture and particle exposure

We used a lung foetal fibroblastic cell line: the MRC-5 cell line (CCL-171, ATCC, Manassas, VA). Cells were cultured in DMEM with 4.5 g/L glucose supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) and 1% penicillin/streptomycin (PAA). Cells were maintained in 5% CO_2 – 95% air atmosphere. They were seeded at 16000 cells/cm² and were used at subconfluence, 72h later. Cells were washed with serum-free DMEM before being exposed to 50 and 500 µg/mL particles (10 and 100 µg/cm², respectively) for 6h, 24h or 48h in serum-free DMEM.

In a subset of experiments, we used human primary lung fibroblasts, which were derived from lung samples of 3 patients undergoing lung surgery for removal of a primary lung tumor. All patients were never-smokers. Normal lung from a non-involved segment, removed from the

solidary lesion, was obtained, and lung fibroblasts were isolated and cultured according to Akamine and colleagues [193]. The cells were used at passage 5.

Optical microscopy

Cells were exposed for 48h to the particles at 2 µg/cm² and fixed in 4% paraformaldehyde. Cells were stained with Giemsa stain (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) and cell morphology was assessed by optical microscopy.

Transmission electronic microscopy (TEM)

Cells exposed for 48h to the particles at 10 µg/cm² were observed by TEM. Cells were adherent on their plastic surface and fixed *in situ* in 2% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmic acid and embedded in Epon (kit 45359-1EA-F, Sigma Aldrich). Ultra-fine (90-nm thick) slices were cut and observed under a Philips EM208 microscope at 80 kV.

Cell viability

Cells were grown in 96-well plates. Mitochondrial activity was measured using the WST-1 assay (Roche Diagnostics, Meylan, France). After the different exposure times, cells were washed and incubated for 2h in culture medium containing 10 µL of the WST-1 solution. The absorbance at 450 nm was determined using a microplate reader (Multiskan Ex, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA) and the viability was calculated as $OD_{\text{treated cells}}/OD_{\text{control cells}} \times 100\%$. Interference was measured by incubating 100 µg/cm² particles with the dye but without cells. No interference was observed (data not shown).

Cell number was assessed by quantifying DNA content using the fluorescent dye bisbenzimide H33258 (Sigma Aldrich). The dye was added to cells at the end of the exposure periods and fluorescence was measured at 460 nm (excitation: 360 nm) using a fluorimeter (TriStar LB 941, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Data were expressed as $OD_{\text{treated cells}}/OD_{\text{control cells}} \times 100\%$. Interference of particles with the dye was evaluated by the incubation of a known concentration of DNA in presence or absence of 100 µg/cm² particles. No interference was observed (data not shown).

Quantification of reactive oxygen species (ROS) production

The ability of the particles to cause free radical injury to the supercoiled plasmid phiX174 RF1 DNA (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) was assessed. The oxidative DNA damage was measured as depletion of supercoiled DNA after 400 µg/m² particles treatment.

PhiX174 RF1 DNA was incubated with the particles as previously described [191]. Briefly, particles were incubated with 290 ng plasmid for 8h at 37°C. A linearised positive control was prepared with the restriction endonuclease PstI (Life Technologies). The supercoiled, relaxed coil and linear forms of the DNA were separated on a 0.8% agarose gel. The amount of relaxed DNA was reported to the total amount of DNA and compared to the negative control (supercoiled plasmid without particles or PstI).

ROS generation inside cells was determined using the 2'–7' dichlorodihydrofluorescein diacetate dye (DCFH-DA, Sigma Aldrich). Cells were grown in 96-wells plates and incubated for 30 min with 80 µM of DCFH-DA. They were washed and treated with the particles at 10 µg/cm^2) for 1h, 6h, 24h or 48h. After exposure, ROS levels were determined at excitation wavelength 488 nm (emission: 520 nm) using a TriStar LB 941 fluorimeter.

Quantification of mRNA expression

Cells were grown in 6-wells plates. After particle exposure, cells were lysed and mRNA content was extracted with the Nucleospin RNA II^{TM} kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions. mRNA integrity was assessed by separating the 28S and 18S subunits on a 1.6% agarose gel. The reverse transcription and the Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) techniques were performed as described previously [20]. The sequences of primers used are indicated in Table 1. Gene expression was normalized to that of splicing factor 3A subunit 1 (SF3A1) as a housekeeping gene. For some experiments, cells were preteated for 1h with 5 mM of N-acetyl cystein (NAC, Sigma Aldrich) before exposure to particles. In another set of experiments, cells were pretreated with 50 ng/mL IL-1 Receptor antagonist (IL-1Ra, R&D Systems Europe, Abingdon, UK) for 2h before particle exposure.

Quantification of protein expression

Cells were seeded in 25-cm² flasks. Western blot analysis was performed after the different exposure periods using 25 µg of total intracellular proteins. The antibodies used are described in Table 2. Caspase-1 activation was measured as the ratio of the intensity of the band corresponding to the cleaved caspase-1 to that corresponding to the procaspase-1. NF-κB implication in IL-1β effects was evaluated by the measurement of IκB expression. In some experiments, cells were exposed to the particles at 10 µg/cm² for 48h before exposure to 10 ng/mL TGF-β (R&D Systems) for 10 or 30 min.

Cytokine production

Cells were grown in 6-wells plates. After particles exposure, cells intracellular content was recovered as described previously [74]. Concentrations of IL-1β were measured using a commercially enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems) according to the manufacturer's recommendations.

Quantification of MMP-1 activity

Cells were grown in 6-wells plates. After particles expsoure, cells supernatants were recovered and kept at -80 °C. MMP-1 activity was assessed using the Human Active MMP-1 Fluorescent Assay (R&D Systems).

Statistical Analysis

Data were expressed as means ± standard error of mean (s.e.m) and were analyzed with the GraphPad Prism 4.0 software (La Jolla, CA, USA). Comparisons between multiple groups were performed with Kruskall–Wallis' non-parametric analysis of variance test followed, when a difference was detected, by two-by-two comparisons with Mann–Whitney's U test. All comparisons were realized with correction for multiple comparisons. P-values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Particle characterization

The particles characteristics are presented in Table 3. All particles, except micrometric TiO_2, presented a surface area superior to 15 m^2/g, the highest value being obtained for FW2. For all suspensions, the zeta potential was lower than |20| mV, a commonly admitted limit above which the suspension is stable [189], indicating that the suspensions could be agglomerated. This was confirmed by the measurement of hydrodynamic diameter, with values obtained between 715 and 1073 nm, demonstrating the agglomeration of all particles. Endotoxin levels were below the detection limit for all particles (data not shown).

TEM observations confirmed the particles' shape (Figure 1).

Cell morphology and uptake of particles by cells

In order to assess the general morphology of cells as well as whether of not they internalized the different particles, we performed optical and TEM observations. Optical microscopy observation of cells exposed to 2 $\mu g/cm^2$ particles for 48h revealed no change in cell morphology of the exposed cells (Figure 2). All particles formed agglomerates that appeared colocalized within the cells.

TEM observations confirmed the absence of cellular morphological alterations (Figure 3), and showed the internalization of aggregated NP in the cytoplasm of exposed fibroblasts.

Cell viability

No diminution of cell viability was observed after exposure of fibroblasts to TiO_2 NP (Figure 4 and data not shown). Similar results were obtained after exposure to micrometric TiO_2. By contrast, exposure to FW2 resulted in a significant decrease of cell viability whatever the time point and concentration studied (Figure 4 and data not shown).

MMP-1 expression and activity

The effects of the different particles on MMP-1 expression (mRNA, protein) and activity were assessed by the mean of RT-qPCR, Western-Blot and fluorokine assay. Moreover, as collagen and actin are important element of matrix homeostasis, their mRNA expression levels were quantified by RT-qPCR.

TiO_2 NP induced a significant dose-dependent increase in MMP-1 mRNA expression 48h after the initial exposure (Figure 5A and 5B), but not at earlier time-points (data not shown).

Similar results were obtained with micrometric TiO_2, although MMP-1 mRNA induction was significantly lower compared to that observed for TiO_2 NP at the highest dose (100 µg/cm^2).

The intracellular protein content analysis revealed a modulation of pro-MMP-1 expression following the same pattern (Figure 5C, 5D and 5E). Rneedle TiO_2 NP had the most significant effect (Figure 5). No modification of pro-MMP-1 expression was observed after exposure of fibroblasts to FW2 NP, whatever the time or concentration used (Figure 5). The expression of MMP-2 and TIMP-1 was not modified by any particle exposure (data not shown). Measurement of MMP-1 activity in cell culture supernatants revealed that only A/R and, to a lesser extent, Rround TiO_2 NP significantly induced the activation of MMP-1 (Figure 5F). Micrometric TiO_2 also induced an increase in MMP-1 activity, although it was significantly less important than the effects of A/R or Rround NP. Neither the other TiO_2 NP nor CB NP modified MMP-1 activity.

Modulation of MMP-1 expression by TiO_2 particles was mirrored by a significant time- and dose-dependent decrease in procollagen-1 α1 and α-actin expression (Figure 6). These effects were already present 24h after the initial exposure (Figure 6A and 6C), and Rneedle TiO_2 NP had the most significant effect. No effect of FW2 was observed.

The relevance of data obtained on MRC-5 cells was confirmed on human primary lung fibroblasts. Indeed, similar results (expression of MMP-1 and α-actin) were obtained after exposure of primary lung fibroblasts to a subset of NP (Figure 7 and data not shown), in absence of any cytotoxicity (data not shown).

Underlying mechanism of MMP-1 induction

MMP-1 is a highly regulated MMP [10]. We next addressed the issue of which underlying mechanism could be involved in MMP-1 induction by TiO_2 NP, focusing on repressor (TGF-ß pathway), or activators (ROS, EMMPRIN and IL-1β) [163, 178, 201, 202].

1/ TGF-β pathway:

TGF-β is a repressor of MMP-1 constitutive transcription [201]. We hypothesized that TiO_2 NP could downregulate TGF-β expression and/or its downstream signaling pathway.

No decrease in TGF-β mRNA or protein expression was detected whatever time point and particle exposure (data not shown). Moreover, neither activation of two Smad effectors (Smad 2 and 3) nor expression of Smad repressor (Smad 7) in response to TGF-β was modified by particle exposure (data not shown), thus ruling out an implication of TGF-β pathway in MMP-1 induction by TiO_2 particles.

2/ ROS:

MMP-1 expression is known to be under the control of ROS production [208, 209]. We therefore investigated if TiO_2 NP induced ROS, and/or modulate the expression of pro- and anti-oxidants in fibroblasts. Finally, we used the antioxidant NAC to assess the role of oxidants in MMP-1 induction by TiO_2 NP.

All particles induced similar levels of free radical injury to the plasmid phi X174 RF1 DNA (data not shown). No intracellular production of ROS was observed, whatever the time point studied (data not shown).

No HO-1 protein induction was observable whatever the particle used (data not shown). NOX-1, -2, and -3 mRNA expression was below the detection limit. mRNA expression of NOX-4 and -5 was measurable, but not induced by incubation of lung fibroblasts with particles as compared to unexposed fibroblasts (data not shown). Finally, pretreatment of cells with the antioxidant NAC did not prevent the induction of MMP-1 expression by particles (data not shown), thus ruling out the participation of an oxidative stress in this phenomenon.

3/ EMMPRIN expression:

EMMPRIN has been described to induce MMP in general, and MMP-1 in particular [210, 211].

EMMPRIN expression was not modified by fibroblasts exposure to whatever particle as compared to unexposed cells (data not shown).

4/ IL-1 β pathway:

IL-1β is a central mediator of inflammation and can activate the production of MMP-1 by various types of cells [202]. Moreover, since IL-1β is part of the inflammasome pathway [212], we assessed whether downstream elements of infammasome pathway (caspase-1 and NF-κB) were implicated in MMP-1 induction.

IL-1β mRNA expression was significantly increased by all TiO_2 NP (100 µg/cm^2) after 48h of exposure (Figure 8). Neither micrometric TiO_2 nor FW2 induced such modification of IL-1β expression. Induction of IL-1β was confirmed at the protein level as soon as 24h after the initial exposure (Figure 9). A significant increase in IL-1β protein expression was also observed in response to micrometric TiO_2 particles (Figure 9).

A role for IL-1β in MMP-1 induction was observed for A/R and Rneedle TiO_2 NP, as the mRNA expression levels of MMP-1 was significantly decreased in presence of IL-1Ra as compared to NP only-treated cells (Figure 10).

No modification of caspase-1 expression was observed (data not shown). Finally, a decreased expression of Iκ-Bα, as a footprint of the activation of NF-κB pathway, was observed after exposure of fibroblasts to A15 and Rneedle TiO_2 NP, as well as FW2 NP (data not shown).

DISCUSSION

Taken together, our results show that MMP-1 is overexpressed and can be activated in human lung pulmonary fibroblasts (cell line and primary cells), in response to TiO_2 NP, and to a lesser extent, to TiO_2 microparticles. This regulation is TiO_2-specific (not observable with CB NP), accompanied by a diminution of procollagen-1 α1 and α-actin expression and is, at least in part, dependent of IL-1β pathway. Among the different TiO_2 NP, we did not identify a unique physico-chemical parameter (crystal phase, shape, surface area or aerodynamic diameter) as being a major determinant of these effects. These results give new insights in the understanding of TiO_2 NP biological effects.

The modulation of MMP's expression by TiO_2 NP has been poorly investigated so far, and to the best of our knowledge, no study did specifically investigate MMP-1. The same is true regarding the modulation of MMP expression by other NP, although one of the often-described consequences of pulmonary exposure to NP is the development of pulmonary lesions coherent with lung matrix remodeling [208]. Naveau and colleagues described that maghemite NP can induce MMP-1, -2, and -3 in human gingival fibroblasts, along with TIMP-1 but not TIMP-2 [213]. In our study, TIMP-1 expression was not modified by the different particles, and TIMP-2, -3, and -4 expression was below detection limits. We observed a significant decrease in α-actin and collagen mRNA expression in response to the different TiO_2 particles. Similar findings have been reported in the literature, with Au, CB and chitosan NP [214-217]. The underlying mechanisms are not yet understood but could be related to mechanical stress [218, 219]. Since MMP-1 activity was upregulated with some TiO_2 NP, the observed down-regulation of α-actin and collagen mRNA expression should be accompanied also by a down regulation of protein expression, finally leading to a profound remodeling response. Some evidence of matrix remodeling in response to TiO_2 has been given in a study by Churg and colleagues; they demonstrate connective tissue breakdown in rat lungs, as determined by the appearance of desmosin and hydroxyprolin in lavage fluid after particle instillation [220]. These results are in accordance with our data, since hydroxyprolin is the degradation product of collagen, the substrate of MMP-1 [10].

Because TGF-β is a major profibrotic cytokine, inducing collagen and α-actin expression [175] [221], and repressing MMP-1 constitutive transcription [164], we hypothesized that its signaling pathway could be down-regulated by TiO_2 NP. However, we were unable to

demonstrate any modulation of TGF-β signaling pathway by TiO_2 NP in our experimental settings. This is in line with data from Churg and colleagues [222] demonstrating that ultrafine TiO_2 particles are poor inducers of profibrogenic mediators such as PDGF-B, TGF-α and TGF-β.

In our study, NP were able, per se, to produce ROS, but this wasn't accompanied by any intracellular ROS production or modulation of pro- or anti-oxidant systems. The induction of an oxidative stress (characterized by an imbalance between oxidants and anti-oxidants, in favor of oxidants) is often proposed as a key mechanism of action for NP [223, 224], and TiO_2 NP in particular [79, 144]. However, an equivalent number of studies also shows that TiO_2 NP induce no or only very mild oxidative stress [143, 225-227]. Interestingly, the absence of intracellular ROS production is associated in some studies to an absence of alteration of cell viability, as observed in our study [226, 227]. However, as CB NP induced a significant decrease in cell viability, without any ROS production inside the cells, a direct relationship between cytotoxic and oxidative effects can be questioned. Only one study has been performed on lung pulmonary fibroblasts (Chinese hamster lung fibroblasts, V79 cell line) [228], using two different TiO_2 NP (30-50 nm diameter); pure anatase and vanadium-coated TiO_2 NP. In this study, the coated TiO_2 was much more potent to induce oxidative stress than the non-coated one. As the NP used in our study was devoid of any coating, and given the cell type specificity of response [229], this could explain the absence of intracellular ROS production in MRC-5 cell line.

EMMPRIN has been long considered as an inducer of MMP-1 expression [210] [230, 231], and could therefore have been responsible for TiO_2 effects in our study. However, our experiments show that the induction of MMP-1 observed in our samples was independent of any modulation in EMMPRIN expression. Such results are in line with those of Braundmeier et al. [232] who showed that the stimulation of MMP by cytokines occurred without any changes in EMMPRIN expression. Similar results were described by Xiang et al., showing that IL-1β up-regulated the levels of MMP-1 and -2, but did not alter the expression of EMMPRIN [233]. Interestingly, Braundmeier et al. [232] demonstrate that the inhibitory effects of TGB-β involve a reduction in EMMPRIN mRNA levels. Taken together, these results are coherent with ours and suggest that MMP-1 expression might be elevated by IL-1β and EMMPRIN via two different signal pathways.

Results obtained with IL-1Ra suggest that pro-MMP-1 induction by TiO_2 NP was at least partially mediated by IL-1β. A few studies have shown that IL-1β production can be activated after TiO_2 NP exposure [84, 94, 132]. These studies demonstrated that IL-1β induction by

TiO_2 was dependent on the activation of NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome. Although we were not able to measure any modification of caspase-1 activation, a constituent of NLRP3 and activator of IL-1β, the exact implication of NLRP3 in MMP-1 induction by TiO_2 NP deserves further investigation. In fibroblasts, MMP-1 expression can be regulated by CCL2 [208, 234]. As TiO_2 NP have been shown to induce CCL2 expression after intratracheal instillation in mice [235], this could be a possible mechanism to explore in our experimental settings. Expression of other cytokines, such as IL-6, IL-8, TNF-α or IL-1α, can be induced by TiO_2 NP [70, 81, 132, 236]. Among these cytokines, IL-6 and IL-8 are known to induce MMP-1 [10]. Further experiments would be needed to investigate the role of these cytokines in our model, together with the implication of NF-κB as a signaling pathway shared by these cytokines and IL-1β. Finally, pathogen-derived mediators have been demonstrated to up-regulate MMP-1 promoter activity, gene expression and secretion [208]. Since we did not measure any detectable levels of endotoxin in our particles, such mechanism of induction of MMP-1 expression seems however unlikely to occur in our study.

We observed a dissociation between MMP-1 expression (intracellular mRNA and pro-protein) and extracellular activity. Indeed, all TiO_2 NP induced an increase in MMP-1 expression but only A/R and Rround NP induced a significant increase in activity. This suggests that TiO_2 NP not only act at the transcriptional level, but also at the post-traductional level on MMP-1. As for other MMP, pro-MMP-1 can be cleaved by other proteases, such as MMP, trypsin, or cathepsin G [10]. In our study, MMP-2 expression was not modified by TiO_2 NP exposure. However, we can't rule out a role for the other proteases. The same is true for ROS, which are known to, not only activate MMP-1 transcription, but also participate in its activation [10]. As no intracellular ROS production, as well as no activation of pro- or anti-oxidant systems was observed, it seems unlikely that such ROS-mediated activation of pro-MMP-1 occurred in our experimental settings. Li et al provided evidence that, in primary human bronchial epithelial cells, the ERK/ß-arrestin signaling pathway is critical for diesel particles-evoked upregulation in MMP-1 protein and activity [9]. Such signaling pathway could be involved in our study, since TiO_2 NP have been shown to activate ERK/MAPK pathway in human neutrophils [237]. Finally, TiO_2 has been shown to induce urokinase-type plasminogen activator (uPA) activity in BAL fluid of mice exposed intratracheally [238]. As uPA activation results in the formation of plasmin, an activator of MMP-1 expression, this pathway could be activated in our experimental settings and should therefore deserve further studies. It is important to note that

studies on the regulation of human MMP-1 gene cannot readily be complemented by studies in mice or rats, as rodents do not have a valid ortholog of this gene [9, 239]. However, given the implication of MMP-1 in tissue remodeling and repair during development, in inflammation, and in the invasion, migration and metastasis of malignantly transformed cells, our findings suggest that exposure to TiO_2 NP could result in such pathological developments.

An important issue of our study is that we reasoned in terms of equal mass dose, although ideally, one would like to use equal number of particles, particularly when comparing size effects of micro- versus nano-particles. However, such approach would assume that particles all disaggregate into singlet, which does not seem to be the case in our study as assess by TEM observations as well as DLS measurements. In practice, the problem of aggregation makes it impossible to determine whose dose would produce "equal" (or even similar) numbers of the different particles. Moreover, because of the propensity of nanomaterials to aggregate, primary particle size considerations are difficult to address. Indeed, all NP used in this study, although different in primary particle size, lead to aggregates of similar size. However, micrometric TiO_2 induced similar effects than nanometric TiO_2, although at a lesser degree in terms of pro-MMP-1 induction and activity. Moreover, the underlying mechanism, and particularly the implication of IL-1β pathway in these effects, was different between nano- and micro- TiO_2. Therefore, the nanostructuration of NP aggregates could be an important determinant of their effects, as also suggested by others [240]. Other physico-chemical characteristics of NP are proposed to be critical determinants of their biological effects [114, 241], although no single one has been yet clearly identified [240]. In our study, it seems clear that chemical composition plays a major role (CB particles having completely different effects than TiO_2 particles, regardless of their size). Moreover, rutile NP seem to induce higher effects than anatase ones. Indeed, the two TiO_2 NP that induce MMP-1 activity are the A/R mix and the Rround NP. However, as Rneedle TiO_2 NP do not induce any increase in MMP-1 activity, the NP crystal phase may not be the only physico-chemical characteristic that is determining NP effects. This is an important point, since the question of which physico-chemical characteristics is important to consider still remains unanswered although a large amount studies has been dedicated to this issue. In our study, size, as already discussed, specific surface area and/or form can’t be identifiable as important determinants. Similar results have been described in the literature [242-245]. This is probably the result of a critical and yet unsolved issue in performing comparisons between various particles, which is to modify only one physico-chemical parameter at a time.

In conclusion, we demonstrated that TiO_2 NP are potent inducers of MMP-1 expression, partly via an IL-1β-dependent mechanism, as well as regulators of MMP-1 activity. Considering the role of MMP-1 in matrix remodeling, these results give a new understanding of TiO_2 lung remodeling effects.

REFERENCES

1. Baan RA. 2007. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. Inhal Toxicol 19 Suppl 1: 213-228.
2. Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, Zalzal SF, Yi JH, Sam J, et al. 2009. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. Nano Lett 9(2): 659-665.
3. Mendonca G, Mendonca DB, Simoes LG, Araujo AL, Leite ER, Duarte WR, et al. 2009. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. Biomaterials 30(25): 4053-4062.
4. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. 2010. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. Trends Biotechnol 28(4): 198-206.
5. St Pierre CA, Chan M, Iwakura Y, Ayers DC, Kurt-Jones EA, Finberg RW. 2010. Periprosthetic osteolysis: characterizing the innate immune response to titanium wear-particles. J Orthop Res 28(11): 1418-1424.
6. Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, et al. 2006. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. Faseb J 20(13): 2393-2395.
7. Dalal S, Imai K, Mercer B, Okada Y, Chada K, D'Armiento J. 2000. A role for collagenase (matrix metalloproteinase-1) in pulmonary emphysema. Chest 117: 227S-228S.
8. Mercer B, Kolesnikova N, Sonett J, D'Armiento J. 2004. Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. J Biol Chem 279: 17690-19696.
9. Amara N, Bachoual R, Desmard M, Golda S, Guichard C, Lanone S, et al. 2007. Diesel Exhaust Particles Induce Matrix Metalloprotease-1 in Human Lung Epithelial Cells Via a Nadp(H) Oxidase/Nox4 Redox-Dependent Mechanism. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293: L170-L181.
10. Li J, Ghio AJ, Cho SH, Brinckerhoff CE, Simon SA, Liedtke W. 2009. Diesel exhaust particles activate the matrix-metalloproteinase-1 gene in human bronchial epithelia in a beta-arrestin-dependent manner via activation of RAS. Environ Health Perspect 117(3): 400-409.

11. Pardo A, Selman M. 2005. MMP-1: the elder of the family. Int J Biochem Cell Biol 37(2): 283-288.
12. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. 2003. TGF-beta 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1. Am J Physiol Heart Circ Physiol 284(5): H1612-1617.
13. Brenneisen P, Brivaba K, Wlaschek M, Wenk J, Scharffetter-Kochanek K. 1997. Hydrogen peroxide (H_2O_2) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. Free Rad Biol Med 22: 515-524.
14. Raymond L, Eck S, Mollmark J, Hays E, Tomek I, Kantor S, et al. 2006. Interleukin-1 beta induction of matrix metalloproteinase-1 transcription in chondrocytes requires ERK-dependent activation of CCAAT enhancer-binding protein-beta. J Cell Physiol 207(3): 683-688.
15. Huet E, Gabison EE, Mourah S, Menashi S. 2008. Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling. Connect Tissue Res 49(3): 175-179.
16. Araya J, Nishimura SL. 2010. Fibrogenic reactions in lung disease. Annu Rev Pathol 5: 77-98.
17. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. 2009. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. Am J Pathol 175(1): 3-16.
18. Wilson MS, Wynn TA. 2009. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. Mucosal Immunol 2(2): 103-121.
19. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, et al. 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. J Toxicol Environ Health 65: 1531-1543.
20. Kreyling W. 2003. Deposition, retention, and clearance of ultrafine particles. BIA-Workshop, Ultrafine Aerosols at Workplaces.
21. Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, Vippola M, Jensen KA, Miettinen M, et al. 2010. Airway exposure to silica-coated TiO2 nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. Toxicol Sci 113(2): 422-433.
22. Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, et al. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. Toxicol Sci 92(1): 174-185.
23. Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, et al. 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium

dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. Toxicology 260(1-3): 142-149.

24. Winter M, Beer HD, Hornung V, Kramer U, Schins RP, Forster I. 2011. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO(2) nanoparticles in murine dendritic cells. Nanotoxicology 5(3): 326-340.
25. Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, et al. 2010. Titanium dioxide induces different levels of IL-1beta production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. Biochem Biophys Res Commun 392(2): 160-165.
26. Oberdörster G. 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. Journal of Internal Medicine 267(1): 89-105.
27. Akamine A, Raghu G, Narayanan AS. 1992. Human lung fibroblast subpopulations with different C1q binding and functional properties. Am J Respir Cell Mol Biol 6(4): 382-389.
28. Gilmour PS, Beswick PH, Brown DM, Donaldson K. 1995. Detection of surface free radical activity of respirable industrial fibres using supercoiled phi X174 RF1 plasmid DNA. Carcinogenesis 16(12): 2973-2979.
29. Val S, Hussain S, Boland S, Hamel R, Baeza-Squiban A, Marano F. 2009. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. Inhal Toxicol 21 Suppl 1: 115-122.
30. Mehnert W, Mader K. 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. Adv Drug Deliv Rev 47(2-3): 165-196.
31. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. 2007. Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted. Physiological Reviews 87(1): 69-98.
32. Lu Y, Wahl LM. 2005. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. J Immunol 175(8): 5423-5429.
33. Gabison EE, Huet E, Baudouin C, Menashi S. 2009. Direct epithelial-stromal interaction in corneal wound healing: Role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond. Progress in Retinal and Eye Research 28(1): 19-33.

34. Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. 2002. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. Int J Cancer 99(4): 520-528.
35. Guarda G, So A. 2010. Regulation of inflammasome activity. Immunology 130(3): 329-336.
36. Naveau A, Smirnov P, Ménager C, Gazeau F, Clément O, Lafont A, et al. 2006. Phenotypic Study of Human Gingival Fibroblasts Labeled With Superparamagnetic Anionic Nanoparticles. Journal of Periodontology 77(2): 238-247.
37. Kim H, Liu X, Kobayashi T, Kohyama T, Wen FQ, Romberger DJ, et al. 2003. Ultrafine carbon black particles inhibit human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction. Am J Respir Cell Mol Biol 28(1): 111-121.
38. Sisco PN, Wilson CG, Mironova E, Baxter SC, Murphy CJ, Goldsmith EC. 2008. The effect of gold nanorods on cell-mediated collagen remodeling. Nano Lett 8(10): 3409-3412.
39. Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V, Rafailovich MH. 2010. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology 4(1): 120-137.
40. Pulavendran S, Rose C, Mandal AB. 2011. Hepatocyte growth factor incorporated chitosan nanoparticles augment the differentiation of stem cell into hepatocytes for the recovery of liver cirrhosis in mice. J Nanobiotechnology 9: 15.
41. Chiquet M, Renedo AS, Huber F, Fluck M. 2003. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? Matrix Biol 22(1): 73-80.
42. Cherchi C, Chernenko T, Diem M, Gu AZ. 2011. Impact of nano titanium dioxide exposure on cellular structure of Anabaena variabilis and evidence of internalization. Environ Toxicol Chem 30(4): 861-869.
43. Churg A, Zay K, Li K. 1997. Mechanisms of mineral dust-induced emphysema. Environ Health Perspect 105 Suppl 5: 1215-1218.
44. Verrecchia F, Mauviel A. 2007. Transforming growth factor-beta and fibrosis. World J Gastroenterol 13(22): 3056-3062.
45. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. 2000. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. Biochim Biophys Acta 1490(3): 259-268.

46. Churg A, Gilks B, Dai J. 1999. Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants. Am J Physiol 277(5 Pt 1): L975-982.
47. Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, Muller J, Fonseca A, Nagy JB, et al. 2006. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? Free Radic Biol Med 40(7): 1227-1233.
48. Garza KM, Soto KF, Murr LE. 2008. Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. Int J Nanomedicine 3(1): 83-94.
49. Horie M, Nishio K, Fujita K, Kato H, Endoh S, Suzuki M, et al. 2010. Cellular responses by stable and uniform ultrafine titanium dioxide particles in culture-medium dispersions when secondary particle size was 100 nm or less. Toxicol In Vitro 24(6): 1629-1638.
50. Fujita K, Horie M, Kato H, Endoh S, Suzuki M, Nakamura A, et al. 2009. Effects of ultrafine TiO2 particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: Involvement of extracellular matrix and cell adhesion. Toxicology Letters 191(2-3): 109-117.
51. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. 2006. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. Nano Lett 6(8): 1794-1807.
52. Wan R, Mo Y, Zhang X, Chien S, Tollerud DJ, Zhang Q. 2008. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by metal nanoparticles in human monocytes: The role of oxidative stress and protein tyrosine kinase activation. Toxicol Appl Pharmacol 233(2): 276-285.
53. Bhattacharya K, Cramer H, Albrecht C, Schins R, Rahman Q, Zimmermann U, et al. 2008. Vanadium pentoxide-coated ultrafine titanium dioxide particles induce cellular damage and micronucleus formation in V79 cells. J Toxicol Environ Health A 71(13-14): 976-980.
54. Muller L, Riediker M, Wick P, Mohr M, Gehr P, Rothen-Rutishauser B. 2010. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. J R Soc Interface 7 Suppl 1: S27-40.
55. Yurchenko V, Constant S, Bukrinsky M. 2006. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. Immunology 117(3): 301-309.

56. Bao W, Min D, Twigg SM, Shackel NA, Warner FJ, Yue DK, et al. 2010. Monocyte CD147 is induced by advanced glycation end products and high glucose concentration: possible role in diabetic complications. American Journal of Physiology - Cell Physiology 299(5): C1212-C1219.
57. Braundmeier AG, Nowak RA. 2006. Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer. Am J Reprod Immunol 56(3): 201-214.
58. Xiang J, Li C, Dong W, Cao Z, Liu L. 2009. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and extracellular metalloproteinase inducer in human periodontal ligament cells stimulated with interleukin-1 beta. J Periodontal Res 44(6): 784-793.
59. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. 2010. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. Proc Natl Acad Sci U S A 107(45): 19449-19454.
60. Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. 2000. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. J Immunol 164(12): 6174-6179.
61. Park EJ, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. 2009. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. Toxicology 260(1-3): 37-46.
62. Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Hohr D, et al. 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. Toxicol Appl Pharmacol 222(2): 141-151.
63. Cui Y, Gong X, Duan Y, Li N, Hu R, Liu H, et al. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. J Hazard Mater 183(1-3): 874-880.
64. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Toxicol Lett 180(3): 222-229.

65. Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. 2010. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO2) nanoparticles. Toxicol In Vitro 24(3): 1002-1008.
66. Lardot CG, Huaux FA, Broeckaert FR, Declerck PJ, Delos M, Fubini B, et al. 1998. Role of urokinase in the fibrogenic response of the lung to mineral particles. Am J Respir Crit Care Med 157(2): 617-628.
67. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. Nat Rev Mol Cell Biol 3(3): 207-214.
68. Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO(2)particulates: the contribution of physicochemical characteristics. Part Fibre Toxicol 6: 33.
69. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science 311(5761): 622-627.
70. Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, et al. 2007. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. Biomaterials 28(19): 2946-2958.
71. Soto K, Garza KM, Murr LE. 2007. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. Acta Biomater 3: 351-358.
72. Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL. 2006. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. Toxicol Sci 91(1): 227-236.
73. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Maréchal E, Boczkowski J, et al. 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. Particle and fibre toxicology 6(14): 14.
74. Tabet L, Bussy C, Setyan A, Simon-Deckers A, Rossi MJ, Boczkowski J, et al. 2011. Coating carbon nanotubes with a polystyrene-based polymer protects against pulmonary toxicity. Part Fibre Toxicol 8(1): 3.

Table 1: primers used for real-time quantitative PCR

Name	Genbank Accession Number	Sequences (5'-> 3')	Product Size (bp)
SF3A1	NM_005877 NM_001005409	Forward : GCAGGATAAGACGGAATGGAAACTGA Reverse : TAGTAAGCCAGTGAGTTGGAATCTTTG	179
MMP-1	NM_002421	Forward : ACTGCCAAATGGGCTTGAAG Reverse : GTCCCTGAACAGCCCAGTACTT	92
α-actin	NM_001613 NM_001141945	Forward : CCTGTGAAGCAGCTCCAGCTA Reverse : TTTTGTCCCATTCCCACCAT	175
Procollagen-1 α1	NM_000088	Forward : CCAGAAGAACTGGTACATCAGCAA Reverse : CGCCATACTCGAACTGGAATC	95
MMP-2	NM_004530 NM_001127891	Forward : GCGGCGGTCACAGCTACTT Reverse : AGTCGGATTTGATGCTTCCAA	96
TIMP-1	NM_003254	Forward : AGACCTACACTGTTGGCTGTGAG Reverse : GACTGGAAGCCCTTTTCAGAG	130
HO-1	NM_002133	Forward : TTCTTCACCTTCCCCAACATTG Reverse : CAGCTCCTGCAACTCCTCAAA	164
NOX-1	NM_013955 NM_007052	Forward : GGCTCCAAACCACCTCTTGA Reverse : ACATTCAGCCCTAACCAAACAAC	90
NOX-2	NM_000397	Forward : CCAGTGAAGATGTGTTCAGCTATGA Reverse : AACCACTCAAAGGCATGTGTGT	169
NOX-3	NM_015718	Forward :CCCTGGAAACACGGATGAGT Reverse : GTCCACAGAAGAACACGCCAAT	237
NOX-4	NM_016931 NM_001143836 NM_001143837	Forward :CCATCTAGTCAAGACTCCGAAATTC Reverse : GATTCCTCAAATGGACTTCCAAA	98
NOX-5	NM_024505	Forward : CGGCCCCCTTTTTTTCACTA Reverse : GCCTTGGGACCGAATGTG	144
TGF-β	NM_000660	Forward : GGCCTTTCCTGCTTCTCATG Reverse : GGTCCTTGCGGAAGTCAATG	153
IL-1β	NM_000576	Forward : GACTCACAGCAAAAAAGCTTGGT Reverse : TCAACACGCAGGACAGGTACA	187

SF3A1: splicing factor 3A subunit 1

MMP-1: matrix metalloprotease-1

MMP-2: matrix metalloprotease-2

TIMP-1: tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1

HO-1: heme oxygenase-1

NOX-1: NADPH oxidase-1

NOX-2: NADPH oxidase -2

NOX-3: NADPH oxidase -3

NOX-4: NADPH oxidase -4

NOX-5: NADPH oxidase -5

TGF-β: transforming growth factor-β

IL-1β: interleukin-1β

Table 2: antibodies used for Western Blot

Protein	Final concentration	Supplier	Supplier reference
MMP-1	0.5 µg/mL	R&D	MAB901
HO-1	1 µg/mL	Enzo life sciences	HC3001
Smad 2	1 µg/mL	Cell Signaling	3103
Smad 2P	1 µg/mL	Cell Signaling	3108
Smad 3	1 µg/mL	Cell Signaling	9513
Smad 3P	1 µg/mL	Cell Signaling	9520
Smad 7	1 µg/mL	R&D Systems	MAB2029
Emmprin	0.5 µg/mL	BD Pharmingen	555961
Caspase-1	1 µg/mL	Cell Signaling	2225
IκB-α	1 µg/mL	Cell Signaling	9247
β-actin	1 µg/mL	Sigma-Aldrich	A5316

Table 3: physicochemical characteristics of NPs

	Composition	Supplier	Crystal phase	Shape	Dimensions (nm)	Surface area (m^2/g)	Zeta potential (mV)	Hydrodynamic diameter (nm)
FW2	CB	Evonik		Spherical	13	373±18	-11.9	1033±88
Micro	TiO_2	Accros Organics	Anatase	Spherical	200	8±0.04	0.4	874±149
A10	TiO_2	Nanoamor	Anatase	Spherical	10	96±2.3	-2.1	1020±146
A15	TiO_2	Sigma Aldrich	Anatase	Spherical	15	140±5.8	-0.1	834±39
A/R	TiO_2	Sigma Aldrich	Anatase/ rutile	Spherical	25-75	27±1.5	0.2	715±104
Rround	TiO_2	Nanoamor	Anatase/ rutile	Spherical	30-40	17±0.1	-1.6	1073±50
Rneedle	TiO_2	Nanoamor	Rutile	Needle-like	10*40	153±1.4	-2.3	855±175

CB, carbon black; TiO_2, titanium dioxide

FIGURE LEGENDS

Figure 1: representative transmission electronic microscopy (TEM) images of the different particles.

Scale bar corresponds to 50 nm.

Figure 2: representative optical microscopy images of MRC-5 cells exposed to 2 µm/cm² of different particles.

Scale bar corresponds to 20 µm.

Figure 3: representative transmission electronic microscopy (TEM) images of MRC-5 cells exposed to 2 µm/cm² of different particles.

Scale bar corresponds to 10 µm.

Figure 4: cell viability assessed by the WST-1 assay in MRC-5 cells.

¤: $p < 0.05$ vs Control. n = 4. Bar graphs represent means ± s.e.m.

Figure 5: MMP-1 expression after particles exposure in MRC-5 cells.

mRNA expression after (A) 24h and (B) 48h exposure assessed by RT-qPCR. C: representative Western Blot of MMP-1 after 48h exposure. Quantification of protein expression after (D) 24h and (E) 48h exposure assessed by Western Blot. (F) MMP-1 activity measured by enzyme activity assay. *: $p < 0.05$ vs Control and FW2. #: $p<0.05$ vs Control, FW2 and Micro. n = 4. Bar graphs represent means ± s.e.m.

Figure 6: procollagen-1 α1 and α-actin mRNA expression after particles exposure in MRC-5 cells.

Procollagen-1 α1 expression after (A) 24h and (B) 48h exposure. α-actin expression after (C) 24h and (D) 48h exposure. ¤: $p < 0.05$ vs Control. *: $p < 0.05$ vs Control and FW2. #: $p<0.05$ vs Control, FW2 and Micro. n = 5. Bar graphs represent means ± s.e.m.

Figure 7: MMP-1 and α-actin mRNA expression in primary lung fibroblasts after particles exposure.

A: mRNA MMP-1 expression after 48h exposure. B: α-actin mRNA expression after 48h exposure. ¤: $p < 0.05$ vs Control. *: $p < 0.05$ vs Control and FW2. n = 3. Bar graphs represent means ± s.e.m.

Figure 8: IL-1β mRNA expression after particles exposure in MRC-5 cells.
IL-1β expression after (A) 24h and (B) 48h exposure to the different particles. *: $p < 0.05$ vs Control and FW2. #: $p<0.05$ vs Control, FW2 and Micro. n = 5. Bar graphs represent means ± s.e.m.

Figure 9: IL-1β protein expression in MRC-5 cells after 6h, 24h and 48h particles exposure.
*: $p < 0.05$ vs Control and FW2. n = 4. Bar graphs represent means ± s.e.m.

Figure 10: MMP-1 mRNA expression in presence of IL-1 Ra in MRC-5 cells. Values are expressed as the ratio of MMP-1 mRNA in presence of IL-1 Ra to that in absence of IL-1 Ra. §: $p < 0.05$ vs without IL-1 Ra condition. n = 4.

Figure 1

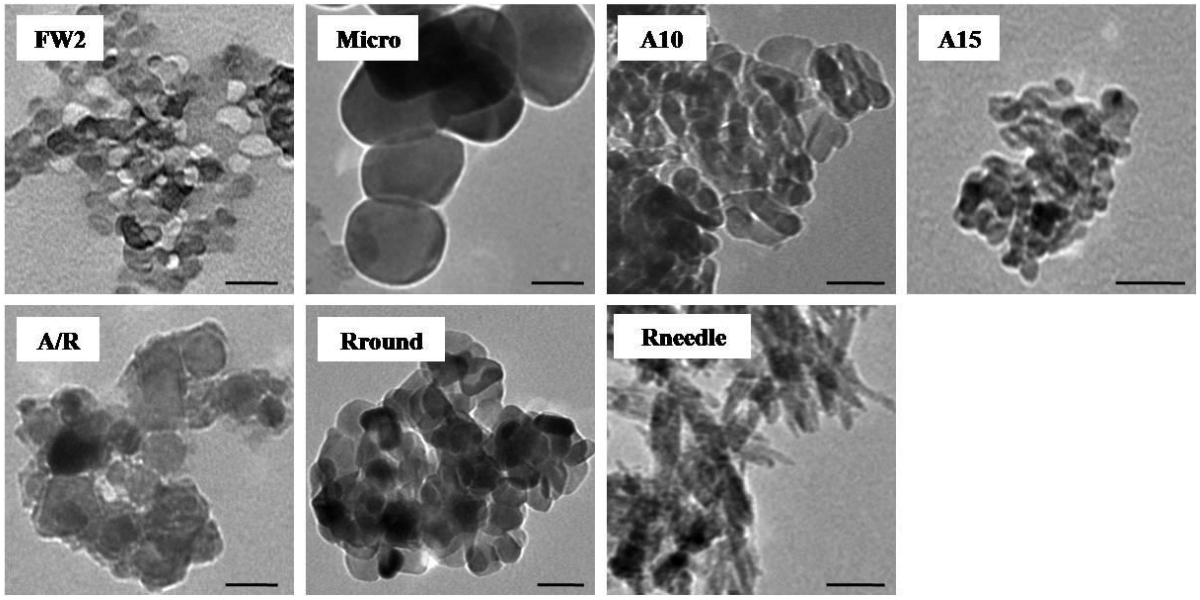


Figure 2

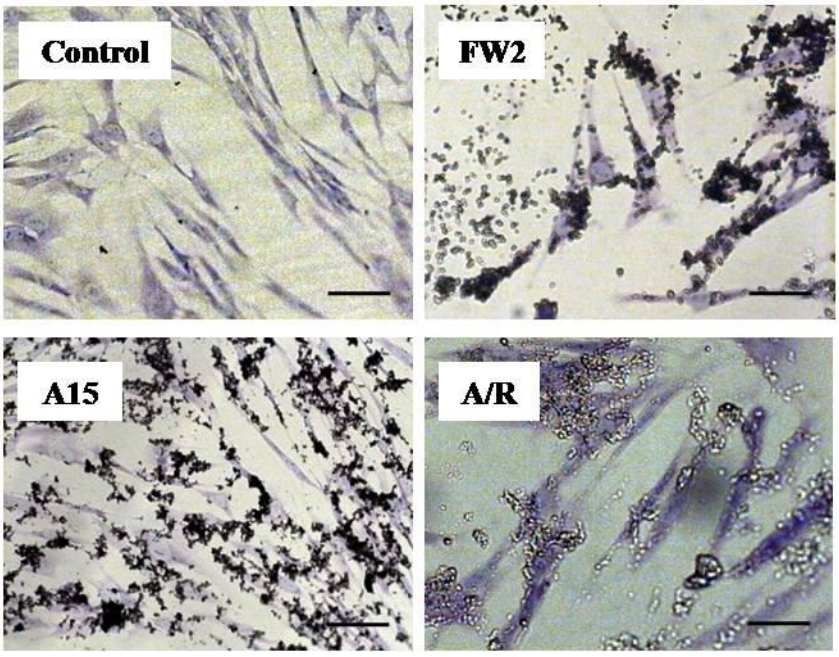


Figure 3

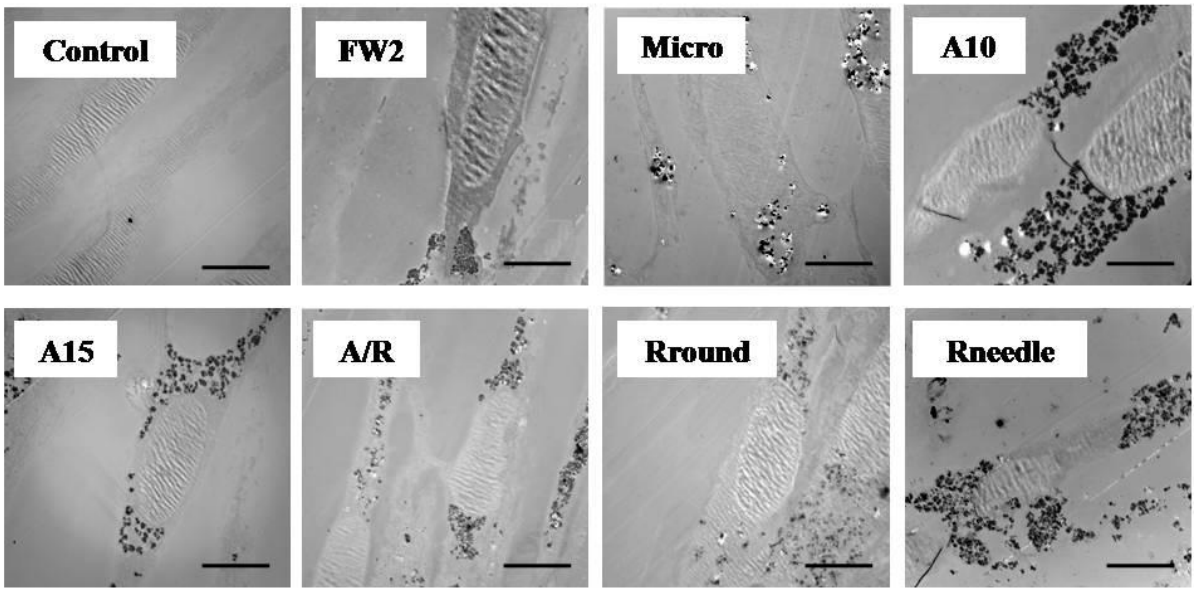


Figure 4

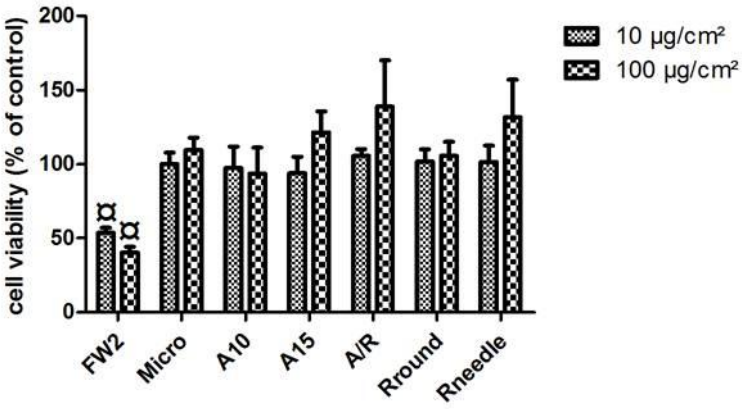


Figure 5

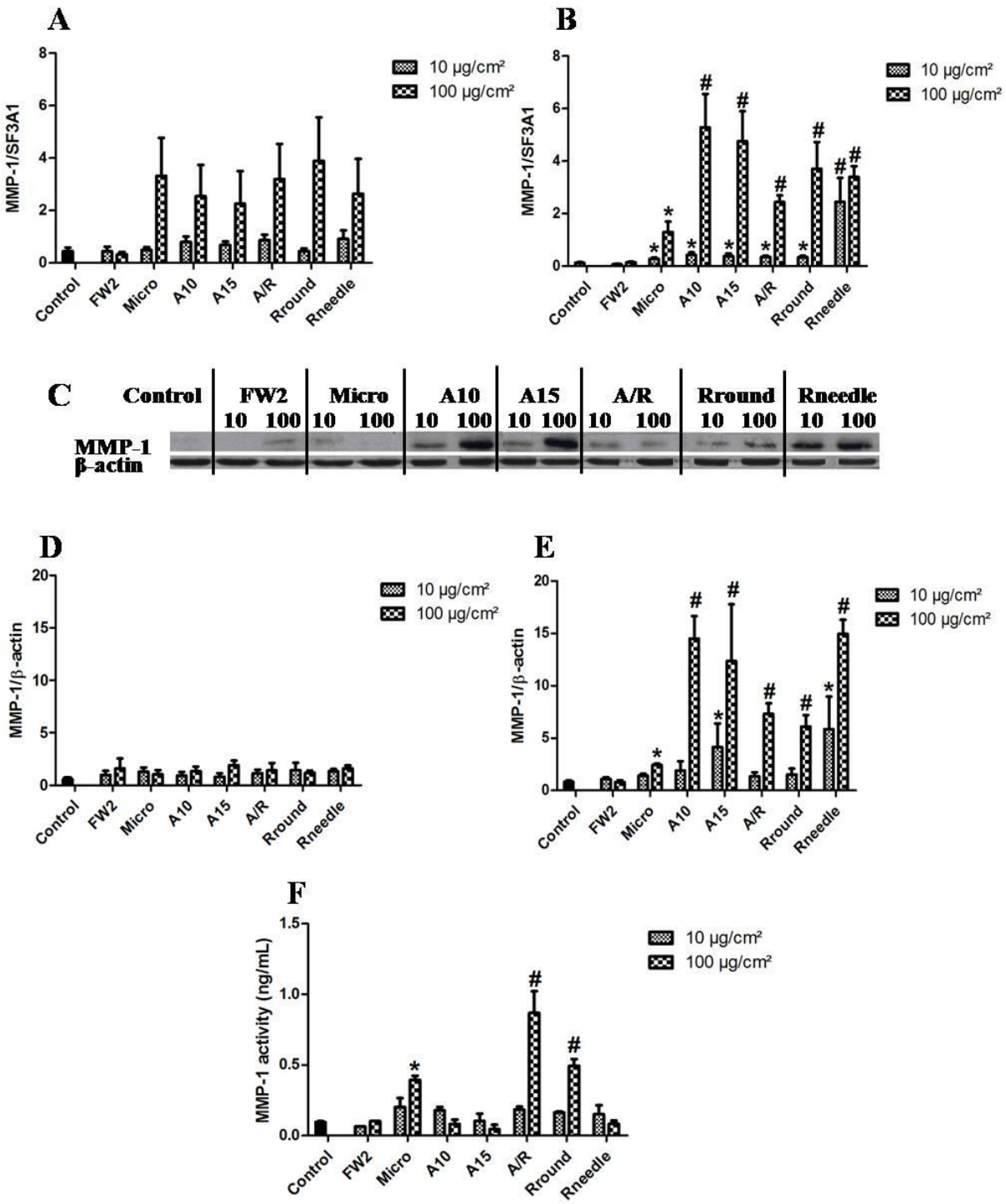

A
B
C
D
E
F
MMP-1/SF3A1
MMP-1/β-actin
MMP-1 activity (ng/mL)
10 µg/cm²
100 µg/cm²
Control
FW2
Micro
A10
A15
A/R
Rround
Rneedle
MMP-1
β-actin

Figure 6

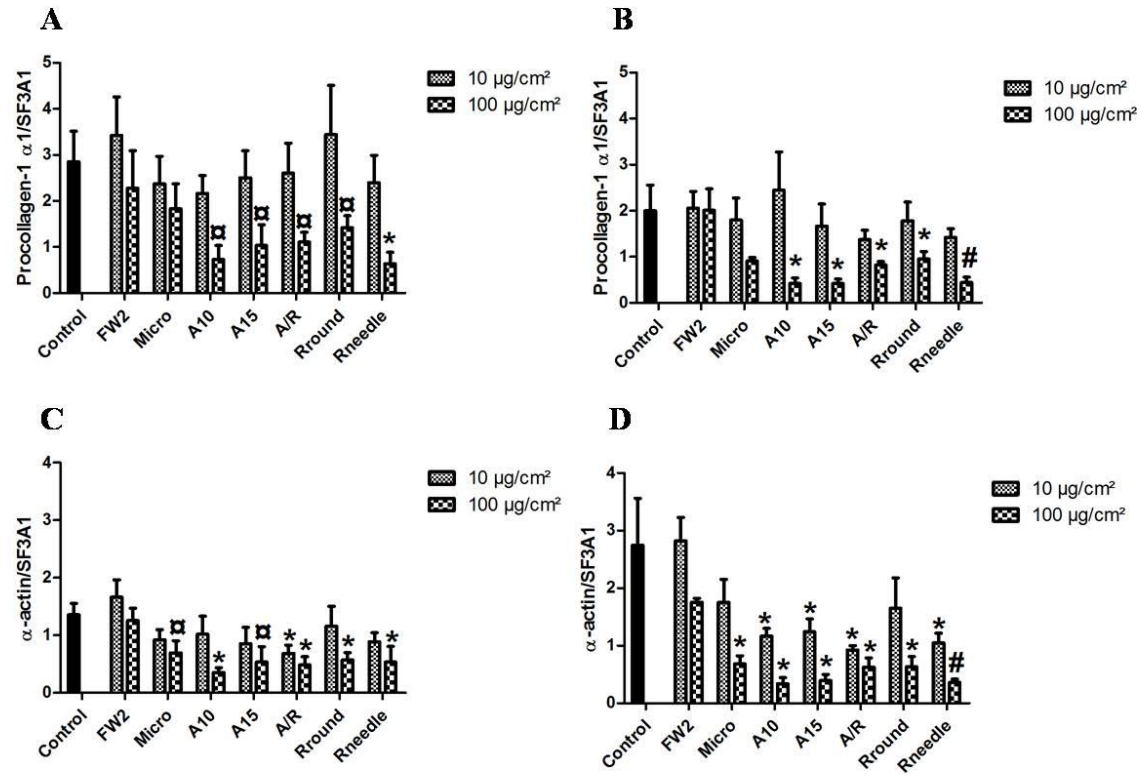

A
B
C
D
Procollagen-1 α1/SF3A1
α-actin/SF3A1
10 µg/cm²
100 µg/cm²
Control
FW2
Micro
A10
A15
A/R
Rround
Rneedle

Figure 7

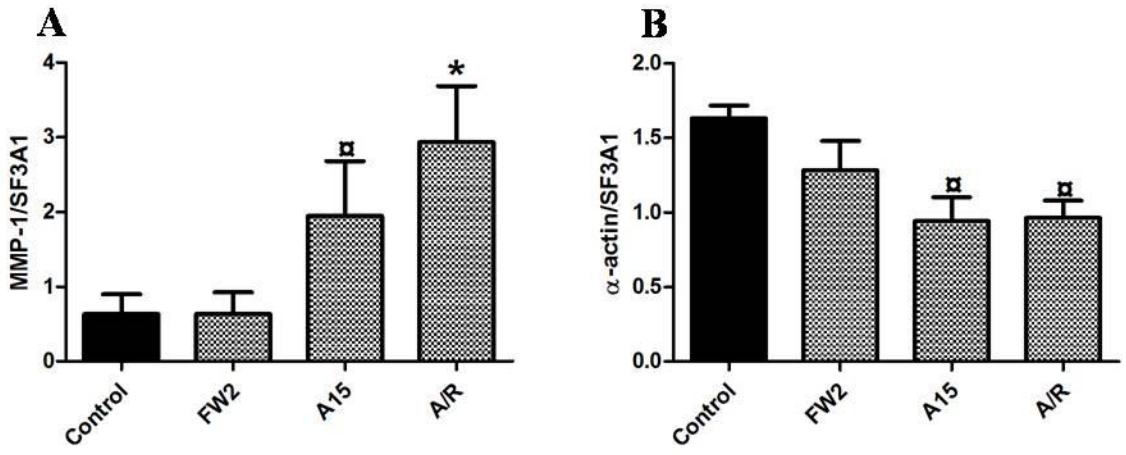


Figure 8

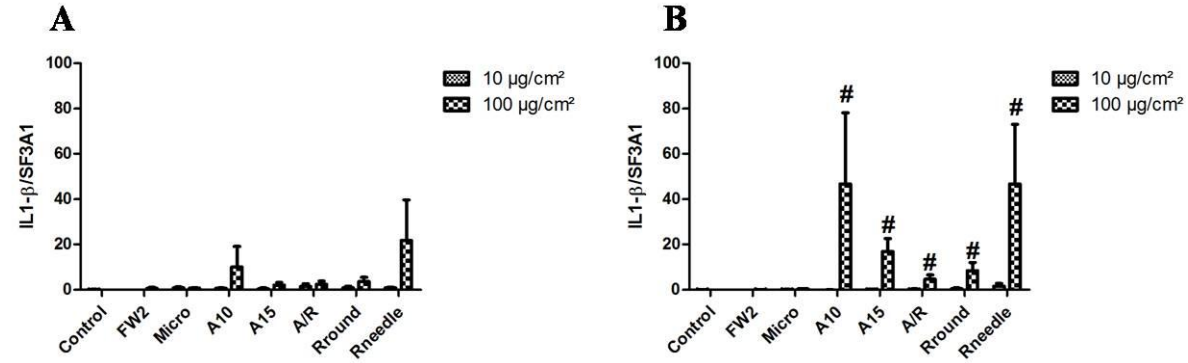


Figure 9

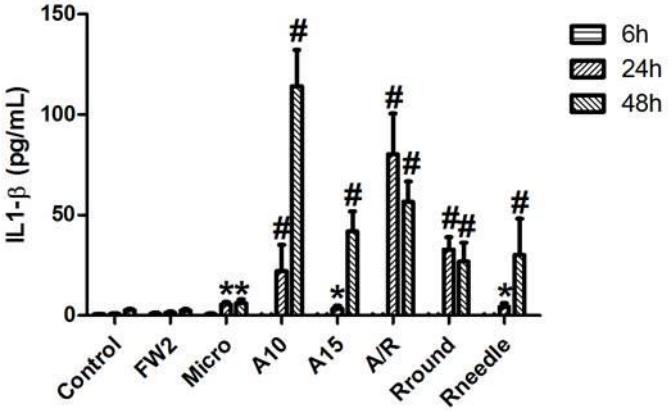
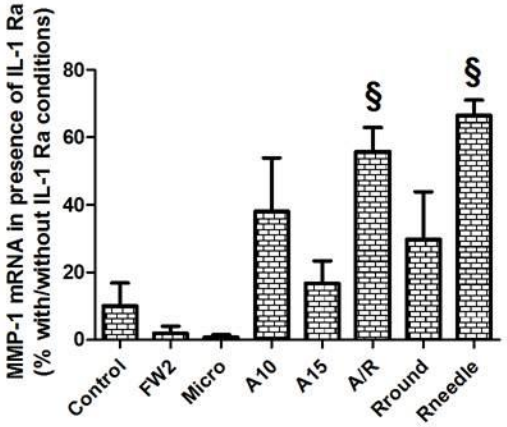


Figure 10



Deuxième étude

Effet de nanoparticules de dioxyde de titane et de noir de carbone sur un modèle d'emphysème induit par l'élastase chez le rat

Agnès Roulet*, Lucie Armand*, Maylis Dagouassat, Françoise Rogerieux, Angélique Simon-Deckers, Esther Belade, Jeanne Tran Van Nhieu, Sophie Lanone, Jean-Claude Pairon, Ghislaine Lacroix, Jorge Boczkowski

Soumis à Particles and Fibre Toxicology

* : égale contribution

Résumé de l'article

Introduction

Le but de cette étude est de répondre au deuxième objectif de cette thèse, à savoir mesurer l'influence de l'exposition aux NP deTiO_2 et de NC sur une pathologie préexistante liée au remodelage pulmonaire. Le modèle utilisé est un modèle d'emphysème provoqué par l'élastase chez le rat.

Matériels et méthodes

Nous avons utilisé deux NP : A15, une NP de TiO_2 de 15 nm de diamètre, et FW2, une NP de NC de 13 nm de diamètre. Nous avons évalué plusieurs de leurs caractéristiques physicochimiques : leur surface spécifique, leur état d'agrégation, ainsi que la présence éventuelle d'endotoxines.

Le jour 1 de l'expérience (J1), une instillation intratrachéale de 150 U d'élastase ou de sérum physiologique a été réalisée sur des rats Sprague Dawley mâles. Au jour 7, les animaux ont reçu une instillation intratrachéale de NP de TiO_2, de NP de NC ou d'ASB diluée à 0.5 mg/mL dans du sérum physiologique. Deux doses ont été utilisées : 100 et 500 µg par animal. Les animaux ont été sacrifiés au jour 8 (J8) ou au jour 21 (J21).Plusieurs paramètres ont été évalués. Dans un premier temps, la cellularité du LBA a été mesurée. Une analyse morphologique de l'inflammation (par 3 critères : œdème périvasculaire, alvéolite, infiltration périvasculaire/péribronchique) et une quantification de l'emphysème (mesurée par la longueur moyenne de corde des alvéoles) ont ensuite été réalisées. Afin d'essayer de déterminer un mécanisme expliquant les effets observés, l'expression en ARNm de plusieurs marqueurs a été mesurée dans le poumon : l'HO-1, un marqueur du stress oxydant, l'IL-1β, un marqueur de l'inflammation, la MIP-2, un chémoattractant pour les neutrophiles, le MCP-1, un chémoattractant des monocytes, la MMP-1 et la MMP-12. De plus, une analyse immunohistochimique a été réalisée sur des coupes de poumon des rats pour localiser et quantifier la présence de MMP-12 ainsi que CD68, un marqueur des macrophages.

Un récapitulatif du protocole mené est présenté dans la Figure 3.1.

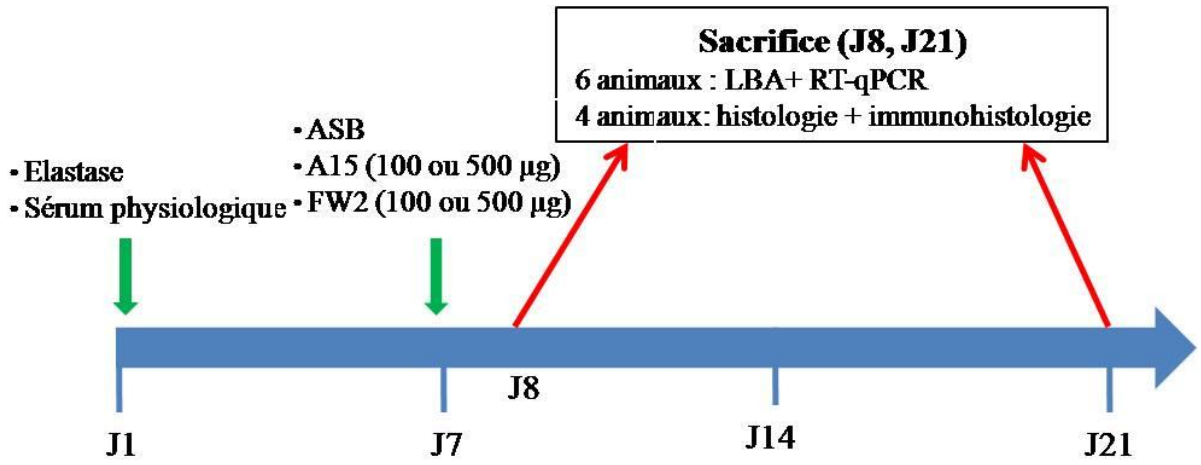


Figure3.1 : protocole expérimental de l'étude *in vivo* : exposition des animaux et prélèvements/analyses réalisés.
ASB : Albumine de Sérum Bovin, LBA : Lavage Bronchoalvéolaire, RT-qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative en Temps Réel.

Résultats

La caractérisation des NP a montré que les NP de NC avaient une surface spécifique plus élevée que les NP de TiO_2. Les deux NP présentent un potentiel zêta comparable et forment, en suspension, des agrégats/agglomérats de taille comparable. De plus, il n'a pas été détecté d'endotoxine sur les deux NP.

Les NP de TiO_2 seules n'ont pas entraîné de modification de la cellularité du LBA des animaux, de l'inflammation pulmonaire ou de l'expression des marqueurs étudiés. En revanche, l'exposition aux NP de NC seules à la dose 500 µg a entraîné, à J21, une augmentation de l'infiltration périvasculaire/péribronchique ainsi qu'une augmentation de l'expression de la MMP-12 (mesurée à la fois en termes d'ARNm et de protéine), et de l'HO-1 (mesurée en termes d'ARNm).

L'instillation d'élastase a entraîné à J21 une augmentation de la cellularité du LBA des animaux, une augmentation de l'infiltration périvasculaire/péribronchique, le développement d'un emphysème, ainsi qu'une augmentation de l'expression en ARNm de HO-1, d'IL-1β et de MMP-12. L'augmentation de l'expression de MMP-12 a été constatée à la fois en termes d'ARNm et de protéine. Ces résultats n'ont pas été modifiés par le fait d'avoir instillé des NP de TiO_2 en plus de l'élastase. En revanche, l'exposition des animaux à l'élastase et aux NP de NC à la dose 500 µg a aggravé l'inflammation due à l'élastase, sans toutefois modifier l'emphysème.

Conclusion

L'exposition aux NP de TiO_2 seules n'a pas modifié les paramètres étudiés. En revanche, l'exposition aux NP de NC seules a entraîné des effets proches de ceux de l'élastase en termes d'inflammation et d'expression de la MMP-12.

Les NP de TiO_2 et de NC utilisées n'ont pas entraîné d'aggravation de l'emphysème pulmonaire. En revanche, l'exposition aux NP de NC a aggravé l'inflammation induite par l'élastase.

Un récapitulatif des principaux résultats obtenus est présenté dans le Tableau 3.2.

Traitement à J1	Traitement à J7	Sacrifice à J8	Sacrifice à J21
Sérum physiologique	ASB		Identique à S-ASB J8
	A15 100 µg	Identique à S-ASB (contrôle négatif) à J8	Identique à S-ASB J8
	FW2 100 µg	Identique à S-ASB J8	Identique à S-ASB J8
Elastase	ASB	cellules du LBA +	cellules du LBA +, présence d'emphysème
	A15 100 µg	cellules du LBA +	cellules du LBA +, présence d'emphysème
	FW2 100 µg	cellules du LBA +	cellules du LBA +, présence d'emphysème
Sérum physiologique	ASB	Identique à S-ASB J8	Identique à S-ASB J8
	A15 500 µg	Identique à S-ASB J8	Identique à S-ASB J8
	FW2 500 µg	Identique à S-ASB J8	Inflammation +, HO-1+, MMP-12 +
Elastase	ASB	cellules du LBA +	cellules du LBA +, présence d'emphysème, inflammation +, HO-1 +, IL-1β +, MMP-12 +
	A15 500 µg	cellules du LBA +	cellules du LBA +, présence d'emphysème, inflammation +, HO-1 +, IL-1β +, MMP-12 +
	FW2 µg	cellules du LBA +	cellules du LBA +, présence d'emphysème, inflammation ++, HO-1 +, IL-1β +, MMP-12 +

Tableau 3.2 : résumé des résultats obtenus lors de la deuxième étude.
ASB : Albumine de Sérum Bovin, HO-1 : Hème Oxygénase-1, IL-1β : Interleukine-1β, LBA : Lavage Bronchoalvéolaire, MMP-12 : Matrix Métalloprotéase-12, + : augmentation.

Effect of titanium dioxide and carbon black nanoparticles on elastase-induced emphysema

Agnès Roulet [1, 2] *, Lucie Armand [1, 2] *, Maylis Dagouassat [1, 2], Françoise Rogerieux [3], Angélique Simon-Deckers [1, 2], Esther Belade [1, 2], Jeanne Tran Van Nhieu [2, 4], Sophie Lanone[1, 2, 5], Jean-Claude Pairon [1, 2, 5], Ghislaine Lacroix [3], Jorge Boczkowski [1, 2, 5, 6]

[1] Inserm U955, Equipe 4, Créteil, 94000, France

[2] Université Paris Est, Faculté de médecine, Créteil, 94000, France

[3] Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Verneuil en Halatte, France

[4] AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Département de pathologie, 94010 Créteil, France.

[5] Centre Hospitalier Intercommunal, Service de pneumologie et pathologie professionnelle, Créteil, 94000, France

[6] AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Service de Physiologie Explorations Fonctionnelles, 94010 Créteil, France

* These authors contributed equally

Corresponding authors:

Jorge Boczkowski, MD, PhD

Unité Inserm 955, Equipe 4

Faculté de Médecine de Créteil

8 rue du Général Sarrail

94000 Créteil

Phone: +331 49813658

Fax: +331 49813725

Email: jorge.boczkowski@inserm.fr

Sophie Lanone, PhD.

Unité Inserm 955, Equipe 4

Faculté de Médecine de Créteil

8, rue du Général Sarrail

94000 Créteil

Phone: +331 49 813725

Fax: +331 49813725
Email: sophie.lanone@inserm.fr

Agnès Roulet: rouletagnes@yahoo.fr;
Lucie Armand: lucie.armand.inapg@gmail.com;
Maylis Dagouassat: maylis.dagouassat@inserm.fr;
Françoise Rogerieux: Francoise.Rogerieux@ineris.fr;
Angélique Simon-Deckers: angelique.simon@gmail.com;
Esther Belade: esther.belade@inserm.fr;
Jeanne Tran Van Nhieu: jeanne.tran-van-nhieu@hmn.aphp.fr;
Sophie Lanone: sophie.lanone@inserm.fr;
Jean-Claude Pairon: JC.Pairon@chicreteil.fr;
Ghislaine Lacroix: ghislaine.lacroix@ineris.fr;
Jorge Boczkowski: jorge.boczkowski@inserm.fr.

Abstract

The aim of this study was to compare the effects of exposure to titanium dioxide (TiO_2) and carbon black (CB) nanoparticles (NPs) in inducing emphysema or aggravating elastase-induced emphysema in rats.

On day 1 (D1), rats were intratracheally instilled with 150 U elastase or saline. On day 7, they received an intratracheal instillation of TiO_2 or CB (100 or 500 µg) or bovine serum albumin. Animals were killed on days 8 (D8) or 21 (D21) for determining bronchoalveolar lavage (BAL) cellularity, performing morphlogical analysis of inflammation and emphysema, and measuring lung expression of heme oxygenase-1 (HO-1), interleukin-1beta (IL-1beta), macrophage inflammatory protein-2, monocyte chemotactic protein -1, matrix metalloprotease (MMP)-1, and -12.

With saline treatment, TiO_2 NPs did not modify the factors investigated, but CB NPs increased perivascular/peribronchial infiltration and macrophage MMP-12 expression. Elastase alone increased BAL cellularity, morphological inflammation and emphysema, and induced overexpression of HO-1, of IL-1beta and of macrophage MMP-12 at D21. Exposure to TiO_2 NPs did not modify pulmonary response to elastase, but exposure to CB NPs aggravated elastase-induced histological inflammation without aggravating morphological emphysema.

TiO_2 and CB NPs did not aggravate elastase-induced emphysema. However, CB NPs induced similar effects as elastase and aggravated elastase-induced histological inflammation.

Keywords: COPD, emphysema, occupational, particles, toxicity

BACKGROUND

Pulmonary emphysema is a chronic degenerative lung disease characterized by an imbalance in alveolar destruction and repair that results in progressive destruction of pulmonary alveoli and chronic respiratory failure [246]. Pulmonary emphysema is one of the components of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a frequent condition with a worldwide prevalence of more than 10% in men older than 40 years. The prevalence and mortality of COPD are predicted to further increase in the next decades [247]. Different processes are involved in alveolar destruction in emphysema, particularly excess of protease expression and activity in the lung. In addition to neutrophil elastase, macrophage matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -12 have a critical role in pulmonary emphysema (see [184] for review).

Nanotechnology is a continually developing field. Reducing a particle's size to the nanometric dimension can greatly modify its properties, for applications in numerous fields such as electronics, materials or health. However, concerns have arisen about the possible effects of these manufactured nanoparticles (NPs) on the health of users and/or workers manipulating them [114]. Indeed, the toxic effects of NPs are being increasingly evaluated (see for example [248]).

Titanium dioxide (TiO_2) is one of the most abundantly produced NPs [63]. Because of its optical, photocatalytic and self-cleaning properties, it is widely used in paints, pigments, and cosmetics. Nevertheless, exposure to TiO_2 NPs has various biological effects [240]. Respiratory exposure to TiO_2 NPs in animals was found associated with pulmonary inflammation [128] [249], parenchymal remodeling [6, 250] and cancer [251]. TiO_2 NP exposure has been linked to an increase in MMP expression: MMP-12 in murine macrophages [252] and MMP-7, -9 and -10 in keratinocytes [73]. Moreover, TiO_2 NPs induced the expression of interleukin-1β (IL-1β) [249], a strong inducer of MMP-1 [202]. Therefore, exposure to TiO_2 NPs could lead to and/or aggravate pre-existing pulmonary emphysema, given the roles of MMP-1 and MMP-12 in the pathophysiologic features of the disease. The potential aggravation of pre-existing emphysema by TiO_2 NPs is important because of the frequency of COPD and the possibility of patients with COPD having been exposed to TiO_2 NPs.

Carbon black (CB) NPs are also abundantly produced [63]. Exposure to CB NPs can induce cell apoptosis [253] or inflammation [74] or aggravate already existing abnormalities such as fibrosis [254] or allergic airway inflammation [255]. However, its comparative effects with TiO_2 NPs on emphysema induction or aggravation have not been examined yet. This is an important point because the effects of NPs depend in part on their chemical nature, and thus

we can expect differences in emphysema generation and/or aggravation related to the chemical nature of the considered NP.

Therefore, we aimed to assess whether pulmonary administration of TiO_2 or CB NPs in rats could induce and/or aggravate emphysema and investigate the molecular mechanisms involved. We used a well established elastase-induced pulmonary emphysema rat model, which reproduces key phenomena occurring in alveolar walls of patients with emphysema [256]. NPs were administered 7 days after elastase instillation, to assess the effects on the development of already constituted but still progressing emphysema [257]. We examined animals at 2 time-points and exposed to 2 doses of TiO_2 or CB NPs. We also characterized the physicochemical properties of NPs in terms of size, morphologic features, surface area, degree of dispersion and endotoxin content, as factors able to influence their biological properties ([248] [258]).

RESULTS

Characterization of NPs

The detailed physicochemical characterization of NPs (surface area, primary particle size, zeta potential and hydrodynamic diameter) is given in Table 2**.** CB NPs had a higher specific surface area than TiO_2 NPs ($p<0.05$). Both NPs had a similar size, about 15 nm diameter. The zeta potential for CB and TiO_2 NPs, used to indicate suspension stability, was about |20| mV, a commonly used limit above which the suspension is aggregated [189]. Indeed, particle size distribution (PSD) studies showed aggregation for both NPs, with an average hydrodynamic diameter of about 500 nm.

No endotoxin was detected in either NP (data not shown).

BAL cellularity

8 and 21 days after saline/elastase instillation (D8 and D21, respectively), in presence or absence of NPs, elastase induced a significant increase in total Bronchoalveolar Lavage (BAL) cellularity as compared to saline treatment ($p<0.05$, Figure 1). Alveolar macrophages represented more than 80% of total cells in the BAL, with no significant difference between groups (Figure 2).

Emphysema quantification

Emphysema was quantified at D21 as described previously [259]. As expected, mean airspace chord length was greater with elastase than saline treatment ($p<0.05$, Figure 3A, B), in absence or presence of whatever dose of NPs. Therefore, considering that the effects of NPs on LBA cellularity and emphysema were similar when the animals were exposed to 100 or 500 µg NPs, we used 500 µg NPs for the remaining studies.

Histological analysis of inflammation

At D8 and D21, rats receiving saline or elastase showed no alveolar inflammation nor perivascular oedema in absence or presence of NPs (Figure 4A-4D).

At D8, with saline treatment, perivascular infiltration was greater in rats exposed to CB but not TiO_2 NPs than BSA-treated animals ($p<0.05$, Figure 4E). Elastase treatment resulted in a significant increase in perivascular infiltration ($p<0.05$, Figure 4E). Moreover, exposure of elastase-treated rats to CB slightly but significantly increased this phenomenon. The infiltrates were mainly composed of lymphocytes, with also neutrophils and macrophages (Figure 4G). Some infiltrates were also located peribronchially. A similar pattern was observed at D21 (Figure 4F).

Gene expression quantification

At D8, no induction of HO-1, IL-1β, MIP-2, MCP-1, MMP-1 or MMP-12 was observed after NP exposure alone, elastase instillation alone or elastase followed by NP exposure (data not shown).

At D21, with saline treatment, the mRNA levels of HO-1 and MMP-12 were increased in rats exposed to CB but not TiO_2 NPs ($p<0.05$; Figure 5A, F). With elastase treatment, the mRNA levels of HO-1, IL-1β and MMP-12 were higher than that with saline treatment (Figure 5A, B and F); a similar pattern was observed in rats instilled with CB NPs. With elastase treatment, the mRNA level of MMP-12 was higher in rats with TiO_2 exposure than BSA exposure (Figure 5F).

MMP-12 and CD68 immunohistochemical analysis

To verify whether the increase in MMP-12 mRNA level was also observed at the protein level**,** we analyzed the protein expression of MMP-12 at D21 by immunohistochemical staining. With saline treatment, staining for MMP-12 protein was greater with CB NPs than BSA exposure ($p<0.05$, Figure 6A, B). Moreover, staining was greater with elastase than saline treatment, regardless of NP exposure.

Because MMP-12–positive cells showed morphologic features of macrophages, we verified the features by CD68 immunostaining in a serial slide compared to the one in which MMP-12 was detected. Figure 6C shows results for CD68 staining similar to those for MMP-12 staining. Besides, most cells expressing MMP-12 also expressed CD68, which strongly suggests that cells expressing MMP-12 were macrophages. Stained cells were located in the alveolar lumen and in the perivascular and peribronchial infiltrates (Figure 6A). Additionally, NP aggregates were observed in some CD68 positive cells.

DISCUSSION

The main results of our study are that: *1)* TiO_2 NPs did not induce inflammation *per se* and did not aggravate elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema, except for an increase in elastase-induced MMP-12 mRNA expression in the lung, and *2)* CB NPs induced perivascular/peribronchial infiltration, increased HO-1 mRNA expression in the lung and increased MMP-12 mRNA and protein expression in alveolar macrophages. CB NPs aggravated elastase-induced perivascular/peribronchial inflammation but not emphysema. These results demonstrate, to the best of our knowledge, for the first time, that a single dose of TiO_2 or CB NPs during elastase-induced emphysema did not aggravate the disease. However, CB NPs induced a lung inflammatory and proteasic response close to that induced by elastase and, notably, macrophage MMP-12 expression.

Several studies examined the pulmonary effects of TiO_2 NPs in experimental animal models. Some authors described a strong inflammatory response [249] and an association with emphysema-like alterations [6]. Others found an absence or mild and transient inflammation [128] [260]. The main difference between these studies is the dose of NPs, from 4 to 30 mg/kg in the studies finding strong inflammation [249] [6] and 1 mg/kg for studies finding an absence or a mild inflammatory response [128, 260]. Our results agree with these last data, because we observed no inflammation in animals exposed to 0.4 and 2 mg/kg TiO_2 NPs. In this study we wanted to use doses which were relevant in terms of human exposure. We reasoned in terms of the current time-weighted average concentrations (TWA) recommendations for workers exposed to TiO_2 (http://www.cdc.gov/niosh/review/public/tio2/pdfs/TIO2Draft.pdf). These values are between 1.5 and 15 mg/m^3 for a single shift of work (Table 1 of the above referenced document). In our study, we used 0.4 and 2 mg/kg, corresponding to a total administered-mass of 100 and 500 µg per rat, for a 250 g rat. For a 70 kg human, this concentration would lead to the total administration of 28 and 140 mg. For a worker inhaling 10 m^3 per workday, it implies a 2.8 and 14 mg/m^3 TiO_2 concentration exposure, concentration, which is in the range of TWA values. Of course, we are aware that only a fraction of this inhaled dust reaches and remains in the lung. However, it is known that TiO_2 particles have a long retention half-time (between 170 and 500 days for the fine and ultra-fine TiO_2 particles respectively [261]). Therefore, the calculation of the total administered dose must take into account the duration between the day of NP administration and the day the animals are sacrificed. In our study, we observed a 14 days shift between administration and sacrifice. Therefore, the dose initially administrated should be divided by 14, which leads to values well below TWA values.

Beside mass-doses, expressing the dose of TiO_2 on a specific surface area basis also shows a critical role of the amount of NPs on TiO_2 pulmonary effects [128, 260]. Furthermore, this factor seems more important than the crystalline form because our current and previous studies showing mild pulmonary effects of TiO_2 NPs examined anatase NPs, which are more cytotoxic and capable of generating more reactive oxygen species than are rutile ones *in vitro* [144, 262]. We used BSA to disperse the NPs in solution and this procedure could influence the biological effects of the NPs, as demonstrated by Val and colleagues in bronchial epithelial cells exposed to CB and TiO_2 NPs [74]. However, other investigators did not find such interference with investigation of different types of carbon nanotubes [194]. This aspect deserves further investigation.

We used NPs that had similar size, but the specific surface area was 3 times greater for CB than TiO_2 NPs. *In vivo* and *in vitro* studies demonstrated that the surface area of NPs can be a main determinant of their pro-inflammatory effects [47] [145] [146] [81] [260]. This parameter and/or a different surface reactivity, related to the chemical nature of the NPs, can explain the difference in inflammatory effects. It has it has been demonstrated that TiO_2 and CB elicited distinct apoptotic pathways [253], which could also impact their effects on the animals. However, no morphological sign of apoptosis was observed in the rat lungs. In contrast to TiO_2 NPs, CB NPs induced inflammation and expression of the oxidative stress marker HO-1 and the protease MMP-12. Using the same NPs as we used, Hussain and coworkers [260] showed that the reactivity of CB NPs was higher than that of TiO_2 NPs, as evaluated by the production of reactive oxygen species in acellular conditions. The increase in HO-1 expression we observed supports an oxidative effect of CB NPs [263] [264], which, already described in bronchial epithelial cells [253], could be responsible for the inflammatory effect of CB NPs [265]. Although we did not find an increase in inflammatory cells in BAL at the 2 times, the histological lesions we observed consisted of perivascular and peribronchial infiltration of neutrophils, lymphocytes and macrophages, as observed previously with other particles [260] [266]. Macrophages engulfed CB NPs, apparent as pigmentation in the histological sections. In addition to attracting macrophages to the lung, CB NPs activated these cells, as revealed by their increased MMP-12 protein expression detected by immunohistochemistry. We and others [252] [267] showed that different particles, such Paris Metro or atmospheric particulate matter (PM 10) particles, could induce MMP-12 expression in macrophages. The present results provide the first demonstration of an increase in MMP-12 expression by manufactured NPs, both at the mRNA and protein levels.

Although we analyzed MMP-12 protein expression and its localization, we did not measure its activity. However, our results showing MMP-12 protein expression in macrophages are compatible with the presence of an active enzyme. Indeed, Cobos-Correa and coworkers [267] demonstrated in mice intratracheally instilled with PM 10 particles that active MMP-12 is bound to the membrane of alveolar macrophages. The increase in MMP-12 expression after a single exposure to a low dose of CB NPs could have important pathophysiological consequences because this protease plays a critical role in emphysema and COPD [185] [268]. Continuous exposure to low doses of CB NPs could be consistent with a continuous degradation of pulmonary elastin, which could lead to a progressive and chronic degradation of lung function, as observed in smokers with developing COPD [268]. Oxidative stress can explain MMP-12 induction [269]. Interestingly, HO-1 and MMP-12 were also induced in rats with elastase-induced emphysema, which supports the pathophysiological relevance of their increased expression after CB NP administration.

TiO_2 NPs did not induce inflammation or protease expression *per se* but, rather, potentiated MMP-12 mRNA induction by elastase. This result is in line with data from Hussain and coworkers [260] showing that TiO_2 NPs, at a dose close to ours, potentiated toluene diisocyanate-induced allergic inflammation in mice without inducing inflammation *per se.* However, the relevance of the potentiation of elastase-induced MMP-12 mRNA expression by TiO_2 is questionable, because we were unable to detect a parallel increase in protein expression. Moreover, this phenomenon was observed in the absence of a parallel increase in HO-1 and IL-1β expression, which suggests that the effect of TiO_2 NPs on MMP-12 expression is independent of oxidative stress or IL-1β induction. Further experiments are needed to better understand this phenomenon.

CB NPs were unable to potentiate elastase-induced emphysema, although they induced inflammation and MMP-12 expression *per se* and potentiated elastase-induced perivascular/peribronchial infiltration. However, CB NPs did not potentiate HO-1, IL-1β and MMP-12 induction by elastase administration. Inoue and coworkers [270] recently examined the effects of CB NPs on elastase-induced emphysema. CB NPs with a specific surface area and a diameter close to our NPs (300 m^2/g and 14 nm, respectively) also induced inflammation *per se* and potentiated elastase-induced inflammation (BAL neutrophil number at days 1 and 7 and IL-1β, keratinocyte-derived chemokine and MCP-1 BAL levels at day 1 post-instillation) but not emphysema features. The dose of CB NPs was similar to ours, but the NPs the authors used were administered simultaneously with elastase, whereas we administered NPs 1 week after elastase to assess the effects on the development of already

constituted but still progressing emphysema [257]. This difference could explain why Inoue and coworkers [270] found potentiation of elastase-induced inflammation by CB NPs, whereas the phenomenon was mild (only observed at the histological level) in the present study. Indeed, the simultaneous instillation of elastase and CB NPs could create a synergic pulmonary aggression, which was absent with successive administration of both agents. The absence of NP-induced emphysema in the present study and in Inoue and coworkers' work [40] could also be related to the duration of particle exposure. Lopes and colleagues [42] recently showed that chronic (2-month) exposure to ambient levels of PM 10 (emitted by traffic) worsened murine inflammation emphysema induced by elastase. Interestingly, the potentiation of elastase-induced inflammation by CB NPs is in contrast with a reduced inflammatory response to bacterial infection in elastase-instilled animals [271] [272], suggesting a specific effect of NPs in this model.

CONCLUSION

We show an absence of aggravation of emphysema with the administration of a single dose of TiO_2 or CB NPs. However, CB NPs *per se* aggravated elastase-induced histological inflammation and increased expression of MMP-12, a major protease involved in emphysema pathophysiologic features. Further studies with prolonged exposure to NPs are needed to examine the implications of these findings in terms of emphysema evolution.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Anatase TiO_2 NPs (reference 637264) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). CB NPs (reference Color Black FW 2) were purchased from Degussa (Dusseldorf, Germany).

The NP were suspended in 0.5 mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) as described previously [194].

Characterization of NPs

Specific surface area was measured using Brunauer Emmett Teller (BET) adsorption isotherms of nitrogen at 77 K. Particle Size Distribution function (PSD) and zeta potential were determined in saline + 0.5 mg/mL BSA using a Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Transmission Electron Microscopy (TEM) measurements have been performed previously [79]. NPs endotoxin content was examined using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) kit QCL-1000 (Lonza, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions.

Animals

240 male Sprague–Dawley rats aged 6 to 8 weeks were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). The rats were kept in a conventional animal facility and housed in positive-pressure air-conditioned units (22 °C, 60% relative humidity) on a 12h:12h light/dark cycle. They had *ad libitum* access to food and water. The experimental protocol has been approved by the local ethical committee for animal research.

Intratracheal instillation studies

All animals were anaesthetized by intramuscular injection of a mixture of ketamine (1.6 mg, Merial, Lyon, France) and xylazine (300 µg, Bayer, Puteaux, France). The trachea was surgically exposed, and sterile saline solution or 150 U porcine pancreatic elastase (Elastin Products, Owensville, MO) diluted in sterile saline solution was instilled, in a volume of 150 µL. Seven days after elastase or saline instillation (D7), rats underwent intratracheal instillation with BSA (0.5 mg/mL) or TiO_2 or CB NPs (100 or 500 µg/rat). Half of the rats were sacrificed the day after NP instillation (day 8 [D8] after elastase), and the other half 14 days after NP instillation (day 21 [D21] after elastase). Therefore, 6 groups of animals (n=10 in each one) were constituted per sacrifice time (D8 and D21, respectively) and per dose of NPs (100 µg and 500 µg, respectively): saline+BSA (S-BSA), saline+TiO_2 (S-TiO_2), saline+CB (S-CB), elastase+SA (E-BSA), elastase+TiO_2 (E-TiO_2), and elastase+CB (E-CB).

For each experimental condition, 2 groups (group A and group B) of rats were used, with 6 animals in group A and 4 in group B. Bronchoalveolar lavage (BAL) and Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) of the total lung were performed on rats included in group A. Histopathology and immunohistochemistry were performed in the lungs of rats included in group B. These lungs were fixed by airway instillation with 4% phosphate buffered paraformaldehyde at a pressure of 20 cm fluid column for 24 h, before being embedded in paraffin. Great-axis sagittal sections (5 µm) were performed in a systematic manner on the same part of the lung. Some sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological studies; others were kept unstained for immunohistochemical analysis.

Broncho alveolar lavage cellularity

Bronchoalveolar lavage (BAL) cellularity was analyzed in anesthetized animals as previously described [194].

Histopathological analysis

Inflammatory abnormalities and emphysema were analyzed with an optic microscope (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen,Germany).

The whole tissue section was used for histological study of inflammation. Inflammatory abnormalities studied were the following: alveolar inflammation, perivascular oedema and perivascular/peribronchial infiltration as described previously [196]. Analysis and quantification of the histopathological alterations was performed by two independent investigators, including an unrelated expert pathologist who was blinded from the experimental design and the treatments the animals received. All histological alterations of the same type present on each section were photographed, and surrounded using the Zeiss Axiovision 40 software (Carl Zeiss), which gave the corresponding area for each alteration. The global alteration score of each animal was calculated as the sum of the areas obtained for each alteration on the section.

In order to quantify emphysema, three black-and-white digital photomicrographs were acquired from the cranial, medial, and caudal regions of each slide at x40 magnification, excluding areas where large bronchi or vessels predominated, resulting in a total of 9 images per lung. Emphysema was then quantified by measurement of the mean chord length of alveoli with Analysis software (Soft Imaging System, Münster, Germany) at a 5-mm interval as described previously [259]. The global emphysema score of each animal was calculated as the mean of the mean chord length obtained for the 9 photographs.

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR in lung homogenates was performed as previously described [259]. Genes analyzed were heme oxygenase 1 (HO-1), interleukin 1β (IL-1β), macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), MMP-1 and MMP-12. The primer sequences are given in Table 1. Gene expression was normalized to that of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) as a housekeeping gene.

Immnunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed to detect the protein expression of MMP-12 (anti-MMP-12 antibody, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:100 dilution) and CD68 (anti-CD68 antibody, Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:200). Quantification was performed using ImageJ software [195]. Results were expressed as the percentage of stained cells versus total cells.

Statistics

Data are expressed as median and interquartile range (IQR; 25th and 75th percentiles). Analysis was performed using GraphPad Prism 4.0 software (La Jolla, CA, USA). Comparisons between multiple groups were performed using Kruskall–Wallis non-parametric ANOVA followed by Mann–Whitney U test when a difference was detected. All comparisons were realized with correction for multiple comparisons. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

SL, GL and JB designed the study. LA, EB and ASD characterized the NP. AR, FR and GL conducted the animals' instillations experiments. AR, LA and MD performed the biological assays. JTVN helped for the inflammation features identification. LA, and JB drafted the manuscript, and JCP and SL helped with the final version. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Nathalie Herlin and Aurélie Habert from the Atomic Energy Commission (Laboratoire Francis Perrin) for their support in nanoparticle characterization, Olivier Thibaudeau (Hôpital Xavier Bichat, Paris) and Jocelyne Fleury (Hôpital Thenon, Paris) for their collaboration and Philippe Caramelle and Marie-Laure Franco (Inserm U955, Team 4) for technical help during the *in vivo* studies.

This work was supported by the “Agence Nationale de la Recherche France” (Nanotox project, 05 9 79-05 SET 024-01), the “Société de Pneumologie de Langue Française” for a master’s grant for Agnès Roulet, the “ABIES” PhD program for a PhD grant for Lucie Armand, and the “Agence nationale de sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail” (ANSES) for a PhD grant and funding for Esther Belade.

REFERENCES

1. Chung KF, Adcock IM: **Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction.** *Eur Respir J* 2008, **31:**1334-1356.

2. Mathers CD, Loncar D: **Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030.** *PLoS Med* 2006, **3:**e442.

3. Abboud RT, Vimalanathan S: **Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2008, **12:**361-367.

4. Nel A, Xia T, Madler L, Li N: **Toxic potential of materials at the nanolevel.** *Science* 2006, **311:**622-627.

5. Boczkowski J, Hoet P: **What's new in nanotoxicology? Implications for public health from a brief review of the 2008 literature.** *Nanotoxicology*, **4:**1-14.

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

7. Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V: **Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO(2)particulates: the contribution of physicochemical characteristics.** *Part Fibre Toxicol* 2009, **6:**33.

8. Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM: **Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO2 particles: differential responses related to surface properties.** *Toxicology* 2007, **230:**90-104.

9. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J: **Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107:**19449-19454.

10. Churg A, Stevens B, Wright JL: **Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO2 in a tracheal explant system.** *Am J Physiol* 1998, **274:**L81-86.

11. Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, Chen JJ, Yang PC: **Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice.** *FASEB J* 2006, **20:**2393-2395.

12. Hext PM: **Current perspectives on particulate induced pulmonary tumours.** *Hum Exp Toxicol* 1994, **13:**700-715.

13. Bachoual R, Boczkowski J, Goven D, Amara N, Tabet L, On D, Lecon-Malas V, Aubier M, Lanone S: **Biological effects of particles from the paris subway system.** *Chem Res Toxicol* 2007, **20:**1426-1433.

14. Fujita K, Horie M, Kato H, Endoh S, Suzuki M, Nakamura A, Miyauchi A, Yamamoto K, Kinugasa S, Nishio K, et al: **Effects of ultrafine TiO2 particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: involvement of extracellular matrix and cell adhesion.** *Toxicol Lett* 2009, **191:**109-117.

15. Raymond L, Eck S, Mollmark J, Hays E, Tomek I, Kantor S, Elliott S, Vincenti M: **Interleukin-1 beta induction of matrix metalloproteinase-1 transcription in chondrocytes requires ERK-dependent activation of CCAAT enhancer-binding protein-beta.** *J Cell Physiol* 2006, **207:**683-688.

16. Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, Fleury J, Baeza-Squiban A, Marano F, Boland S: **Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells.** *Part Fibre Toxicol,* **7:**10.

17. Val S, Hussain S, Boland S, Hamel R, Baeza-Squiban A, Marano F: **Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts.** *Inhal Toxicol* 2009, **21 Suppl 1:**115-122.

18. Kamata H, Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Ishii M, Hasegawa N, et al: **Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice.** *Exp Biol Med (Maywood),* **236:**315-324.

19. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Yoshikawa T: **Effects of nano particles on antigen-related airway inflammation in mice.** *Respir Res* 2005, **6:**106.

20. Mercer RR, Crapo JD: **Structural changes in elastic fibers after pancreatic elastase administration in hamsters.** *J Appl Physiol* 1992, **72:**1473-1479.

21. Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Kamata H, Shinoda H, Hasegawa N, Miyasho T, Satoh M, Takano H, Ishizaka A: **Role of interleukin-6 in elastase-induced lung inflammatory changes in mice.** *Exp Lung Res,* **36:**362-372.

22. Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I: **Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity.** *Nanotoxicology* 2010, **4:**347-363.

23. Mehnert W, Mader K: **Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications.** *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **47:**165-196.

24. Boyer L, Plantier L, Dagouassat M, Lanone S, Goven D, Caramelle P, Berrehar F, Kerbrat S, Dinh-Xuan AT, Crestani B, et al: **Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema.** *Lab Invest,* **91:**353-362.

25. Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, Martens JA, Dinsdale D, Boland S, Marano F, et al: **Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model.** *Eur Respir J*, **37:**299-309.

26. Oberdorster G, Ferin J, Lehnert BE: **Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury.** *Environ Health Perspect* 1994, **102 Suppl 5:**173-179.

27. Mo SD, Ching WY: **Electronic and optical properties of three phases of titanium dioxide: Rutile, anatase, and brookite.** *Phys Rev B Condens Matter* 1995, **51:**13023-13032.

28. Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL: **Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells.** *Toxicol Sci* 2006, **92:**174-185.

29. Elgrabli D, Abella-Gallart S, Aguerre-Chariol O, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G: **Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for in vivo and in vitro studies.** *Nanotoxicology* 2007, **1:**266-278.

30. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J: **Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.** *Environ Health Perspect* 2005, **113:**823-839.

31. Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroeppel A, Karg E, Ritter B, Heyder J, Schulz H: **Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice.** *Environ Health Perspect* 2006, **114:**328-333.

32. Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K: **The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area.** *Occup Environ Med* 2007, **64:**609-615.

33. Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Hohr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJ, Schins RP: **Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, **222:**141-151.

34. Guenegou A, Leynaert B, Benessiano J, Pin I, Demoly P, Neukirch F, Boczkowski J, Aubier M: **Association of lung function decline with the heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism in a general population sample. Results from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS), France.** *J Med Genet* 2006, **43:**e43.

35. Almolki A, Guenegou A, Golda S, Boyer L, Benallaoua M, Amara N, Bachoual R, Martin C, Rannou F, Lanone S, et al: **Heme oxygenase-1 prevents airway mucus hypersecretion induced by cigarette smoke in rodents and humans.** *Am J Pathol* 2008, **173:**981-992.

36. Li JJ, Muralikrishnan S, Ng CT, Yung LY, Bay BH: **Nanoparticle-induced pulmonary toxicity.** *Exp Biol Med (Maywood)*, **235:**1025-1033.

37. Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J: **Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO(2) particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results.** *Toxicology* 2009, **264:**110-118.

38. Cobos-Correa A, Trojanek JB, Diemer S, Mall MA, Schultz C: **Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation.** *Nat Chem Biol* 2009, **5:**628-630.

39. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD: **Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice.** *Science* 1997, **277:**2002-2004.

40. Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, Stidley C, Melen E, Soderhall C, Hallberg J, et al: **MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations.** *N Engl J Med* 2009, **361:**2599-2608.

41. Lavigne MC, Eppihimer MJ: **Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **330:**194-203.

42. Inoue K, Yanagisawa R, Koike E, Nakamura R, Ichinose T, Tasaka S, Kiyono M, Takano H: **Effects of carbon black nanoparticles on elastase-induced emphysematous lung injury in mice.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **108:**234-240.

43. Inoue S, Nakamura H, Otake K, Saito H, Terashita K, Sato J, Takeda H, Tomoike H: **Impaired pulmonary inflammatory responses are a prominent feature of streptococcal pneumonia in mice with experimental emphysema.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167:**764-770.

44. Pang B, Hong W, West-Barnette SL, Kock ND, Swords WE: **Diminished ICAM-1 expression and impaired pulmonary clearance of nontypeable Haemophilus influenzae in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease/emphysema.** *Infect Immun* 2008, **76:**4959-4967.

45. Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, Billon-Galland MA, Fleury-Feith J, Moisan F, Pairon JC, Marano F: **Oxidative stress and**

proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* 2009, **260:**142-149.

46. Elekes K, Helyes Z, Kereskai L, Sandor K, Pinter E, Pozsgai G, Tekus V, Banvolgyi A, Nemeth J, Szuts T, et al: **Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse.** *Eur J Pharmacol* 2008, **578:**313-322.

47. Abramoff MD, Magelhaes, P J, Ram, S J: **Image Processing with ImageJ.** *Biophotonics International* 2004, **11:**36-42.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Bronchoalveolar lavage (BAL) total cell number.
Quantification of BAL total cell number at D8 (A, C) and D21 (B, D) post elastase treatment, in presence of 100 µg (A, B) or 500 µg NPs. S, saline; E, elastase; BSA, bovine serum albumin. CB, carbon black. TiO_2, titanium dioxide. *: $p<0.05$ vs S-BSA. n=6. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 2. Proportion of alveolar macrophages in the BAL.
Quantification of the differential cell count of the BAL at D8 (A, C) and D21 (B, D) post elastase treatment, in presence of 100 µg (A, B) or 500 µg (C, D) NPs. n=6. Abbreviations are the same as in Figure 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 3. Emphysema quantification.
Emphysema quantification assessed by measurement of the alveolar mean chord length at D21, in presence of 100 µg (A) or 500 µg (B) NPs. *: $p<0.05$ vs S-BSA. n=4. Abbreviations are the same as in Figure 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 4. Quantitative analysis of histological inflammation in animals receiving 500 µg NPs.
Histological inflammation was quantified in terms of alveolar inflammation (A, B), perivascular oedema (C, D) and perivascular/peribronchial infiltration (E, F) 8 days (A, C, E) or 21 days (B, D, F) after initial elastase administration in animals receiving 500 µg NPs. Data are expressed as the total surface of the histological slide presenting the histological feature. *: $p<0.05$ vs S-BSA. §: $p<0.05$ vs E-BSA. n=4. Abbreviations are the same as in Figure 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles). Panel G: representative histological staining of perivascular/peribronchial infiltrates in rat lung at D21 in animals exposed to 500 µg NPs. Arrows point to perivascular infiltrates. Magnification x20.

Figure 5. Gene expression at D21 in animals receiving 500 µg NPs.

Quantification of mRNA expression of the different genes at D21 by RT-qPCR. Data are expressed as the ratio to HPRT as housekeeping gene. Rats were exposed to 500 µg NPs. *: $p<0.05$ vs S-BSA. §: $p<0.05$ vs E-BSA. n=6. Abbreviations are the same as in Table 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 6. Quantification of MMP-12 and CD68 immunostaining at D21 in animals receiving 500 µg NPs.

Localization and quantification of MMP-12 and CD68 on lung sections of rats exposed to 500 µg NPs evaluated at D21 after elastase administration. (A) Representative histological images of staining for MMP-12 (magnification x20, left column) and CD68 (magnification x20, middle column, magnification x40, right column). Arrows point to macrophages containing NPs. (B) Quantification of MMP-12–positive cells reported to the total number of cells. (C) Quantification of CD68-positive cells reported to the total number of cells. *: $p<0.05$ vs S-BSA. n=4. Abbreviations are the same as in Figure 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Table 1. Primers used for real-time PCR

Name	Genbank Accession Number	Sequences (5'-> 3')	Product size (bp)
HO-1	NM_012580.2	TGCTGACAGAGGAACACAAAGA CGGTCGCCAACAGGAAACT	186
IL-1β	NM_031512.2	CTGTGACTCGTGGGATGATG GGGATTTTGTCGTTGCTTGT	210
MCP-1	NM_031530	CCAGAAACCAGCCAACTCTCA TGTGAACAACAGGCCCAGAAG	90
MIP-2	NM_053647.1	AGGATCGTCCAAAAGATACTGAACA TTGATTCTGCCCGTTGAGGTA	90
MMP-1	NM_001134530.1	GCCAACAGGTGCAACAACAC GCATCAAGTTTACCTGGCAGATT	186
MMP-12	NM_053963.2	CCCCAACACATTTCGTCTCTCT GGATTTGTCAAGGATGGGTTT	90
HPRT	NM_012583.2	TGCTGAAGATTTGGAAAAGGTGT TTATGTCCCCCGTTGACTG	261

HO-1: heme oxygenase-1

IL-1β: interleukin-1β

MCP-1: macrophage inflammatory protein-2

MIP-2: monocyte chemotactic protein-1

MMP-1: matrix metalloprotease-1

MMP-12: matrix metalloprotease-12

HPRT: hypoxanthine phosphoribosyltransferase

Table 2. Nanoparticles characterization.

Nanoparticle	Crystal phase	Surface area (m^2/g)	Average size (nm) (a)	Zeta potential (mV)	Hydrodynamic diameter (nm)
CB	Amorphous	373±18 *	23±6	-21.4	613±145
TiO_2	Anatase	141±6	12±2	-16.9	451±80

CB, carbon black; TiO_2, titanium dioxide

(a) From reference [18]

Data are mean ± standard error of mean.

*: $p<0.05$ vs TiO_2

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Bronchoalveolar lavage (BAL) total cell number.

Quantification of BAL total cell number at D8 (A, C) and D21 (B, D) post elastase treatment, in presence of 100 µg (A, B) or 500 µg NPs. S, saline; E, elastase; BSA, bovine serum albumin. CB, carbon black. TiO_2, titanium dioxide. *: $p<0.05$ vs S-BSA. n=6. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 2. Proportion of alveolar macrophages in the BAL.

Quantification of the differential cell count of the BAL at D8 (A, C) and D21 (B, D) post elastase treatment, in presence of 100 µg (A, B) or 500 µg (C, D) NPs. n=6. Abbreviations are the same as in Figure 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 3. Emphysema quantification.

Emphysema quantification assessed by measurement of the alveolar mean chord length at D21, in presence of 100 µg (A) or 500 µg (B) NPs. *: $p<0.05$ vs S-BSA. n=4. Abbreviations are the same as in Figure 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 4. Quantitative analysis of histological inflammation in animals receiving 500 µg NPs.

Histological inflammation was quantified in terms of alveolar inflammation (A, B), perivascular oedema (C, D) and perivascular/peribronchial infiltration (E, F) 8 days (A, C, E) or 21 days (B, D, F) after initial elastase administration in animals receiving 500 µg NPs. Data are expressed as the total surface of the histological slide presenting the histological feature. *: $p<0.05$ vs S-BSA. §: $p<0.05$ vs E-BSA. n=4. Abbreviations are the same as in Figure 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles). Panel G: representative histological staining of perivascular/peribronchial infiltrates in rat lung at D21 in animals exposed to 500 µg NPs. Arrows point to perivascular infiltrates. Magnification x20.

Figure 5. Gene expression at D21 in animals receiving 500 µg NPs.

Quantification of mRNA expression of the different genes at D21 by RT-qPCR. Data are expressed as the ratio to HPRT as housekeeping gene. Rats were exposed to 500 µg NPs. *: $p<0.05$ vs S-BSA. §: $p<0.05$ vs E-BSA. n=6. Abbreviations are the same as in Table 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 6. Quantification of MMP-12 and CD68 immunostaining at D21 in animals receiving 500 µg NPs.

Localization and quantification of MMP-12 and CD68 on lung sections of rats exposed to 500 µg NPs evaluated at D21 after elastase administration. (A) Representative histological images of staining for MMP-12 (magnification x20, left column) and CD68 (magnification x20, middle column, magnification x40, right column). Arrows point to macrophages containing NPs. (B) Quantification of MMP-12–positive cells reported to the total number of cells. (C) Quantification of CD68-positive cells reported to the total number of cells. *: $p<0.05$ vs S-BSA. n=4. Abbreviations are the same as in Figure 1. Box plots show median and interquartile range (25th and 75th percentiles).

Figure 1

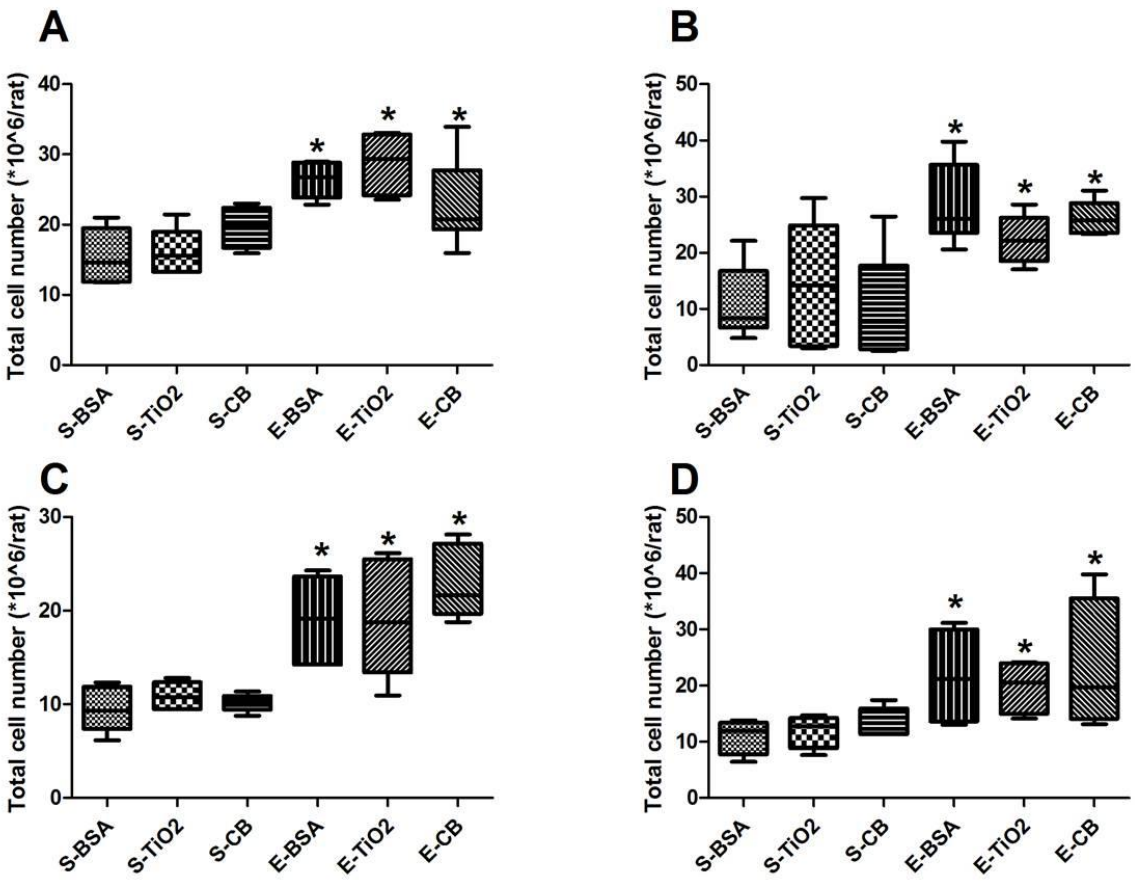


Figure 2

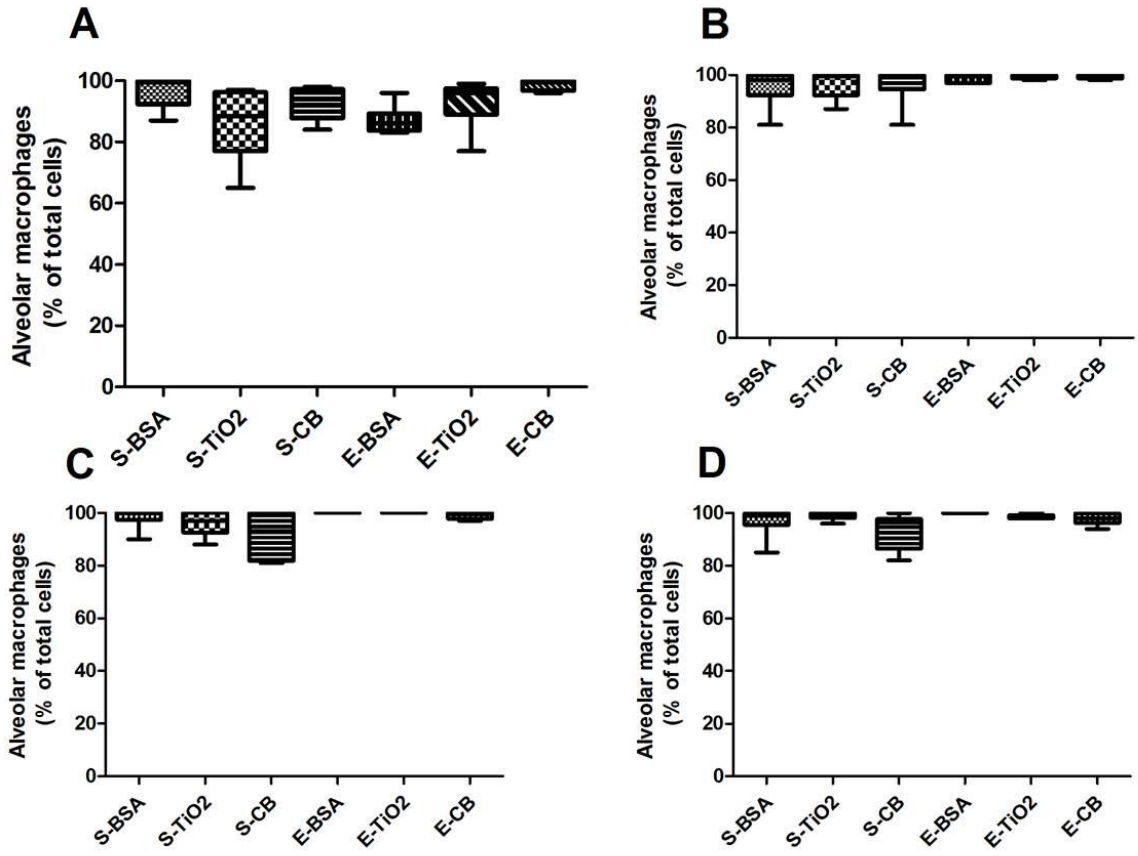


Figure 3

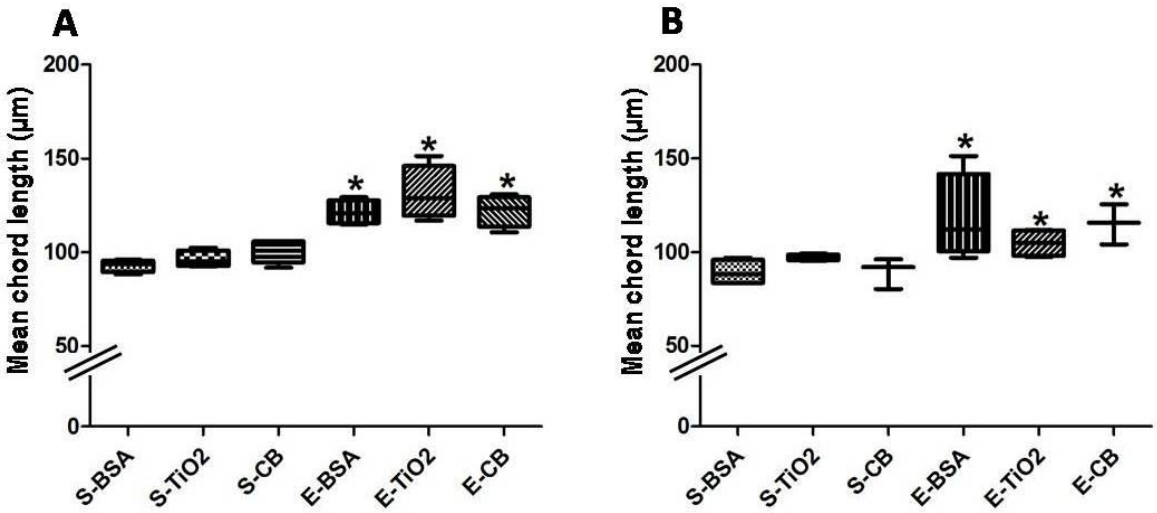


Figure 4

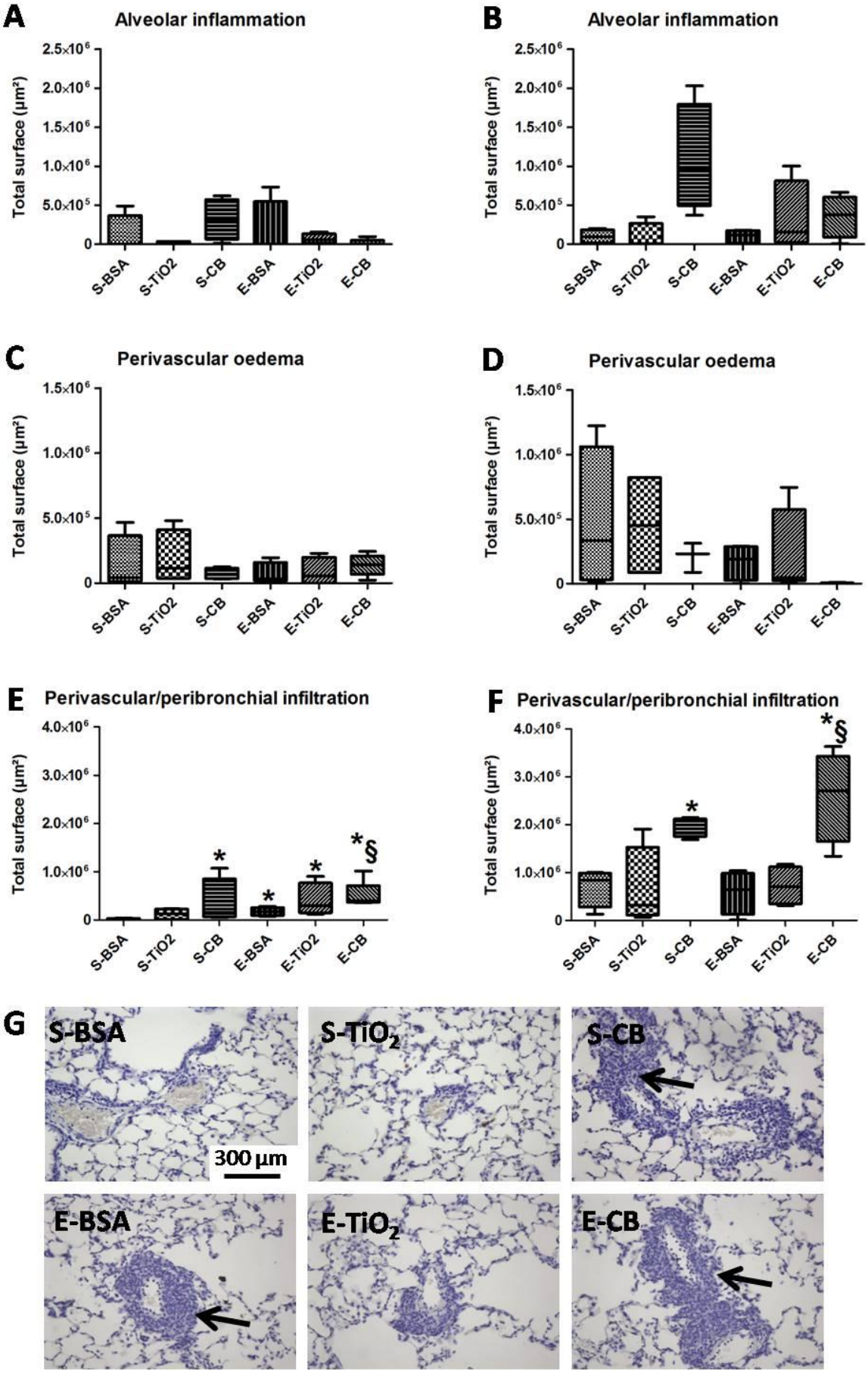

A
Alveolar inflammation
B
Alveolar inflammation
C
Perivascular oedema
D
Perivascular oedema
E
Perivascular/peribronchial infiltration
F
Perivascular/peribronchial infiltration
Total surface (µm²)
S-BSA
S-TiO2
S-CB
E-BSA
E-TiO2
E-CB
G
S-BSA
S-TiO2
S-CB
E-BSA
E-TiO2
E-CB
300 µm

Figure 5

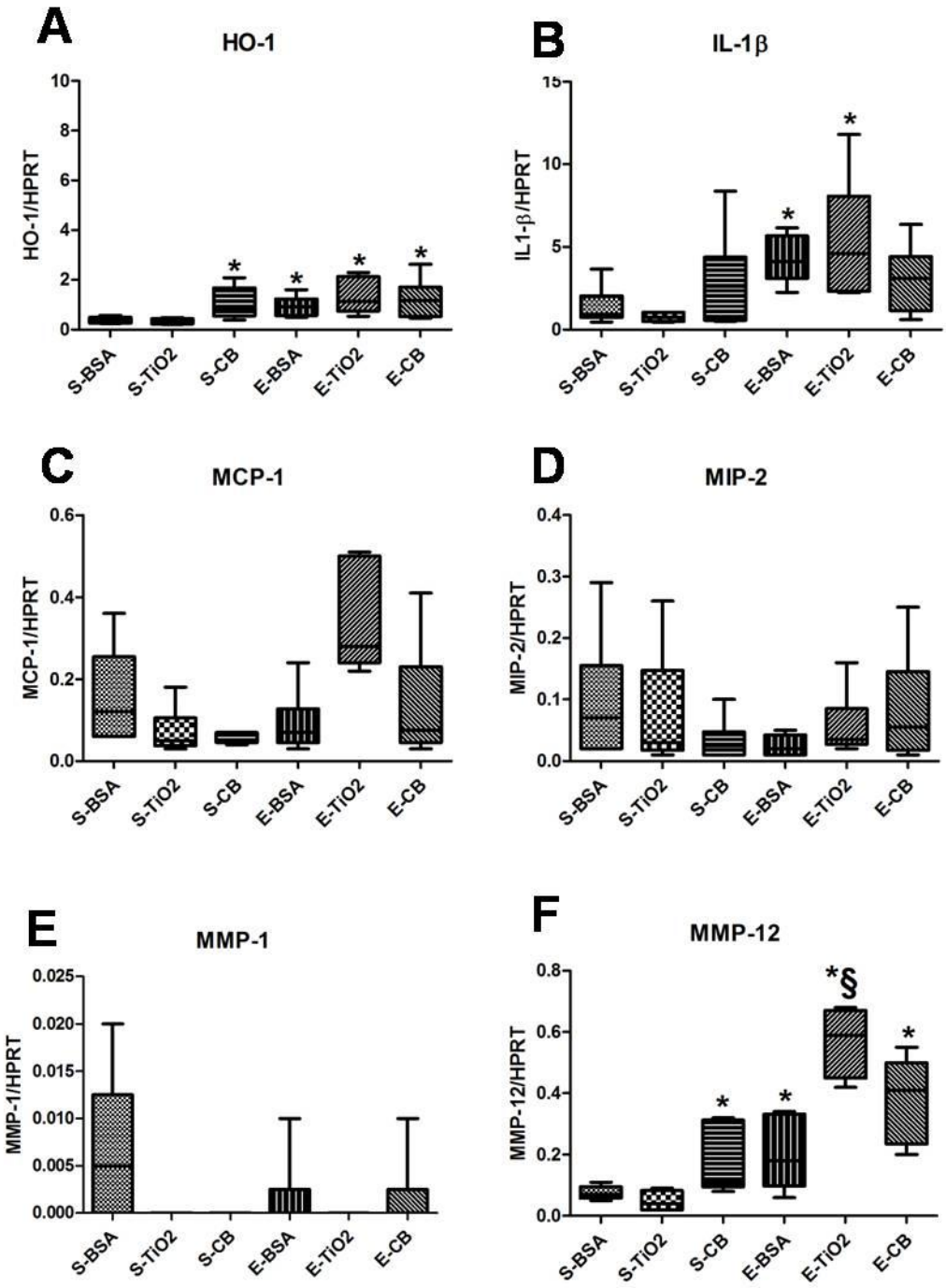
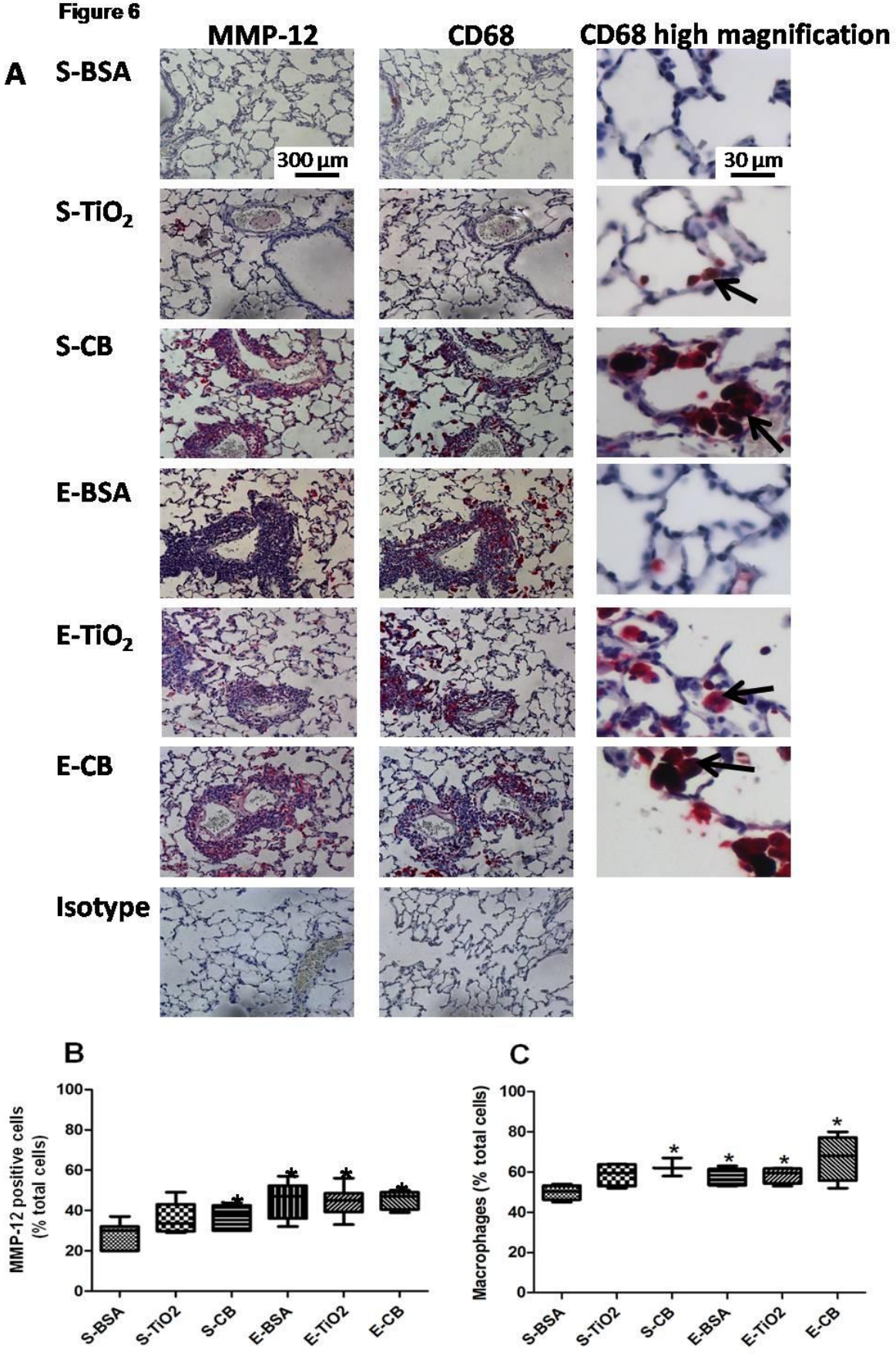

A
HO-1
HO-1/HPRT
B
IL-1β
IL-1β/HPRT
C
MCP-1
MCP-1/HPRT
D
MIP-2
MIP-2/HPRT
E
MMP-1
MMP-1/HPRT
F
MMP-12
MMP-12/HPRT
S-BSA
S-TiO2
S-CB
E-BSA
E-TiO2
E-CB

Figure 6


A
MMP-12
CD68
CD68 high magnification
S-BSA
S-TiO2
S-CB
E-BSA
E-TiO2
E-CB
Isotype
300 µm
30 µm
B
MMP-12 positive cells (% total cells)
C
Macrophages (% total cells)
S-BSA
S-TiO2
S-CB
E-BSA
E-TiO2
E-CB

Discussion

1) Discussion méthodologique

1.1) Modèle in vitro utilisé

Le poumon représente une voie d'entrée particulièrement importante pour les NP [273]. De plus, certaines études suggèrent qu'elles sont capables de traverser l'épithélium alvéolaire pour se retrouver dans l'espace interstitiel [49, 50]. Les cellules de l'espace interstitiel, dont les fibroblastes font partie, sont donc potentiellement amenées à se retrouver en contact avec des NP inhalées.

Les fibroblastes font partie des types cellulaires qui sécrètent la MMP-1, tout comme les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales [10]. Ils jouent un rôle important dans le remodelage matriciel, remodelage auquel contribue grandement la MMP-1 [274]. C'est pourquoi les fibroblastes peuvent représenter un bon modèle *in vitro* pour étudier l'effet des NP sur l'expression de la MMP-1.

La lignée MRC-5, que nous avons utilisée, est une lignée de fibroblastes pulmonaires humains. Il est important de noter qu'il s'agit de fibroblastes fœtaux qui, de par leur origine, pourraient réagir à un stimulus différemment de fibroblastes adultes, car les cellules fœtales peuvent avoir des comportements différents des cellules adultes [275]. De plus, les cellules que nous avons utilisées sont issues d'une lignée cellulaire, et sont donc susceptibles de réagir différemment de fibroblastes primaires du fait du caractère transformé de la lignée, car lignées cellulaires et cellules primaires n'ont pas forcément le même comportement [276]. C'est pourquoi nous avons utilisé des fibroblastes pulmonaires humains primaires pour confirmer certains des résultats obtenus sur les cellules MRC-5. Nous avons observé également une induction de la MMP-1 et une diminution de l'expression de l'α-actine en réponse à l'exposition aux NP de TiO_2, ce qui confirme nos résultats obtenus sur la lignée MRC-5.

1.2) Modèle in vivo utilisé

1.2.1) Modèle d'emphysème

Il existe différents modèles permettant d'induire un emphysème chez l'animal. Bien que le modèle élastase soit l'un des plus utilisés [123], il présente l'inconvénient de ne pas être représentatif des expositions humaines associées au développement de l'emphysème. Un autre modèle très utilisé pour l'induction de l'emphysème est le modèle par exposition à la fumée de cigarette. Il a en effet été démontré comme présentant de nombreuses similitudes avec l'emphysème pulmonaire tel qu'il peut être observé chez l'Homme, en particulier en ce qui

concerne l'élargissement des alvéoles, les mécanismes du développement de l'emphysème et l'inflammation [277]. Il présente toutefois l'inconvénient d'être long à mettre en place, car l'exposition à la fumée de cigarette doit être réalisée pendant plusieurs mois avant d'obtenir des lésions de type emphysème.

Nous avons choisi le rat comme animal d'étude. Il faut rappeler que l'homme et le rat ont des structures pulmonaires différentes [277] et que, de ce fait, le rat n'est pas forcément un modèle représentatif de ce que l'on pourrait observer chez l'Homme. D'un autre côté, les modèles d'animaux qui sont également utilisés dans les modèles d'emphysème, la souris et le hamster, présentent eux aussi des structures pulmonaires différentes de celles de l'Homme [277].

1.2.2) Mode d'exposition aux NP

Nous avons choisi d'exposer les animaux aux NP par instillation intratrachéale. Ainsi qu'il en a été discuté dans le contexte de cette étude, l'instillation intratrachéale, même si elle présente l'inconvénient de ne pas être représentative d'une exposition humaine, permet une exposition rapide et à une dose connue de NP. Une exposition par inhalation à des concentrations connues de NP nécessite, *a contrario*, d'avoir un générateur d'aérosols de nanoparticules maîtrisant parfaitement leurs caractéristiques physicochimiques au cours du temps, qu'il s'agisse de leur taille ou concentration. De tels appareils existent, comme le Characterization of Instruments Measuring Aerosols of Nanoparticles [278] mais sont très peu répandus.

1.3) Doses utilisées

1.3.1) Doses utilisées *in vitro*

La comparaison entre les doses auxquelles sont exposés les animaux dans les modèles *in vivo* et les doses auxquelles sont exposées les cellules dans les modèles *in vitro* est difficile à faire. En effet, pour être en mesure d'estimer la quantité de particules arrivant au contact des cellules du poumon, il faut pouvoir estimer de nombreux paramètres, tels que la quantité de particules atteignant le poumon profond, la clairance de ces mêmes particules, voire, si l'on s'intéresse à un type cellulaire n'étant pas directement au contact de la lumière alvéolaire, la capacité des particules à être transloquées. Or, si ces paramètres sont connus dans certains cas, comme par exemple la proportion de particules atteignant le poumon profond [46] dans le cas de particules sphériques chez l'Homme, ils sont eux-mêmes dépendants de nombreux facteurs, tant au niveau de l'individu exposé (espèce, taille, poids, état de santé, activité…) que de la particule (taille, forme, état d'agrégation…). L'extrapolation des doses d'exposition

des animaux à des NP avec la dose d'exposition des cellules à ces mêmes NP est donc difficile à réaliser.

Il existe plusieurs façons d'exprimer les doses d'exposition aux NP dans les modèles *in vitro*. Une façon est d'exprimer les doses en µg/mL, mais d'autres études expriment également leurs doses en divisant la quantité de NP par la surface qu'occupent les cellules. Ceci permet de comparer les études et les expériences entre elles, car toutes les études ne cultivent pas leurs cellules dans des boîtes de cultures de même surface. De plus, les NP ont tendance à sédimenter une fois dans la boîte de culture, et donc à entrer en contact avec les cellules.
Les doses employées lors des études *in vitro* sur les effets des NP de TiO_2 vont de 0.1 µg/cm² pour l'étude de Simon-Deckers et coll. [71] jusqu'à 1 mg/cm² dans l'étude de Churg et coll. de 1999 [279]. Celles utilisées lors des études sur les effets des NP de NC vont de 3 ng/cm² dans l'étude de Don Porto Carero et coll. [75] à 20 µg/cm² dans l'étude de Mroz et coll. [78]. Cela signifie que les doses utilisées dans la partie *in vitro* de cette étude sont dans la gamme des concentrations utilisées dans les études sur les effets des NP deTiO_2, et que la dose 100 µg/cm² est supérieure aux doses utilisées dans les études sur les effets du NC.

1.3.2) Doses utilisées *in vivo*

La valeur maximale d'exposition par inhalation au TiO_2 recommandée par le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) se situe à 1.5 mg/m^3 pour le TiO_2 micrométrique et à 0.1 mg/m^3 pour le TiO_2, à raison d'une exposition maximale de 10 heures par jour pour une semaine de travail de 40 heures [280]. Il faut cependant noter que le fait d'exprimer cette valeur en masse de particules n'est pas adapté aux NP, en raison de leur très faible masse individuelle.
Les études exposant les animaux à des NP de TiO_2 par inhalation utilisent des doses de NP s'échelonnant entre 0.5 à 10 mg/m^3 dans l'étude de Bermudez et coll. [126] soit des doses supérieures à valeur maximale recommandée par le NIOSH.

Afin de pouvoir rapporter cette valeur limite d'exposition à une dose utilisée lors d'une exposition intratrachéale, il convient de calculer la dose maximale qui peut se déposer dans les poumons d'un travailleur au cours d'une semaine d'exposition, s'il est exposé à la concentration en TiO_2 maximale recommandée par le NIOSH.
En activité, le volume courant (le volume mobilisé à chaque cycle respiratoire) peut aller de 1 L à 2 L. Si l'on considère qu'un individu adulte a 15 cycles respiratoires par minute, on voit

qu'en une heure, un travailleur respire entre 900 et 1800 L d'air, ce qui correspond à 0.9 et 1.8 m^3. En une semaine de travail de 40 heures, un travailleur respire donc entre 36 et 72 m^3 d'air. Si l'air qu'il respire contient 0.1 mg/m^3 de TiO_2, il peut donc se déposer dans ses poumons au maximum entre 3.6 et 7.2 mg de TiO_2.

Dans notre modèle d'instillation intratrachéale, les doses utilisées sont de 0.4 et 2 mg/kg, car elles correspondent à une instillation intratrachéale de 100 et 500 µg de NP pour un rat de 250 grammes environ. L'extrapolation de cette dose à un travailleur de 70 kg conduit à des doses de 28 et 140 mg, soit des doses très supérieures à la dose maximale correspondant à la valeur de 0.1 mg/m^3 recommandée par le NIOSH.
Cependant, seule une faible partie de la dose inhalée se dépose et reste dans le poumon profond [47, 281].
Par exemple, Obserdorster et Yu ont démontré que, si une souris était exposée pendant 24 heures à des NP de 20 nm à une dose de 100 $µg/m^3$ par inhalation, la dose déposée dans ses alvéoles ne serait que de 1.4 µg [281]. Si l'on tient compte de ce paramètre, il est possible que les doses que nous avons utilisées soient proches de la valeur limite recommandée par le NIOSH.

En ce qui concerne le NC, la valeur maximale d'exposition recommandée le NIOSH est de 3.5 mg/m^3 pour une exposition de 8 heures par jour et pour une semaine de travail de 40 heures. Il est à noter que cette valeur s'applique aux particules de NC quelle que soit leur taille, et donc s'applique également aux NP de NC.
En ce qui concerne les études exposant des animaux à des NP de NC par inhalation, l'étude de Jackson et coll. utilisait, dans son modèle d'inhalation des animaux, une concentration de NP de NC de 43 mg/m^3, soit une dose supérieure aux valeurs limites proposées par le NIOSH. C'est également le cas d'une autre étude menée par Niwa et coll., au cours de laquelle les auteurs ont exposé des rats à des NP de NC à une dose de 15 mg/m^3 [282].

En une semaine de travail, un travailleur respirant entre 36 et 72 m^3 d'air, s'il était exposé à cette valeur maximale d'exposition au NC, recevrait au maximum entre 126 et 252 mg dans les poumons. Les doses que nous avons utilisées dans notre étude étaient de 0.4 et 2 mg/kg, ce qui, chez un humain de 70 kg, représenterait une masse de 28 et 140 mg, respectivement. On peut donc dire que la dose faible que nous avons utilisée est inférieure à la valeur maximale recommandée par le NIOSH.

Les doses utilisées dans les études de la littérature utilisant une instillation intratrachéale unique de NP de TiO_2 vont de 0.8 mg/kg d'animal pour l'étude de Hussain et coll. [133] jusqu'à 30 mg/kg dans l'étude de Yazdi et coll. [132]. Pour un travailleur de 70 kg inhalant 10 m^3 par jour, cela correspondrait à des doses de 5.6 jusqu'à 210 mg/m^3. Il est difficile de conclure si toutes correspondent à des valeurs inférieures à la valeur limite de 0.1 mg/m^3 recommandée par le NIOSH, bien qu'il soit possible, en tenant compte de la faible rétention des NP de TiO_2, que cela soit le cas pour les études utilisant les doses les plus faibles.

Les études s'intéressant aux effets du NC utilisent des doses uniques allant de 0.3 mg/kg pour l'étude de Kamata et coll. [141] à 20 mg/kg pour l'étude de Shwe et coll. [135]. Si on extrapole ces valeurs à un humain de 70 kg qui inhalerait une dose équivalente, on arrive à des valeurs de 21 et 1400 mg. L'étude de Kamata et coll. utilise donc une dose de NP inférieure à la valeur maximale recommandée par le NIOSH, ce qui n'est pas le cas de l'étude de Shwe et coll [135].

1.4) Particules utilisées

L'objectif, en utilisant des particules de paramètres physicochimiques différents, était d'observer l'influence de ces paramètres sur les effets biologiques des particules, car, comme on l'a vu dans le contexte de notre travail, il existe plusieurs paramètres physicochimiques capables d'influer sur les effets des NP [1]. Pour cela, le but était d'avoir des particules identiques à l'exception d'un seul paramètre physicochimique.

Nous avons utilisé des NP dont certains paramètres variaient. Ces paramètres sont la taille, la forme, la variété cristalline, et la composition chimique. Pour observer l'influence de la taille, nous avons utilisé 3 particules d'anatase de tailles différentes ; pour observer l'influence de la forme, nous avons utilisé 2 NP composées de TiO_2 seulement sous forme rutile, de forme différentes ; pour observer l'influence de la variété cristalline, nous avons utilisé des NP de dimensions proches, d'anatase, de rutile et d'un mélange d'anatase et de rutile ; pour observer l'influence de la composition chimique, nous avons utilisé des NP de TiO_2 et de NC de dimensions proches.

Pour commencer, les caractéristiques des particules données par les fournisseurs n'étaient pas forcément exactes : ainsi, le Rrond, que nous pensions uniquement constitué de rutile, est en fait, après un nouvel examen réalisé par le fournisseur en 2011, constitué à 80% d'anatase contre 20% seulement de rutile, ce qui rend caduque toute volonté de comparer le Rrond et le

Rbâton en prenant en compte la seule différence de variété cristalline. De plus, un paramètre qui varie beaucoup entre les particules de cette étude est la surface spécifique, laquelle varie de 25 m²/g pour le mélange anatase/rutile à 350 m²/g pour la NP de NC. Or, la surface spécifique est également susceptible de modifier les effets biologiques des NP [47, 146], et peut donc rendre difficile l'observation de l'influence d'autres facteurs sur les effets biologiques des NP. Il est donc difficile d'obtenir des NP se différenciant sur un seul paramètre physicochimique à la fois.

Un autre paramètre capable de moduler les effets des particules est leur état d'agglomération/agrégation [143]. Il existe des agents dispersants permettant de réduire l'état d'agglomération/agrégation des particules, comme l'ASB. Cependant, ces agents sont également susceptibles de modifier les effets des particules [74]. Dans la première étude sur les fibroblastes, nous avons choisi de ne pas utiliser d'agent dispersant. Dans la deuxième étude, cependant, nous avons décidé d'utiliser de l'ASB, ceci afin d'augmenter la quantité de particules susceptibles d'atteindre les poumons des animaux. Il a en effet été démontré que la quantité de particules susceptibles d'atteindre le poumon profond augmentait si le diamètre de celles-ci diminuait [281].

2) Discussion des résultats

Les principaux résultats de ces deux études sont que :

1. ***In vitro* :** les NP de TiO_2 induisent la MMP-1 dans la lignée MRC-5, cette induction faisant en partie intervenir l'IL-1β. De plus, 2 NP de TiO_2, A/R et le Rrond, ainsi que le TiO_2 micrométrique, augmentent l'activité de la MMP-1. Il est observé parallèlement une diminution de l'expression de l'α-actine et du procollagène-1 α1. Ces résultats ne sont pas observés dans le cas d'une exposition aux NP de NC.

2. ***In vivo* :** Les NP de TiO_2 ne provoquent pas d'emphysème et ne modifient pas l'effet de l'élastase chez le rat, après instillation intratrachéale de doses de NP de TiO_2 de 0.1 et 0.5 mg par animal. Les NP de NC ne provoquent pas d'emphysème, l'exposition à ces NP entraîne une inflammation ainsi qu'une augmentation de l'expression de HO-1 et de la MMP-12 ; de plus, les NP de NC aggravent l'inflammation causée par l'instillation d'élastase.

3. On observe un effet de la composition chimique des NP dans les modifications cellulaires et tissulaires observées, car dans les 2 modèles les NP de NC ont des effets différents des NP de TiO_2**.** De plus, dans l'étude *in vitro* on observe un effet de la taille des particules car les particules de TiO_2 micrométriques n'induisent pas la MMP-1 autant que les NP de TiO_2, et cette induction ne semble pas faire intervenir l'IL-1β.

2.1) Effet des NP sur l'expression des MMP

L'étude *in vitro* réalisée sur la lignée MRC-5 ainsi que sur les fibroblastes primaires humains a permis de montrer que les particules de taille micrométrique et les NP de TiO_2 étaient capables d'induire la MMP-1, ce qui n'était pas le cas des NP de NC. A l'heure actuelle, aucune étude n'a évalué l'expression de la MMP-1 en réponse au TiO_2 ; en revanche, dans une étude de Amara et coll., les auteurs ont observé l'expression de la MMP-1 après exposition de NP de NC de 95 nm de diamètre sur des cellules de la lignée A549 à une dose de 10 µg/cm². Les auteurs ont observé que l'exposition des cellules aux NP de NC ne modifiait pas l'expression de la MMP-1 [8], ce qui est en accord avec nos résultats.
Si nous avons observé une augmentation de l'expression de la MMP-1 en réponse à l'exposition des cellules aux NP de TiO_2, il faut cependant rappeler que l'expression de la MMP-1 est régulée à plusieurs niveaux [10] et que le fait d'observer une augmentation de l'expression en ARNm de la MMP-1 ne signifie pas forcément que l'activité de la MMP-1 augmente. Ici, si toutes les NP de TiO_2 induisent l'augmentation de l'expression de la MMP-1, seules 2 d'entre elles, l'A/R et le Rrond, augmentent l'activité de la MMP-1.

Naveau et coll. ont observé qu'une exposition à des NP de maghémite à raison de 1.6 mg/mL sur des fibroblastes gingivaux humains pendant 24 heures avait pour conséquence une augmentation de la sécrétion de la MMP-1, mais aussi de la MMP-2, la MMP-3 et TIMP-2 [283]. L'augmentation de la MMP-1 observée est donc en accord avec les résultats de notre étude *in vitro* ; en revanche, les NP de TiO_2 n'induisent pas la MMP-2 dans notre étude.

Nous avons recherché les mécanismes potentiellement impliqués dans l'induction de la MMP-1 en réponse à l'exposition des fibroblastes aux NP de TiO_2. Nous avons observé que nos particules de TiO_2 n'entraînaient pas la production de ROS. Bien que le stress oxydant ait été démontré comme étant une conséquence de l'exposition aux NP dans plusieurs études [113, 114], plusieurs études ont rapporté que les NP de TiO_2 n'induisaient pas de stress oxydant [73, 143]. Bien que le TGF-β soit connu pour tout à la fois induire l'α-actine et le procollagène-1

α1 tout en réprimant la MMP-1 [164, 175, 179], dans notre modèle les particules et les NP deTiO_2 ne modifient pas l'activation de sa voie de signalisation. Il semble donc peu probable que le TiO_2 induise la MMP-1 en modulant la voie de signalisation du TGF-β. Emmprin est connu pour induire la MMP-1 [163] mais nous n'avons pas observé de modification de l'expression d'Emmprin en réponse à l'exposition aux particules micrométriques et aux NP de TiO_2, aussi semble-t-il peu probable que l'induction de la MMP-1 que nous observons en réponse à l'exposition aux particules micrométriques et aux NP de TiO_2 soit liée à Emmprin.
Nous avons, en revanche, observé une induction de l'IL-1β en réponse à l'exposition aux NP de TiO_2. De plus, nous avons observé que le traitement des cellules par l'IL-1 Ra pouvait diminuer l'induction de la MMP-1 après exposition aux NP d'A/R et de Rbâton, ce qui indique que l'IL-1β pourrait être impliquée dans l'induction de la MMP-1 en réponse à ces NP de TiO_2. Cette induction d'IL-1β en réponse aux NP de TiO_2 a déjà été observée dans d'autres études, lesquelles ont montré que ce phénomène dépendait de l'inflammasome NALP-3 [84, 94]. Cependant, les résultats que nous avons obtenus avec l'IL-1 Ra montrent que d'autres études sont nécessaires pour déterminer l'implication exacte de l'IL-1β dans l'induction de la MMP-1, et que d'autres cytokines sont peut-être également impliquées. Il a été démontré que plusieurs cytokines sont induites en présence de NP de TiO_2, comme le GM-CSF, l'IL-6, l'IL-8 [70, 74]. Comme ces cytokines peuvent induire la MMP-1 [10], leur expression dans notre modèle peut être intéressante à étudier. De plus, l'effet du traitement par l'IL-1Ra sur l'activité de la MMP-1 après exposition des cellules aux NP de TiO_2 n'a pas encore été évalué.
Nous avons observé que l'exposition des cellules MRC-5 à des NP de TiO_2 pouvait conduire à l'induction d'IL-1β, laquelle avait pour conséquence l'induction de la MMP-1. L'IL-1β est une cytokine capable d'induire l'expression d'un grand nombre de gènes [92]. Or, si plusieurs études ont démontré que l'IL-1β était induit en réponse à l'exposition aux NP de TiO_2 [84, 94], en revanche aucune n'a étudié l'effet de cette exposition sur l'expression d'autres gènes induits par l'IL-1β. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer l'expression d'autres gènes qui sont induits par l'IL-1β, en particulier les gènes induits par NF-κB.

L'étude *in vivo* sur les rats n'a pas permis d'observer une induction de la MMP-1 après exposition aux NP de TiO_2, contrairement aux observations faites dans notre modèle *in vitro*. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. En premier lieu, le fait que l'espèce soit différente dans les deux études. La cinétique d'exposition est également différente, puisque les cellules de la lignée MRC-5 et les fibroblastes primaires ont été

exposés jusqu'à 48 heures, alors que les rats ont été exposés aux NP par une instillation intratrachéale unique avec évaluation de l'expression de la MMP-1 à 24 heures puis à 14 jours après l'exposition. La dose utilisée dans les 2 modèles est elle aussi différente. Enfin, il est à noter que la MMP-1 a été, dans le cas du modèle *in vivo*, mesurée dans le poumon total des animaux, et que de ce fait c'est l'expression de la MMP-1 de l'ensemble des types cellulaires composant les poumons des animaux qui a été mesurée. Il est donc possible que les fibroblastes pulmonaires sécrètent plus de MMP-1 en réponse aux NP de TiO_2, mais que cette augmentation ne soit pas détectable à cause de la présence des autres types cellulaires. Des expériences complémentaires sont à réaliser afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, par exemple des expériences d'immunohistochimie en utilisant un anticorps dirigé contre la MMP-1. Dans notre étude *in vitro*, nous avons observé une dissociation entre l'expression de la MMP-1 en termes d'ARNm et d'expression protéique et l'activité de la MMP-1, en réponse à l'exposition des cellules aux NP de TiO_2. En effet, si toutes les NP de TiO_2 induisaient l'expression de la MMP-1, seules 2, l'A/R et le Rrond, conduisent à une augmentation de l'activité de la MMP-1. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons mesuré l'activité de la MMP-1 dans les surnageants des cellules, alors que l'expression en ARNm ainsi que l'expression protéique ont été réalisés sur des lysats cellulaires. Il pourrait donc être intéressant de mesurer l'expression protéique de la MMP-1 dans les surnageants cellulaires.

Différentes études ont évalué l'impact de l'exposition de cellules aux NP de TiO_2 sur l'expression des MMP : Wan et coll [227] ont mesuré l'expression de la MMP-2, la MMP-9, de TIMP-1 et TIMP-2 sur des monocytes humains après exposition à 2 et 5 µg/mL de NP de TiO_2 et de cobalt, sans trouver de modification de l'expression des différents gènes étudiés. Une autre étude, menée par Fujita et coll. [73], a observé que l'exposition de kératinocytes humains à des NP de TiO_2 à des doses de 50 µg/mL avait comme conséquence une induction de l'expression de la MMP-7, de la MMP-9 et de la MMP-10. Bien que certaines études aient, en accord avec nos résultats, observé une induction de MMP en réponse à l'exposition aux NP de TiO_2, cela n'est pas le cas de toutes les études ; il est possible que cela soit dû en partie aux différences entre les modèles d'exposition.

Il a été démontré, dans une étude de Bachoual et coll. [252], que les particules micrométriques de TiO_2 pouvaient induire l'expression de la MMP-12 sur des RAW 267.4. Dans notre modèle *in vivo*, il est apparu que les NP de TiO_2 pouvaient majorer l'effet inducteur de l'expression de la MMP-12 observé après exposition des animaux à l'élastase seule. Toutefois ceci a été constaté seulement pour l'expression en ARNm de la MMP-12, et pas pour l'expression

protéique de cette dernière. L'interprétation de l'effet des NP de TiO_2 sur l'expression de la MMP-12 nécessite d'autres expériences pour mieux comprendre les mécanismes impliqués.

2.2) Effet des NP sur les pathologies associées au remodelage matriciel

A l'heure actuelle, aucune étude n'a été publiée concernant les effets des NP de TiO_2 sur un modèle d'emphysème. Cependant, l'étude de Chen et coll. montre la présence de lésions de type emphysème chez des souris exposées à des NP de TiO_2 [6]. Dans notre étude *in vivo*, nous n'avons pas observé de modification des effets de l'élastase par les NP de TiO_2. Il est cependant à noter qu'il existe des différences entre notre modèle et celui de Chen et coll., en particulier la dose utilisée : les auteurs de l'étude ont utilisé 100 et 500 µg de NP par animal, ce qui correspond à environ 4 et 20 mg/kg pour une souris de 25 grammes. Nous avons utilisé des doses très inférieures (0.2 et 4 mg/kg), et cela peut expliquer les différences observées. De plus, l'espèce animale utilisée dans notre étude n'est pas la même que dans l'étude de Chen et coll., or il a été démontré que les souris présentaient plus de lésions de type emphysème que les rats à la suite d'une exposition à l'élastase [277].

Il a été démontré que les NP de TiO_2 pouvaient être impliquées dans d'autres pathologies comportant un remodelage matriciel. En particulier, Hussain et coll. [133] ont observé les effets d'une administration oropharyngée de 0.8 mg/kg de NP de TiO_2 de 15 nm dans un modèle d'asthme induit par du toluène-2,4-diisocyanate chez la souris. Ils ont observé, 2 jours après l'administration des NP, que l'exposition aux NP de TiO_2 avait pour conséquence une augmentation de l'HRB, un afflux de macrophages et de polynucléaires neutrophiles dans le LBA, ainsi que des lésions histologiques (œdème, lésions épithéliales, inflammation) [133]. Une autre étude, cependant, a porté sur l'effet d'une inhalation à raison de 10 mg/m^3 de 2 types de particules de TiO_2 (1 NP de dimensions 10*40 nm et 1 particule de diamètre inférieur à 5 µm) sur des souris normales ou dans un modèle d'asthme induit par l'OA [138]. Les auteurs ont observé, après 4 semaines d'exposition aux 2 types de particules TiO_2, que les LBA des animaux asthmatiques présentaient moins de leucocytes que leurs pendants non asthmatiques, une diminution de l'HRB, ainsi qu'une diminution de l'expression de presque tous les médiateurs impliqués dans l'inflammation étudiés, à l'exception de CXCL5, lequel était plus exprimé après exposition aux NP de TiO_2. Il semble donc difficile de conclure quant aux éventuels effets modulateurs des NP de TiO_2 sur des pathologies pulmonaires associées au remodelage. Nous n'avons pas observé d'effet modulant des NP de TiO_2 sur le modèle d'emphysème, ce qui est en opposition avec les études de Hussain et coll. [133] et de Rossi et

coll. [138]. Il est à noter que ces deux études concernent des modèles d'asthme, et sont donc difficilement comparables à nos résultats sur le modèle d'emphysème.

Nous avons observé qu'une exposition aux NP de NC seules entraînait l'apparition d'une inflammation périvasculaire/péribronchique, ainsi que l'induction de la MMP-12 et celle de HO-1. De plus, les NP de NC aggravaient l'inflammation observée sur les poumons des rats exposés à l'élastase seule. Cette aggravation des effets de l'élastase est en concordance avec ceux d'une étude de Inoue et coll. [142] : les auteurs ont observé que l'exposition au NC aggravait l'infiltration de neutrophiles dans le LBA des animaux, ainsi que la sécrétion d'IL-1β et de keratinocyte-derived chemoattractant. La dose utilisée dans cette étude était similaire à celle de notre étude (1.6 mg/kg). En revanche, dans l'étude d'Inoue et coll. les NP ont été administrées en même temps que l'élastase, alors que dans notre étude les NP n'ont été administrées qu'à J7. Cette différence de cinétique d'administration des traitements peut expliquer les différences observées entre les résultats des deux études, car il est possible que les NP de NC n'aient pas le même effet sur un modèle d'emphysème s'ils sont administrés en même temps que l'élastase par rapport à un modèle d'emphysème déjà en développement, comme c'était le cas dans notre étude *in vivo*.

Il existe plusieurs mécanismes qui pourraient expliquer les effets des NP de NC. Le premier est le stress oxydant : il a en effet été démontré comme étant impliqué dans le développement de l'emphysème [183]. Nous avons observé que l'exposition des rats aux NP de NC avait comme conséquence l'induction de l'HO-1, laquelle est induite en cas de stress oxydant [284]. De plus, l'exposition au NC est connue comme pouvant induire du stress oxydant, à la fois *in vitro* [79] et *in vivo* [141]. Il faut cependant noter que, dans notre étude *in vitro*, nous n'avons pas observé d'induction de stress oxydant à la suite d'une exposition des cellules MCR-5 aux NP de NC, même si les NP en elles-mêmes étaient capables de produire des ROS. Aussi d'autres expériences sur le modèle *in vivo* sont nécessaires afin de déterminer le rôle exact du stress oxydant dans les effets des NP de NC.

Les NP de NC ont été démontrées comme pouvant entraîner l'induction de l'expression de différentes cytokines proinflammatoires, comme par exemple l'IL-6 ou l'IL-8 [74], lesquelles sont également susceptibles de jouer un rôle dans le développement de l'emphysème [285]. Bien que les résultats du modèle *in vivo* de notre étude aient montré l'absence d'induction de TNF-α après exposition aux NP de NC, il pourrait être intéressant, en mesurant l'expression

de l'IL-6 ou l'IL-8, de voir si l'IL-1β est le seul médiateur impliqué dans les effets des NP de NC observés dans notre étude *in vivo*.

2.3) Effets de la modification des paramètres physicochimiques

Dans ce travail, nous avons cherché à mesurer l'influence de plusieurs paramètres physicochimiques sur les effets biologiques des NP.

2.3.1) Effet de la taille

Les résultats de notre étude *in vitro* sur les cellules de la lignée MRC-5 indiquent que le TiO_2 micrométrique induit l'expression de la MMP-1 de façon moins prononcée que les NP de TiO_2. De plus, cette induction ne fait pas intervenir l'IL-1β alors que c'est le cas avec les NP de TiO_2. Enfin, l'induction de l'activité de la MMP-1 observée après exposition des cellules aux particules de TiO_2 micrométrique est moins importante que celle observée après exposition des cellules à l'A/R et au Rrond. On observe donc une différence dans les effets des particules entre l'échelle nanométrique et l'échelle micrométrique. Un tel résultat a déjà été démontré dans d'autres études [49, 50]. Il est à noter que les particules que nous avons utilisées, bien que de tailles différentes, forment, en solution, des agglomérats/agrégats de taille similaire, et qu'il a déjà été observé que des particules formant des agglomérats/agrégats de taille similaire pouvaient avoir des effets proches, même si les particules qui composaient ces agglomérats n'avaient pas la même taille [143]. La différence avec nos résultats peut s'expliquer par le fait que, bien que les NP de TiO_2 et de NC forment des agglomérats, la surface de ces agglomérats est bien composée d'éléments nanométriques potentiellement capables de réagir, au contact de leur environnement, différemment d'éléments de taille micrométrique.

2.3.2) Effet de la composition chimique

Dans l'étude *in vitro* comme dans l'étude *in vivo*, nous observons des différences marquées entre effets des NP de TiO_2 et effet des NP de NC, y compris lorsque nous comparons les effets des NP de NC à ceux de NP de TiO_2 de dimensions similaires (A15 par exemple) : les NP de TiO_2 induisent l'expression de la MMP-1 alors que ce n'est pas le cas des NP de NC, et l'exposition aux NP de NC entraîne une inflammation périvasculaire/péribronchique, ce qui n'est pas observé après exposition des animaux aux NP de TiO_2. De telles différences ont déjà été observées dans d'autres études, comme celle de Val et coll. [74] dans laquelle les auteurs

ont observé que les NP de TiO_2 et de NC provoquaient de l'apoptose sur des cellules 16HBE avec intervention de mécanismes différents.

2.3.3) Effet des autres facteurs physicochimiques des particules utilisées

De nombreux facteurs physicochimiques autres que la taille, la composition chimique ont été démontrés comme pouvant moduler les effets biologiques des NP, en particulier leur forme [69, 136] et leur variété cristalline [94, 128, 144] ou leur surface spécifique [146]. Dans l'étude *in vitro* que nous avons réalisée, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet clair de ces paramètres physicochimiques. En effet, nous n'avons pas observé d'effet de la surface spécifique, puisque, dans notre étude *in vitro*, les NP de TiO_2 qui induisaient l'expression de la MMP1 via l'IL-1β étaient le mélange anatase/rutile et le rutile bâton. Or le mélange anatase/rutile avait une surface spécifique de 27 et 150 m^2/g, respectivement. L'absence d'effet de la surface spécifique sur les effets biologiques des NP a également été retrouvé dans la littérature : Lanone et coll. [286] ont exposé des cellules des lignées A549 et THP-1 à des NP de surfaces spécifiques variées et n'ont pas observé d'impact de la surface spécifique sur la toxicité des NP.

L'absence d'effet de la forme sur les effets biologiques des particules de TiO_2 a également été observée. En effet, Warheit et coll. [243] ont exposé des rats à des particules de TiO_2 micrométrique de formes différentes, par instillation intratrachéale, à des doses de 1 et 5 mg/kg. Les auteurs n'ont pas observé de différences entre les effets inflammatoires après exposition aux différentes particules.

L'absence d'impact de la forme, la variété cristalline ou la surface spécifique est probablement à mettre en relation avec la difficulté d'utiliser des NP ne variant que d'un seul paramètre physicochimique. D'autres études semblent donc nécessaires afin de déterminer l'influence exacte de chaque paramètre physicochimique dans les effets biologiques des NP.

Conclusion et perspectives

Le but de cette thèse était d'enrichir les connaissances sur les effets biologiques des NP de TiO_2. Pour cela une étude *in vitro* a été réalisée sur un modèle de lignée de fibroblastes pulmonaires humains en mesurant l'expression de la MMP-1 après exposition à des particules de TiO_2 et de NC. De plus, une étude *in vivo* a été réalisée en administrant des NP de TiO_2 et de NC sur un modèle d'emphysème induit par l'élastase chez le rat.
Les principales conclusions et perspectives issues de ce travail sont envisagées dans 3 principaux domaines.

1/ Certaines NP de TiO_2 induisent l'expression de la MMP-1 via l'IL-1β dans le modèle cellulaire employé

Plusieurs points restent encore à éclaircir concernant les mécanismes impliqués dans cette induction.

- Etudier l'influence d'autres cytokines sur l'expression de la MMP-1 en réponse à l'exposition aux NP de TiO_2. Il a en effet été démontré que, si l'utilisation d'IL-1Ra permettait de réduire l'induction de la MMP-1 observée en réponse à l'exposition au mélange anatase/rutile et au rutile bâton, ce n'était pas le cas pour les autres NP de TiO_2, lesquelles induisent elles aussi la MMP-1. Aussi, l'implication d'autres cytokines connues comme induisant la MMP-1 et comme pouvant être induites suite à l'exposition au TiO_2, comme l'IL-8 ou le GM-CSF, est à étudier.

- Etudier les mécanismes impliqués dans la dissociation entre l'expression de la MMP-1 en termes d'ARNm et d'expression protéique et l'activité de la MMP-1 observée, dans le modèle *in vitro*, après exposition des cellules aux NP de TiO_2. Plus précisément, il serait intéressant d'étudier l'influence des différents mécanismes de régulation post-traductionnels de l'activation de la MMP-1.

- Etudier l'expression et l'activité de la MMP-12 dans le modèle de fibroblastes pulmonaires humains. Il a été observé que, chez les rats, l'exposition au NC avait comme conséquence l'induction de la MMP-12. L'expression de cette MMP n'ayant pas été évaluée dans le modèle de fibroblastes pulmonaires humains, il pourrait être intéressant de le faire afin de comparer les effets de l'exposition aux NP dans les deux modèles.

- Etudier l'effet de l'exposition au TiO_2 sur un modèle de coculture fibroblastes/macrophages ou macrophages/cellules épithéliales. Si les fibroblastes sont susceptibles d'être exposés aux NP, ils ne constituent pas le type cellulaire le plus directement exposé : c'est le cas des macrophages ou des cellules épithéliales. Ainsi, il pourrait être intéressant d'exposer des macrophages, aux NP et d'étudier le contenu du surnageant de ces cellules ainsi que les effets de ce surnageant sur les fibroblastes.

2/ Les NP de TiO_2 n'aggravent pas l'emphysème induit par l'élastase dans le modèle d'instillation intratrachéale chez le rat utilisé, les NP de NC entraînent de l'inflammation, l'induction de la MMP-12 et aggravent l'inflammation provoquée par l'élastase

L'exposition des rats aux NP de NC entraîne une inflammation périvasculaire/péribronchique ainsi qu'une expression de la MMP-1, de HO-1 et de l'IL-1β. De plus, les NP de NC aggravent l'inflammation périvasculaire/péribronchique provoquée par l'élastase. Les résultats concernant les NP de NC suggèrent que, bien qu'elles n'aggravent pas l'emphysème aux deux temps de sacrifice étudiés, elles pourraient, en cas d'exposition prolongée, représenter un facteur de risque de survenue de l'emphysème. En revanche, ceci ne semble pas être le cas des NP de TiO_2.

Plusieurs points pourraient être approfondis concernant cette étude.

- Mesurer l'activité de la MMP-12 dans les LBA ou les poumons des animaux exposés aux NP. En effet, l'augmentation de l'expression de la MMP-12 a été observée, mais pas son activité. Ceci permettrait de valider la pertinence physiologique de l'induction de la MMP-12.

- Déterminer les mécanismes impliqués dans l'induction de la MMP-12 observée après exposition aux NP de NC. En effet, le fait que l'expression de HO-1 soit augmentée après exposition aux NP de NC peut signifier une implication du stress oxydant dans l'induction de l'expression de la MMP-12. Ceci pourrait être évalué *in vitro*, sur des cultures primaires de cellules de rat comme des fibroblastes ou des macrophages, qui sécrètent la MMP-12, en exposant les cellules à des NP de TiO_2 ainsi qu'à des inhibiteurs du stress oxydant (NAC).

- Mesurer l'expression et l'activité de la MMP-1 dans les fibroblastes des poumons des rats. En effet, les expériences menées sur le modèle *in vitro* ont permis de démontrer que l'exposition aux NP de TiO_2 conduisait à une induction de l'expression de la MMP-1, ce qui n'a pas été observé dans le poumon total des animaux. Une expérience d'immunohistologie en utilisant un anticorps dirigé contre la MMP-1 et un autre dirigé contre un marqueur des fibroblastes permettrait de voir si la MMP-1 est plus exprimée dans les fibroblastes après exposition au TiO_2 dans le modèle *in vivo*.

3/ La taille et la composition chimique modulent les effets des NP

Dans les deux études, on observe une différence entre les effets des NP de TiO_2 et de NC. De plus, dans l'étude *in vitro*, les particules de TiO_2 micrométriques induisaient des effets différents de ceux des NP de TiO_2. Les autres facteurs étudiés dans l'étude *in vitro*, la forme et la variété cristalline, ne semblent pas moduler les effets des NP de TiO_2.

De façon à affiner les résultats obtenus, l'expérience suivante pourrait être réalisée :

- Obtenir une meilleure dispersion des particules lors de l'étude *in vitro*. Afin d'observer l'effet de la taille des particules indépendamment de leur état d'agglomération/agrégation, et ainsi pouvoir mieux comparer les résultats observés pendant ce travail, l'utilisation d'agents dispersants pourrait être envisagée dans le contexte du modèle *in vitro*.

Ce travail de thèse aura permis de répondre à plusieurs questions concernant les effets biologiques des NP de TiO_2 et de NC. Il aura ainsi été démontré, en particulier, que les deux types de NP sont capables d'induire l'expression de MMP : les NP de TiO_2 peuvent induire l'expression de la MMP-1 et les NP de NC peuvent induire l'expression de la MMP-12. Ce travail suggère donc que l'exposition à des NP de TiO_2 ou de NC est susceptible d'avoir des conséquences en termes de remodelage matriciel, comme le développement de pathologies associées à ce remodelage.

Références bibliographiques

1. Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V: **Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO(2)particulates: the contribution of physicochemical characteristics.** *Part Fibre Toxicol* 2009, **6:**33-60.
2. Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, Zalzal SF, Yi JH, Sam J, Bombonato-Prado KF, Sarkissian A, Perepichka DF, Wuest JD, et al: **Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate.** *Nano Lett* 2009, **9:**659-665.
3. Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, Cooper LF: **Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography.** *Biomaterials* 2008, **29:**3822-3835.
4. Mendonca G, Mendonca DB, Simoes LG, Araujo AL, Leite ER, Duarte WR, Aragao FJ, Cooper LF: **The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression.** *Biomaterials* 2009, **30:**4053-4062.
5. St Pierre CA, Chan M, Iwakura Y, Ayers DC, Kurt-Jones EA, Finberg RW: **Periprosthetic osteolysis: characterizing the innate immune response to titanium wear-particles.** *J Orthop Res* 2010, **28:**1418-1424.
6. Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, Chen JJ, Yang PC: **Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice.** *Faseb J* 2006, **20:**2393-2395.
7. Mercer BA, Kolesnikova N, Sonett J, D'Armiento J: **Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke.** *J Biol Chem* 2004, **279:**17690-17696.
8. Amara N, Bachoual R, Desmard M, Golda S, Guichard C, Lanone S, Aubier M, Ogier-Denis E, Boczkowski J: **Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a NADP(H) oxidase/NOX4 redox-dependent mechanism.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **293:**L170-181.
9. Li J, Ghio AJ, Cho SH, Brinckerhoff CE, Simon SA, Liedtke W: **Diesel exhaust particles activate the matrix-metalloproteinase-1 gene in human bronchial epithelia in a beta-arrestin-dependent manner via activation of RAS.** *Environ Health Perspect* 2009, **117:**400-409.
10. Pardo A, Selman M: **MMP-1: the elder of the family.** *Int J Biochem Cell Biol* 2005, **37:**283-288.
11. Alberts B, Johnson A, Lewis Jea: **The extracellular matrix of the animals.** In *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002: 692-713
12. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B: **Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164:**1665-1668.
13. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B: **Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans.** *Circulation* 2002, **105:**411-414.
14. Witschger O, Fabries JF: **Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé.** *Hygiène et sécurité du travail* 2005, **199 : ND2227**.
15. Haruta A: **When Gold Is Not Noble: Catalysis by Nanoparticles.** *Chem Rec* 2003, **3:**75-87.
16. Grognet J-M: **Nanotechnologies : des sciences de l'information à la pharmacologie.** *Thérapies* 2008, **63:**1-9.
17. Gratzel M: **Photoelectrochemical cells.** *Nature* 2001, **414:**338-344.
18. Chen X, Mao SS: **Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications.** *Chem Rev* 2007, **107:**2891-2959.
19. Demilecamps L, Andre H: **Le projet PICADA.** *Travaux* 2005, **821:**69-73.
20. Sambandan DR, Ratner D: **Sunscreens: an overview and update.** *J Am Acad Dermatol* 2011, **64:**748-758.
21. Fujishima A, Honda K: **Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode.** *Nature* 1972, **238:**37-38.

22. Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR: **Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO2 production as a basis for exposure assessment.** *Environ Sci Technol* 2009, **43:**4227-4233.
23. Wu N, Wang J, Tafen de N, Wang H, Zheng JG, Lewis JP, Liu X, Leonard SS, Manivannan A: **Shape-enhanced photocatalytic activity of single-crystalline anatase TiO(2) (101) nanobelts.** *J Am Chem Soc* 2010, **132:**6679-6685.
24. Diebold U: **The surface science of titanium dioxide.** *Surface Science Reports* 2003, **48:**53-229.
25. Cadek M, Coleman JN, Ryan KP, Nicolosi V, Bister G, Fonseca A, Nagy JB, Szostak K, Beguin F, Blau WJ: **Reinforcement of polymers with carbon nanotubes: The role of nanotube surface area.** *Nano Letters* 2004, **4:**353-356.
26. Kim K-H, Ramaswamy, N.: **Electrochemical surface modification of titanium in dentistry.** *Dental Materials Journal* 2009, **28:**20-36.
27. Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, Klepetsanis P, Livaniou E, Evangelatos G, Ithakissios DS: **Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles.** *Int J Pharm* 2003, **259:**115-127.
28. Patnaik A: **Structure and dynamics in self-organized C60 fullerenes.** *J Nanosci Nanotechnol* 2007, **7:**1111-1150.
29. Lia G, Lva, L., Fanb, H., Mab, J., Lib, Y., Wanb, Y., Zhao, X S: **Effect of the agglomeration of TiO2 nanoparticles on their photocatalytic performance in the aqueous phase.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2010, **348:**342-347.
30. Zhang Y, Kohler N, Zhang M: **Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake.** *Biomaterials* 2002, **23:**1553-1561.
31. Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, Van De Meent D, et al: **Nano-silver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment.** *Nanotoxicology* 2009, **3:**109-138.
32. Volkheimer G: **Passage of Particles through the Wall of the Gastrointestinal Tract.** *Environ Health Perspect* 1974, **9:**215-225.
33. Florence AT: **Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential?** *Drug Discovery Today: Technologies* 2005, **2:**75-81.
34. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT: **Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency.** *J Pharm Pharmacol* 1990, **42:**821-826.
35. Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, et al: **Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration.** *Toxicol Lett* 2007, **168:**176-185.
36. Senzui M, Tamura T, Miura K, Ikarashi Y, Watanabe Y, Fujii M: **Study on penetration of titanium dioxide (TiO(2)) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro.** *J Toxicol Sci* 2010, **35:**107-113.
37. Adachi K, Yamada N, Yamamoto K, Yoshida Y, Yamamoto O: **In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin.** *Nanotoxicology* 2010, **4:**296-306.
38. Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, McNeil SE, et al: **Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO2 particles.** *Toxicol Sci* 2010, **115:**156-166.

39. Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD: **Toxicity and penetration of TiO2 nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure.** *Toxicol Lett* 2009, **191:**1-8.
40. Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W: **Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice.** *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999, **12:**247-256.
41. Burnett ME, Wang SQ: **Current sunscreen controversies: a critical review.** *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2011, **27:**58-67.
42. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC: **Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles.** *Mol Pharm* 2008, **5:**505-515.
43. Fang C, Shi B, Pei YY, Hong MH, Wu J, Chen HZ: **In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor-alpha-loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size.** *Eur J Pharm Sci* 2006, **27:**27-36.
44. Shenoy D, Little S, Langer R, Amiji M: **Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 2. In vivo distribution and tumor localization studies.** *Pharm Res* 2005, **22:**2107-2114.
45. Yamamoto Y, Nagasaki Y, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K: **Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge.** *J Control Release* 2001, **77:**27-38.
46. Witschger O, Fabries JF: **Particules ultra-fines et santé au travail - Sources et caractérisation de l'exposition.** *Hygiène et sécurité du travail* 2005, **199 : ND2228**.
47. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J: **Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.** *Environ Health Perspect* 2005, **113:**823-839.
48. Warheit DB, Overby LH, George G, Brody AR: **Pulmonary macrophages are attracted to inhaled particles through complement activation.** *Exp Lung Res* 1988, **14:**51-66.
49. Ferin J, Oberdorster G, Penney DP: **Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992, **6:**535-542.
50. Renwick LC, Donaldson K, Clouter A: **Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, **172:**119-127.
51. Geiser M, Casaulta M, Kupferschmid B, Schulz H, Semmler-Behnke M, Kreyling W: **The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, **38:**371-376.
52. Brown DM, Kinlock IA, Bangert U, Windle AH, Walter DM, Walker GS, Scotchford CA, Donaldson K, Stone V: **An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis** *Carbon* 2007, **45:**1743-1756.
53. Raffa V, Ciofani C, Nitodas S, Karachalios T, D'Alessandra D, Masini M, Cuschieri A: **Can the properties of carbon nanotubes influence their internalization by living cells?** *Carbon* 2008, **46:**1600-1610.
54. Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C: **Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain.** *Inhal Toxicol* 2004, **16:**437-445.
55. Oberdorster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder AC: **Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice.** *Res Rep Health Eff Inst* 2000**:**5-74; disc 75-86.
56. Mills NL, Amin N, Robinson SD, Anand A, Davies J, Patel D, de la Fuente JM, Cassee FR, Boon NA, Macnee W, et al: **Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans?** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173:**426-431.
57. Elo R, Maatta K, Uksila E, Arstila AU: **Pulmonary deposits of titanium dioxide in man.** *Arch Pathol* 1972, **94:**417-424.

58. Garabrant DH, Fine LJ, Oliver C, Bernstein L, Peters JM: **Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers.** *Scand J Work Environ Health* 1987, **13:**47-51.
59. Siemiatycki J, Dewar R, Nadon L, Gerin M: **Occupational risk factors for bladder cancer: results from a case-control study in Montreal, Quebec, Canada.** *Am J Epidemiol* 1994, **140:**1061-1080.
60. Boffetta P, Gaborieau V, Nadon L, Parent MF, Weiderpass E, Siemiatycki J: **Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal.** *Scand J Work Environ Health* 2001, **27:**227-232.
61. Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK, Blot WJ: **A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States.** *J Occup Environ Med* 2003, **45:**400-409.
62. Ellis ED, Watkins J, Tankersley W, Phillips J, Girardi D: **Mortality among titanium dioxide workers at three DuPont plants.** *J Occup Environ Med* 2010, **52:**303-309.
63. Baan RA: **Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group.** *Inhal Toxicol* 2007, **19 Suppl 1:**213-228.
64. Hodgson JT, Jones RD: **A mortality study of carbon black workers employed at five United Kingdom factories between 1947 and 1980.** *Arch Environ Health* 1985, **40:**261-268.
65. Puntoni R, Ceppi M, Reggiardo G, Merlo F: **Occupational exposure to carbon black and risk of bladder cancer.** *Lancet* 2001, **358:**562.
66. Dell LD, Mundt KA, Luippold RS, Nunes AP, Cohen L, Burch MT, Heidenreich MJ, Bachand AM: **A cohort mortality study of employees in the U.S. carbon black industry.** *J Occup Environ Med* 2006, **48:**1219-1229.
67. Straif K, Keil U, Taeger D, Holthenrich D, Sun Y, Bungers M, Weiland SK: **Exposure to nitrosamines, carbon black, asbestos, and talc and mortality from stomach, lung, and laryngeal cancer in a cohort of rubber workers.** *Am J Epidemiol* 2000, **152:**297-306.
68. Wellmann J, Weiland SK, Neiteler G, Klein G, Straif K: **Cancer mortality in German carbon black workers 1976-98.** *Occup Environ Med* 2006, **63:**513-521.
69. Hamilton RF, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M, Holian A: **Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity.** *Part Fibre Toxicol* 2009, **6:**35-46.
70. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K: **Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells.** *Toxicol Lett* 2008, **180:**222-229.
71. Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carriere M: **In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes.** *Toxicology* 2008, **253:**137-146.
72. Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, Fleury J, Baeza-Squiban A, Marano F, Boland S: **Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells.** *Part Fibre Toxicol* 2010, **7:**10-27.
73. Fujita K, Horie M, Kato H, Endoh S, Suzuki M, Nakamura A, Miyauchi A, Yamamoto K, Kinugasa S, Nishio K, et al: **Effects of ultrafine TiO2 particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: involvement of extracellular matrix and cell adhesion.** *Toxicol Lett* 2009, **191:**109-117.
74. Val S, Hussain S, Boland S, Hamel R, Baeza-Squiban A, Marano F: **Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts.** *Inhal Toxicol* 2009, **21 Suppl 1:**115-122.
75. Don Porto Carero A, Hoet PH, Verschaeve L, Schoeters G, Nemery B: **Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their**

extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* 2001, **37:**155-163.
76. Falck GC, Lindberg HK, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalan J, Savolainen K, Norppa H: **Genotoxic effects of nanosized and fine TiO2.** *Hum Exp Toxicol* 2009, **28:**339-352.
77. Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins RP, Hoffmann E, Dopp E: **Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells.** *Part Fibre Toxicol* 2009, **6:**192-204.
78. Mroz RM, Schins RP, Li H, Drost EM, Macnee W, Donaldson K: **Nanoparticle carbon black driven DNA damage induces growth arrest and AP-1 and NFkappaB DNA binding in lung epithelial A549 cell line.** *J Physiol Pharmacol* 2007, **58 Suppl 5:**461-470.
79. Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, Billon-Galland MA, Fleury-Feith J, Moisan F, Pairon JC, Marano F: **Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount.** *Toxicology* 2009, **260:**142-149.
80. Gibbs-Flournoy EA, Bromberg PA, Hofer TP, Samet JM, Zucker RM: **Darkfield-confocal microscopy detection of nanoscale particle internalization by human lung cells.** *Part Fibre Toxicol* 2011, **8:**2-13.
81. Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Hohr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJ, Schins RP: **Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, **222:**141-151.
82. Thakur SA, Beamer CA, Migliaccio CT, Holian A: **Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation.** *Toxicol Sci* 2009, **108:**462-471.
83. Pan Z, Lee W, Slutsky L, Clark RA, Pernodet N, Rafailovich MH: **Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells.** *Small* 2009, **5:**511-520.
84. Winter M, Beer HD, Hornung V, Kramer U, Schins RP, Forster I: **Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO(2) nanoparticles in murine dendritic cells.** *Nanotoxicology* 2011, **5:**326-340.
85. Saxena RK, Gilmour MI, Hays MD: **Isolation and quantitative estimation of diesel exhaust and carbon black particles ingested by lung epithelial cells and alveolar macrophages in vitro.** *Biotechniques* 2008, **44:**799-805.
86. Nathan C: **Points of control in inflammation.** *Nature* 2002, **420:**846-852.
87. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, Sica A: **Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer.** *Immunobiology* 2009, **214:**761-777.
88. Wang Z, Nakayama T: **Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease.** *Mediators Inflamm* 2010, **2010:**Article ID 535918.
89. Galasko D, Montine TJ: **Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease.** *Biomark Med* 2010, **4:**27-36.
90. Hoffman HM, Wanderer AA: **Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders.** *Curr Allergy Asthma Rep* 2010, **10:**229-235.
91. Ovrevik J, Lag M, Holme JA, Schwarze PE, Refsnes M: **Cytokine and chemokine expression patterns in lung epithelial cells exposed to components characteristic of particulate air pollution.** *Toxicology* 2009, **259:**46-53.
92. Dinarello CA: **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood* 1996, **87:**2095-2147.
93. Arend WP, Palmer G, Gabay C: **IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines.** *Immunol Rev* 2008, **223:**20-38.
94. Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S: **Titanium dioxide induces different levels of IL-1beta production dependent**

on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **392:**160-165.
95. Reisetter AC, Stebounova LV, Baltrusaitis J, Powers L, Gupta A, Grassian VH, Monick MM: **Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles.** *J Biol Chem* 2011, **286:**21844-21852.
96. Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA: **IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes.** *PLoS Pathog* 2010, **6:**e1000661.
97. Baeuerle PA, Baltimore D: **NF-kappa B: ten years after.** *Cell* 1996, **87:**13-20.
98. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** *Chem Biol Interact* 2006, **160:**1-40.
99. Cadenas E, Sies H: **The lag phase.** *Free Radic Res* 1998, **28:**601-609.
100. Decoursey TE, Ligeti E: **Regulation and termination of NADPH oxidase activity.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62:**2173-2193.
101. van der Vliet A: **NADPH oxidases in lung biology and pathology: host defense enzymes, and more.** *Free Radic Biol Med* 2008, **44:**938-955.
102. Halliwell B, Gutteridge J: **Free Radicals in Biology and Medicine.** *Oxford: Clarendon Press* 1989.
103. Siems WG, Grune T, Esterbauer H: **4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine.** *Life Sci* 1995, **57:**785-789.
104. Stadtman ER, Levine RL: **Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins.** *Amino Acids* 2003, **25:**207-218.
105. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A: **Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics.** *Mass Spectrom Rev* 2005, **24:**55-99.
106. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T: **Role of oxidative stress in cardiovascular diseases.** *J Hypertens* 2000, **18:**655-673.
107. Jenner P: **Oxidative stress in Parkinson's disease.** *Ann Neurol* 2003, **53 Suppl 3:**S26-36; discussion S36-28.
108. Sayre LM, Smith MA, Perry G: **Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease.** *Curr Med Chem* 2001, **8:**721-738.
109. Reichard P, Ehrenberg A: **Ribonucleotide reductase--a radical enzyme.** *Science* 1983, **221:**514-519.
110. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN: **Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance.** *Science* 1987, **235:**1043-1046.
111. Maki H, Sekiguchi M: **MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis.** *Nature* 1992, **355:**273-275.
112. Mo JY, Maki H, Sekiguchi M: **Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89:**11021-11025.
113. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE: **Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm.** *Nano Lett* 2006, **6:**1794-1807.
114. Nel A, Xia T, Madler L, Li N: **Toxic potential of materials at the nanolevel.** *Science* 2006, **311:**622-627.
115. Moon C, Park HJ, Choi YH, Park EM, Castranova V, Kang JL: **Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO2) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide.** *J Toxicol Environ Health A* 2010, **73:**396-409.

116. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH: **Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells.** *Chem Res Toxicol* 2008, **21:**1871-1877.
117. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY: **Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells.** *Toxicology* 2005, **213:**66-73.
118. Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B: **Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro.** *Environ Health Perspect* 2007, **115:**1631-1637.
119. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Sakurai M, Shimada A, Yoshikawa T: **Effects of airway exposure to nanoparticles on lung inflammation induced by bacterial endotoxin in mice.** *Environ Health Perspect* 2006, **114:**1325-1330.
120. Sun Y, Oberley LW: **Redox regulation of transcriptional activators.** *Free Radic Biol Med* 1996, **21:**335-348.
121. Sen CK, Packer L: **Antioxidant and redox regulation of gene transcription.** *FASEB J* 1996, **10:**709-720.
122. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonthaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF: **Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10:**201-221.
123. Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB: **Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations.** *Toxicol Sci* 2000, **55:**24-35.
124. Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR, Reed KL: **Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO2 particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity.** *Toxicol Sci* 2005, **88:**514-524.
125. Jackson P, Hougaard KS, Boisen AM, Jacobsen NR, Jensen KA, Moller P, Brunborg G, Gutzkow KB, Andersen O, Loft S, et al: **Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: Effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring.** *Nanotoxicology* 2011, **Epub ahead of print**.
126. Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI: **Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles.** *Toxicol Sci* 2004, **77:**347-357.
127. Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI: **Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles.** *Toxicol Sci* 2002, **70:**86-97.
128. Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM: **Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO2 particles: differential responses related to surface properties.** *Toxicology* 2007, **230:**90-104.
129. Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K: **Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats.** *Inhal Toxicol* 1999, **11:**709-731.
130. Henderson RF: **Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage.** *Environ Health Perspect* 1984, **56:**115-129.
131. Ahn MH, Kang CM, Park CS, Park SJ, Rhim T, Yoon PO, Chang HS, Kim SH, Kyono H, Kim KC: **Titanium dioxide particle-induced goblet cell hyperplasia: association with mast cells and IL-13.** *Respir Res* 2005, **6:**34-43.
132. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J: **Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107:**19449-19454.

133. Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, Martens JA, Dinsdale D, Boland S, Marano F, et al: **Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model.** *Eur Respir J* 2011, **37:**299-309.
134. Chung KF: **Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J Suppl* 2001, **34:**50s-59s.
135. Shwe TT, Yamamoto S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H: **Effect of intratracheal instillation of ultrafine carbon black on proinflammatory cytokine and chemokine release and mRNA expression in lung and lymph nodes of mice.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, **209:**51-61.
136. Teeguarden JG, Webb-Robertson BJ, Waters KM, Murray AR, Kisin ER, Varnum SM, Jacobs JM, Pounds JG, Zanger RC, Shvedova AA: **Comparative proteomics and pulmonary toxicity of instilled single-walled carbon nanotubes, crocidolite asbestos, and ultrafine carbon black in mice.** *Toxicol Sci* 2011, **120:**123-135.
137. Pott F, Roller M: **Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats.** *Eur J Oncol* 2005, **10:**249-281.
138. Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, Nykasenoja H, Wolff H, Savolainen K, Alenius H: **Inhalation exposure to nanosized and fine TiO2 particles inhibits features of allergic asthma in a murine model.** *Part Fibre Toxicol* 2010, **7:**35.
139. Pott F, Dungworth DL, Heinrich U, Muhle H, Kamino K, Germann P-G, Roller M, Rippe RM, Mohr U: **Lung Tumours in Rats after Intratracheal Instillation of Dusts.** *Ann Occup Hyg* 1994, **38:**357-363.
140. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Yoshikawa T: **Effects of nano particles on antigen-related airway inflammation in mice.** *Respir Res* 2005, **6:**106-118.
141. Kamata H, Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Ishii M, Hasegawa N, et al: **Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2011, **236:**315-324.
142. Inoue K, Yanagisawa R, Koike E, Nakamura R, Ichinose T, Tasaka S, Kiyono M, Takano H: **Effects of carbon black nanoparticles on elastase-induced emphysematous lung injury in mice.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011, **108:**234-240.
143. Horie M, Nishio K, Fujita K, Kato H, Endoh S, Suzuki M, Nakamura A, Miyauchi A, Kinugasa S, Yamamoto K, et al: **Cellular responses by stable and uniform ultrafine titanium dioxide particles in culture-medium dispersions when secondary particle size was 100 nm or less.** *Toxicol In Vitro* 2010, **24:**1629-1638.
144. Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL: **Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells.** *Toxicol Sci* 2006, **92:**174-185.
145. Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroeppel A, Karg E, Ritter B, Heyder J, Schulz H: **Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice.** *Environ Health Perspect* 2006, **114:**328-333.
146. Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K: **The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area.** *Occup Environ Med* 2007, **64:**609-615.
147. Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, Vippola M, Jensen KA, Miettinen M, Sirola K, Nykasenoja H, Karisola P, Stjernvall T, et al: **Airway exposure to silica-coated TiO2 nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice.** *Toxicol Sci* 2010, **113:**422-433.

148. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD: **Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases.** *Eur J Pharmacol* 2006, **533:**133-144.
149. Schonherr E, Hausser HJ: **Extracellular matrix and cytokines: a functional unit.** *Dev Immunol* 2000, **7:**89-101.
150. Mott JD, Werb Z: **Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases.** *Curr Opin Cell Biol* 2004, **16:**558-564.
151. Sternlicht MD, Werb Z: **How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001, **17:**463-516.
152. Lagente V, Le Quement C, Boichot E: **Macrophage metalloelastase (MMP-12) as a target for inflammatory respiratory diseases.** *Expert Opin Ther Targets* 2009, **13:**287-295.
153. Garbacki N, Di Valentin E, Piette J, Cataldo D, Crahay C, Colige A: **Matrix metalloproteinase 12 silencing: a therapeutic approach to treat pathological lung tissue remodeling?** *Pulm Pharmacol Ther* 2009, **22:**267-278.
154. Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, Topper JN, Perrella MA, Lee ME: **Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages.** *J Biol Chem* 2000, **275:**25766-25773.
155. Churg A, Wang X, Wang RD, Meixner SC, Pryzdial EL, Wright JL: **Alpha1-antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, **37:**144-151.
156. Fu X, Parks WC, Heinecke JW: **Activation and silencing of matrix metalloproteinases.** *Semin Cell Dev Biol* 2008, **19:**2-13.
157. Raza SL, Nehring LC, Shapiro SD, Cornelius LA: **Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases.** *J Biol Chem* 2000, **275:**41243-41250.
158. Gill SE, Parks WC: **Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40:**1334-1347.
159. Brinckerhoff CE, Matrisian LM: **Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3:**207-214.
160. Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA: **The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases.** *J Biol Chem* 1996, **271:**10079-10086.
161. McCawley LJ, Matrisian LM: **Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!** *Curr Opin Cell Biol* 2001, **13:**534-540.
162. Spinale FG: **Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function.** *Physiol Rev* 2007, **87:**1285-1342.
163. Huet E, Gabison EE, Mourah S, Menashi S: **Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling.** *Connect Tissue Res* 2008, **49:**175-179.
164. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE: **Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1490:**259-268.
165. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO: **Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease.** *FEBS J* 2011, **278:**28-45.
166. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H: **Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin).** *Biochemistry* 1990, **29:**10261-10270.
167. Saari H, Sorsa T, Lindy O, Suomalainen K, Halinen S, Konttinen YT: **Reactive oxygen species as regulators of human neutrophil and fibroblast interstitial collagenases.** *Int J Tissue React* 1992, **14:**113-120.

168. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS: **Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity.** *Nat Rev Immunol* 2004, **4:**617-629.
169. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H: **Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1477:**267-283.
170. Vincenti MP, Brinckerhoff CE: **Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors.** *Arthritis Res* 2002, **4:**157-164.
171. Miura S, Ohno I, Suzuki J, Suzuki K, Okada S, Okuyama A, Nawata J, Ikeda J, Shirato K: **Inhibition of matrix metalloproteinases prevents cardiac hypertrophy induced by beta-adrenergic stimulation in rats.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2003, **42:**174-181.
172. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U: **Interstitial collagenases as markers of tumor progression.** *Clin Cancer Res* 2000, **6:**4823-4830.
173. Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, Lindell KO, Cisneros J, Macdonald SD, Pardo A, et al: **MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis.** *PLoS Med* 2008, **5:**e93.
174. Foronjy RF, Okada Y, Cole R, D'Armiento J: **Progressive adult-onset emphysema in transgenic mice expressing human MMP-1 in the lung.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, **284:**L727-737.
175. Araya J, Nishimura SL: **Fibrogenic reactions in lung disease.** *Annu Rev Pathol* 2010, **5:**77-98.
176. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G: **Wound healing and fibrosis in intestinal disease.** *Gut* 2007, **56:**130-139.
177. Kenyon NJ, Ward RW, McGrew G, Last JA: **TGF-beta1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice.** *Thorax* 2003, **58:**772-777.
178. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL: **TGF-beta 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, **284:**H1612-1617.
179. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A: **Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach.** *J Biol Chem* 2001, **276:**17058-17062.
180. Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang XF, Frangogiannis NG: **Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction.** *Circ Res* 2010, **107:**418-428.
181. Schnaper HW, Hayashida T, Poncelet AC: **It's a Smad world: regulation of TGF-beta signaling in the kidney.** *J Am Soc Nephrol* 2002, **13:**1126-1128.
182. Anto JM, Vermeire P, Vestbo J, Sunyer J: **Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J* 2001, **17:**982-994.
183. Tuder RM, Yoshida T, Arap W, Pasqualini R, Petrache I: **State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective.** *Proc Am Thorac Soc* 2006, **3:**503-510.
184. Abboud RT, Vimalanathan S: **Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2008, **12:**361-367.
185. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD: **Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice.** *Science* 1997, **277:**2002-2004.
186. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW: **Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency.** *Lancet* 1985, **1:**152-154.
187. Pons AR, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Barcelo B, Fuster A, Agusti AG: **Decreased macrophage release of TGF-beta and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J* 2005, **26:**60-66.

188. Brunauer S, Emmet PH, Teller E: **Adsorption of Gases in Multimolecular Layers.** *Journal of the American Chemical Society* 1938, **60:**309-319.
189. Mehnert W, Mader K: **Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications.** *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **47:**165-196.
190. Kaszuba M: **The Measurement of Nanoparticles Using Photon Correlation Spectroscopy and Avalanche Photo Diodes.** *Journal of nanoparticles research* 1999, **1:**405-409.
191. Gilmour PS, Beswick PH, Brown DM, Donaldson K: **Detection of surface free radical activity of respirable industrial fibres using supercoiled phi X174 RF1 plasmid DNA.** *Carcinogenesis* 1995, **16:**2973-2979.
192. Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Bruning T: **Health effects due to endotoxin inhalation (review).** *Arch Toxicol* 2008, **82:**203-210.
193. Akamine A, Raghu G, Narayanan AS: **Human lung fibroblast subpopulations with different C1q binding and functional properties.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992, **6:**382-389.
194. Elgrabli D, Abella-Gallart S, Aguerre-Chariol O, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G: **Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for in vivo and in vitro studies.** *Nanotoxicology* 2007, **1:**266-278.
195. Abramoff MD, Magelhaes, P J, Ram, S J: **Image Processing with ImageJ.** *Biophotonics International* 2004, **11:**36-42.
196. Elekes K, Helyes Z, Kereskai L, Sandor K, Pinter E, Pozsgai G, Tekus V, Banvolgyi A, Nemeth J, Szuts T, et al: **Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse.** *Eur J Pharmacol* 2008, **578:**313-322.
197. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T: **Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography.** *Trends Biotechnol* 2010, **28:**198-206.
198. Dalal S, Imai K, Mercer B, Okada Y, Chada K, D'Armiento J: **A role for collagenase (matrix metalloproteinase-1) in pulmonary emphysema.** *Chest* 2000, **117:**227S-228S.
199. Mercer B, Kolesnikova N, Sonett J, D'Armiento J: **Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke.** *J Biol Chem* 2004, **279:**17690-19696.
200. Amara N, Bachoual R, Desmard M, Golda S, Guichard C, Lanone S, Aubier M, Ogier-Denis E, Boczkowski J: **Diesel Exhaust Particles Induce Matrix Metalloprotease-1 in Human Lung Epithelial Cells Via a Nadp(H) Oxidase/Nox4 Redox-Dependent Mechanism.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **293:**L170-L181.
201. Brenneisen P, Brivaba K, Wlaschek M, Wenk J, Scharffetter-Kochanek K: **Hydrogen peroxide (H_2O_2) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts.** *Free Rad Biol Med* 1997, **22:**515-524.
202. Raymond L, Eck S, Mollmark J, Hays E, Tomek I, Kantor S, Elliott S, Vincenti M: **Interleukin-1 beta induction of matrix metalloproteinase-1 transcription in chondrocytes requires ERK-dependent activation of CCAAT enhancer-binding protein-beta.** *J Cell Physiol* 2006, **207:**683-688.
203. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS: **Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis.** *Am J Pathol* 2009, **175:**3-16.
204. Wilson MS, Wynn TA: **Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation.** *Mucosal Immunol* 2009, **2:**103-121.
205. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C: **Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats.** *J Toxicol Environ Health* 2002, **65:**1531-1543.

206. Kreyling W: **Deposition, retention, and clearance of ultrafine particles.** *BIA-Workshop, Ultrafine Aerosols at Workplaces* 2003.
207. Oberdörster G: **Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology.** *Journal of Internal Medicine* 2010, **267:**89-105.
208. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F: **Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted.** *Physiological Reviews* 2007, **87:**69-98.
209. Lu Y, Wahl LM: **Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes.** *J Immunol* 2005, **175:**5423-5429.
210. Gabison EE, Huet E, Baudouin C, Menashi S: **Direct epithelial-stromal interaction in corneal wound healing: Role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond.** *Progress in Retinal and Eye Research* 2009, **28:**19-33.
211. Kanekura T, Chen X, Kanzaki T: **Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts.** *Int J Cancer* 2002, **99:**520-528.
212. Guarda G, So A: **Regulation of inflammasome activity.** *Immunology* 2010, **130:**329-336.
213. Naveau A, Smirnov P, Ménager C, Gazeau F, Clément O, Lafont A, Gogly B: **Phenotypic Study of Human Gingival Fibroblasts Labeled With Superparamagnetic Anionic Nanoparticles.** *Journal of Periodontology* 2006, **77:**238-247.
214. Kim H, Liu X, Kobayashi T, Kohyama T, Wen FQ, Romberger DJ, Conner H, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W, Rennard SI: **Ultrafine carbon black particles inhibit human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **28:**111-121.
215. Sisco PN, Wilson CG, Mironova E, Baxter SC, Murphy CJ, Goldsmith EC: **The effect of gold nanorods on cell-mediated collagen remodeling.** *Nano Lett* 2008, **8:**3409-3412.
216. Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V, Rafailovich MH: **Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time.** *Nanotoxicology* 2010, **4:**120-137.
217. Pulavendran S, Rose C, Mandal AB: **Hepatocyte growth factor incorporated chitosan nanoparticles augment the differentiation of stem cell into hepatocytes for the recovery of liver cirrhosis in mice.** *J Nanobiotechnology* 2011, **9:**15.
218. Chiquet M, Renedo AS, Huber F, Fluck M: **How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production?** *Matrix Biol* 2003, **22:**73-80.
219. Cherchi C, Chernenko T, Diem M, Gu AZ: **Impact of nano titanium dioxide exposure on cellular structure of Anabaena variabilis and evidence of internalization.** *Environ Toxicol Chem* 2011, **30:**861-869.
220. Churg A, Zay K, Li K: **Mechanisms of mineral dust-induced emphysema.** *Environ Health Perspect* 1997, **105 Suppl 5:**1215-1218.
221. Verrecchia F, Mauviel A: **Transforming growth factor-beta and fibrosis.** *World J Gastroenterol* 2007, **13:**3056-3062.
222. Churg A, Gilks B, Dai J: **Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants.** *Am J Physiol* 1999, **277:**L975-982.
223. Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, Muller J, Fonseca A, Nagy JB, Fubini B: **Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity?** *Free Radic Biol Med* 2006, **40:**1227-1233.
224. Garza KM, Soto KF, Murr LE: **Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials.** *Int J Nanomedicine* 2008, **3:**83-94.

225. Fujita K, Horie M, Kato H, Endoh S, Suzuki M, Nakamura A, Miyauchi A, Yamamoto K, Kinugasa S, Nishio K, et al: **Effects of ultrafine TiO2 particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: Involvement of extracellular matrix and cell adhesion.** *Toxicology Letters* 2009, **191:**109-117.
226. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE: **Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm.** *Nano Lett* 2006, **6:**1794-1807.
227. Wan R, Mo Y, Zhang X, Chien S, Tollerud DJ, Zhang Q: **Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by metal nanoparticles in human monocytes: The role of oxidative stress and protein tyrosine kinase activation.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **233:**276-285.
228. Bhattacharya K, Cramer H, Albrecht C, Schins R, Rahman Q, Zimmermann U, Dopp E: **Vanadium pentoxide-coated ultrafine titanium dioxide particles induce cellular damage and micronucleus formation in V79 cells.** *J Toxicol Environ Health A* 2008, **71:**976-980.
229. Muller L, Riediker M, Wick P, Mohr M, Gehr P, Rothen-Rutishauser B: **Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways.** *J R Soc Interface* 2010, **7 Suppl 1:**S27-40.
230. Yurchenko V, Constant S, Bukrinsky M: **Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins.** *Immunology* 2006, **117:**301-309.
231. Bao W, Min D, Twigg SM, Shackel NA, Warner FJ, Yue DK, McLennan SV: **Monocyte CD147 is induced by advanced glycation end products and high glucose concentration: possible role in diabetic complications.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2010, **299:**C1212-C1219.
232. Braundmeier AG, Nowak RA: **Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer.** *Am J Reprod Immunol* 2006, **56:**201-214.
233. Xiang J, Li C, Dong W, Cao Z, Liu L: **Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and extracellular metalloproteinase inducer in human periodontal ligament cells stimulated with interleukin-1 beta.** *J Periodontal Res* 2009, **44:**784-793.
234. Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T: **Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop.** *J Immunol* 2000, **164:**6174-6179.
235. Park EJ, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K: **Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation.** *Toxicology* 2009, **260:**37-46.
236. Cui Y, Gong X, Duan Y, Li N, Hu R, Liu H, Hong M, Zhou M, Wang L, Wang H, Hong F: **Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles.** *J Hazard Mater*, **183:**874-880.
237. Goncalves DM, Chiasson S, Girard D: **Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO2) nanoparticles.** *Toxicol In Vitro* 2010, **24:**1002-1008.
238. Lardot CG, Huaux FA, Broeckaert FR, Declerck PJ, Delos M, Fubini B, Lison DF: **Role of urokinase in the fibrogenic response of the lung to mineral particles.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **157:**617-628.
239. Brinckerhoff CE, Matrisian LM: **Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3:**207-214.

240. Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V: **Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO(2)particulates: the contribution of physicochemical characteristics.** *Part Fibre Toxicol* 2009, **6:**33.
241. Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E, Case CP: **The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro.** *Biomaterials* 2007, **28:**2946-2958.
242. Soto K, Garza KM, Murr LE: **Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials.** *Acta Biomater* 2007, **3:**351-358.
243. Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL: **Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area.** *Toxicol Sci* 2006, **91:**227-236.
244. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Maréchal E, Boczkowski J, Lacroix G, Hoet PH: **Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines.** *Particle and fibre toxicology* 2009, **6:**14.
245. Tabet L, Bussy C, Setyan A, Simon-Deckers A, Rossi MJ, Boczkowski J, Lanone S: **Coating carbon nanotubes with a polystyrene-based polymer protects against pulmonary toxicity.** *Part Fibre Toxicol* 2011, **8:**3.
246. Chung KF, Adcock IM: **Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction.** *Eur Respir J* 2008, **31:**1334-1356.
247. Mathers CD, Loncar D: **Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030.** *PLoS Med* 2006, **3:**e442.
248. Boczkowski J, Hoet P: **What's new in nanotoxicology? Implications for public health from a brief review of the 2008 literature.** *Nanotoxicology*, **4:**1-14.
249. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J: **Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107:**19449-19454.
250. Churg A, Stevens B, Wright JL: **Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO2 in a tracheal explant system.** *Am J Physiol* 1998, **274:**L81-86.
251. Hext PM: **Current perspectives on particulate induced pulmonary tumours.** *Hum Exp Toxicol* 1994, **13:**700-715.
252. Bachoual R, Boczkowski J, Goven D, Amara N, Tabet L, On D, Lecon-Malas V, Aubier M, Lanone S: **Biological effects of particles from the paris subway system.** *Chem Res Toxicol* 2007, **20:**1426-1433.
253. Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, Fleury J, Baeza-Squiban A, Marano F, Boland S: **Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells.** *Part Fibre Toxicol*, **7:**10.
254. Kamata H, Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Ishii M, Hasegawa N, et al: **Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice.** *Exp Biol Med (Maywood)*, **236:**315-324.
255. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Yoshikawa T: **Effects of nano particles on antigen-related airway inflammation in mice.** *Respir Res* 2005, **6:**106.
256. Mercer RR, Crapo JD: **Structural changes in elastic fibers after pancreatic elastase administration in hamsters.** *J Appl Physiol* 1992, **72:**1473-1479.
257. Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Kamata H, Shinoda H, Hasegawa N, Miyasho T, Satoh M, Takano H, Ishizaka A: **Role of interleukin-6 in elastase-induced lung inflammatory changes in mice.** *Exp Lung Res*, **36:**362-372.
258. Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I: **Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity.** *Nanotoxicology* 2010, **4:**347-363.

259. Boyer L, Plantier L, Dagouassat M, Lanone S, Goven D, Caramelle P, Berrehar F, Kerbrat S, Dinh-Xuan AT, Crestani B, et al: **Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema.** *Lab Invest*, **91:**353-362.
260. Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, Martens JA, Dinsdale D, Boland S, Marano F, et al: **Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model.** *Eur Respir J*, **37:**299-309.
261. Oberdorster G, Ferin J, Lehnert BE: **Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury.** *Environ Health Perspect* 1994, **102 Suppl 5:**173-179.
262. Mo SD, Ching WY: **Electronic and optical properties of three phases of titanium dioxide: Rutile, anatase, and brookite.** *Phys Rev B Condens Matter* 1995, **51:**13023-13032.
263. Guenegou A, Leynaert B, Benessiano J, Pin I, Demoly P, Neukirch F, Boczkowski J, Aubier M: **Association of lung function decline with the heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism in a general population sample. Results from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS), France.** *J Med Genet* 2006, **43:**e43.
264. Almolki A, Guenegou A, Golda S, Boyer L, Benallaoua M, Amara N, Bachoual R, Martin C, Rannou F, Lanone S, et al: **Heme oxygenase-1 prevents airway mucus hypersecretion induced by cigarette smoke in rodents and humans.** *Am J Pathol* 2008, **173:**981-992.
265. Li JJ, Muralikrishnan S, Ng CT, Yung LY, Bay BH: **Nanoparticle-induced pulmonary toxicity.** *Exp Biol Med (Maywood)*, **235:**1025-1033.
266. Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J: **Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO(2) particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results.** *Toxicology* 2009, **264:**110-118.
267. Cobos-Correa A, Trojanek JB, Diemer S, Mall MA, Schultz C: **Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation.** *Nat Chem Biol* 2009, **5:**628-630.
268. Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, Stidley C, Melen E, Soderhall C, Hallberg J, et al: **MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations.** *N Engl J Med* 2009, **361:**2599-2608.
269. Lavigne MC, Eppihimer MJ: **Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **330:**194-203.
270. Inoue K, Yanagisawa R, Koike E, Nakamura R, Ichinose T, Tasaka S, Kiyono M, Takano H: **Effects of carbon black nanoparticles on elastase-induced emphysematous lung injury in mice.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **108:**234-240.
271. Inoue S, Nakamura H, Otake K, Saito H, Terashita K, Sato J, Takeda H, Tomoike H: **Impaired pulmonary inflammatory responses are a prominent feature of streptococcal pneumonia in mice with experimental emphysema.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167:**764-770.
272. Pang B, Hong W, West-Barnette SL, Kock ND, Swords WE: **Diminished ICAM-1 expression and impaired pulmonary clearance of nontypeable Haemophilus influenzae in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease/emphysema.** *Infect Immun* 2008, **76:**4959-4967.
273. Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV: **Nanoparticles - known and unknown health risks.** *J Nanobiotechnology* 2004, **2:**12-27.
274. Woessner JF, Nagase H: *Matrix metalloproteinases and TIMPs.*: New York: Oxford University Press.; 2000.
275. van Vliet P, Smits AM, de Boer TP, Korfage TH, Metz CH, Roccio M, van der Heyden MA, van Veen TA, Sluijter JP, Doevendans PA, Goumans MJ: **Foetal and adult cardiomyocyte progenitor cells have different developmental potential.** *J Cell Mol Med* 2010, **14:**861-870.

276. Lee J, Hwang J, Kim HS, Kim S, Kim YH, Park SY, Kim KS, Ryoo ZY, Chang KT, Lee S: **A comparison of gene expression profiles between primary human AML cells and AML cell line.** *Genes Genet Syst* 2008, **83:**339-345.
277. Wright JL, Cosio M, Churg A: **Animal models of chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, **295:**L1-15.
278. Jacoby J, Bau S, Witschger O: **CAIMAN: a versatile facility to produce aerosols of nanoparticles.** *Journal of Physics : Conference Series* 2011, **304**.
279. Churg A, Gilks B, Dai J: **Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants.** *Am J Physiol* 1999, **277:**975-982.
280. NIOSH: **NIOSH CURRENT INTELLIGENCE BULLETIN: Evaluation of Health Hazard and Recommendations for Occupational Exposure to Titanium Dioxide, Draft.** *Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) publication, Cincinnati* 2005.
281. Oberdorster G, Yu CP: **Lung dosimetry--considerations for noninhalation studies.** *Exp Lung Res* 1999, **25:**1-6.
282. Niwa Y, Hiura Y, Sawamura H, Iwai N: **Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory response in rats.** *Circ J* 2008, **72:**144-149.
283. Naveau A, Smirnov P, Menager C, Gazeau F, Clement O, Lafont A, Gogly B: **Phenotypic study of human gingival fibroblasts labeled with superparamagnetic anionic nanoparticles.** *J Periodontol* 2006, **77:**238-247.
284. Choi AM, Alam J: **Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, **15:**9-19.
285. Kim V, Rogers TJ, Criner GJ: **New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease.** *Proc Am Thorac Soc* 2008, **5:**478-485.
286. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, Lacroix G, Hoet P: **Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines.** *Part Fibre Toxicol* 2009, **6:**14-26.

Annexe

A Comparative Transmission Electron Microscopy Study of Titanium Dioxide and Carbon Black Nanoparticles Uptake in Human Lung Epithelial and Fibroblast Cell Lines

Esther Belade[a,b,c], Lucie Armand[a,b,c], Laurent Martinon[d], Laurence Kheuang[a,b,c], Jocelyne Fleury-Feith[e], Armelle Baeza-Squiban[f], Sophie Lanone[a,b,c], Marie-Annick Billon-Galland[d], Jean-Claude Pairon[a,b,c,g,*], Jorge Boczkowski[a,b,c,g,*]

a: INSERM, U955, Créteil, F-94000, France
b: University Paris Est, Faculté de médecine, Créteil, F-94000, France
c: AP-HP, Hôpital H. Mondor - A. Chenevier, Service hospitalier, Créteil, F-94000, France
d: Laboratoire d'Etude des Particules Inhalées, Department of Paris, 11 rue George Eastman, Paris, F-75013, France
e: Service d'Histologie et Biologie Tumorale, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, Paris, F-75020, France, and University Pierre et Marie Curie, Paris, F-75005, France
f: University Paris Diderot Sorbonne Paris Cité, Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA), Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, CNRS EAC 7059, Paris, F-75013, France
g: Hôpital Intercommunal de Créteil, Service de pneumologie et pathologie professionnelle, Créteil, F-94000, France
* equal contribution
Correspondance:

Esther Belade, PhD student

Unité Inserm 955, Equipe 4

Faculté de Médecine de Créteil

8 rue du Général Sarrail

94000 Créteil

phone: +331 49813606

fax : +331 49813725

mail: esther.belade@inserm.fr (esther.belade@orange.fr)

Abstract

Several studies suggest that the biological responses induced by manufactured nanoparticles (MNPs) may be linked to their accumulation within cells. However, MNP internalisation has not yet been sufficiently characterised. Therefore, the aim of this study was to compare the intracellular uptake of 3 different MNPs: two made of carbon black (CB) and one made of titanium dioxide (TiO_2), in 16HBE bronchial epithelial cells and MRC5 fibroblasts. Transmission electron microscopy was used to evaluate the intracellular accumulation. Different parameters were analysed following a time and dose-relationship: localisation of MNPs in cells, percentage of cells having accumulated MNPs, number of aggregated MNPs

in cells, and the size of MNP aggregates in cells. The results showed that MNPs were widely and rapidly accumulated in 16HBE cells and MRC5 fibroblasts. Moreover, MNPs accumulated chiefly as aggregates in cytosolic vesicles and were absent from the mitochondria or nuclei. CB and TiO_2 MNPs had similar accumulation patterns. However, TiO_2 aggregates had a higher size than CB aggregates. Intracellular MNP accumulation was dissociated from cytotoxicity. These results suggest that cellular uptake of MNPs is a common phenomenon occurring in various cell types.

Keywords: nanotechnologies; nanomaterials; toxicity; lung

1. Introduction

Nanotechnology is an emerging field involving a wide range of technologies that measure, manipulate, or incorporate materials having at least one dimension between 1 and 100 nanometers (ASTM International, 2006). Manufactured nanoparticles (MNPs) are intentionally produced for use in various consumer products or industrial techniques (e.g., as pigments or chemical catalysts). The properties of nanoparticles differ from those of bulk materials of the same compound, allowing them to exert novel physical and chemical functional activities (Lanone et al., 2006, 2009; Oberdörster et al., 2005a).

Although new applications of MNPs are generating considerable enthusiasm, there is increasing evidence that MNP exposure can lead to adverse health effects. The respiratory system is a major route of unintentional exposure to aerosolised MNPs. Moreover, the respiratory system is a potential route for MNP translocation to the systemic circulation. However, MNP translocation studies showed that this was a limited phenomenon, the pulmonary retention being more important (Kreyling et al., 2002). Therefore, MNP toxicological studies have been widely focused on the MNP fate in the pulmonary system. *In vitro* and *in vivo* studies established that MNP exposure can alter cell viability, induce inflammation and pulmonary tissue remodelling, and impair redox regulation (Donaldson et al., 2005; Stone et al., 2007). Furthermore, several studies suggest that the biological responses induced by MNPs may be linked to MNP accumulation within cells (Bartneck et al., 2010; Oh et al., 2010). Indeed, internalised MNPs may directly target organelles such as the mitochondria, leading to oxidative stress (Li et al., 2003; Oberdörster et al., 2005a). Another target of MNPs is the nucleus: thus, MNPs can directly or indirectly induce DNA oxidative damages in the nuclear compartment (Bhattacharya et al., 2009; Mroz et al., 2007; Trouiller et al., 2009). However, MNP internalisation has not yet been sufficiently characterised.

Various techniques have been used to study MNP internalisation. Flow cytometry or confocal microscopy was used in recent studies (Faklaris et al., 2008; Thurn et al., 2010). However, these techniques require MNP labeling or surface modification, which may constitute a major disadvantage given that changes in MNP physical characteristics (size, shape, surface chemistry) can modify the internalisation and/or subcellular localisation of MNPs (Al-Rawi et al., 2011; Gupta et al., 2005; Nativo et al., 2008; Win et al., 2005). Transmission electron microscopy (TEM) is the technique of reference for studying MNP internalisation. With TEM, nano-sized structures can be identified in the cell environment and within cellular organelles (Oberdörster et al., 2005b). However, TEM has rarely been used to

accurately quantify MNP internalisation. TEM evaluation of internalisation is a cumbersome and expensive procedure and requires optimal sample preparation (Schrand et al., 2010). To the best of our knowledge, no comparative TEM studies of the internalisation of various MNPs by various cell types are available. Moreover, the relationship between MNP internalisation and their physico-chemical characteristics has been insufficiently analysed. Therefore, the aim of this study was to use TEM to compare the intracellular uptake of 3 well-characterized MNPs (one made of titanium dioxide and two of carbon black) in 2 different relevant target cells (one representative of the bronchial epithelium, the other of the underlying connective tissue), according to MNP concentration and time of exposure. This comparison was supported by several parameters (localisation of aggregated MNPs in cells, percentage of cells having accumulated MNPs, number of aggregated MNPs in cells, size of MNP aggregates in cells analysed at different time points). Furthermore, we examined the effects of MNPs on cell viability.

We choose titanium dioxide (TiO_2) and carbon black (CB) MNPs because TiO_2 and CB nanoparticles are among the most widely produced nanomaterials (Baan et al., 2006). TiO_2 in particles of supra-nanometer scale has been used commercially for over 100 years as a white pigment in numerous products including paints and other coatings, foods, cosmetics, and skin-care preparations such as topical sunscreens. Several newer technologies use TiO_2 MNPs, for instance for producing paints and sunscreen lotions/sprays. CB MNPs are used chieftly as a pigment in inks and paints and in automobile tires (Donaldson et al., 2005; Ema et al., 2010).

2. Material and methods

2.1. *Cellular models*

MRC5 cells (ATCC CCL-171), a human fibroblast cell line, and the 16HBE14o- bronchial cell line (provided by Dr. D.C. Gruenert; Medical Research Facility, California Pacific Medical Centre, San Francisco, CA, USA) were used in this study. MRC5 cells were derived from normal lung tissue of a 14-week-old male foetus (Jacobs et al., 1970). The 16HBE140- cell line was originally developed from human bronchial epithelium, transformed with SV40 large T-antigen (Cozens et al., 1994). Both cell lines were maintained in a culture medium (DMEM for MRC5 and DMEM/F12 for 16HBE14o-) with L-Glutamine supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) for MRC5 cells, 2% Ultroser G (UG) for 16HBE cells and 1% antibiotics at 37°C in a 5%-CO_2 humidified incubator. These cells were seeded at a density of 1 to 1.6 x 10^4cells.cm^{-2}.

2.2. *Manufactured nanoparticles*

Three types of MNPs were tested: two made of CB (CB21 [P60] and CB13 [FW2] from Evonik/Degussa, Essen, Germany) and one of TiO_2 (637254 from Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The mean aerodynamic diameters reported by the suppliers were 21 and 13 nm for the CB21 and CB13 MNPs, respectively, and 15 nm for TiO_2 MNPs.

Dry powders were used to evaluate the physico-chemical characteristics of MNPs. Specific surface area was measured at -196°C using the nitrogen absorption-desorption technique (Brunauer Emmet Teller method, BET). MNP granulometry and aggregation status were evaluated in particle suspensions using photon correlation spectroscopy (PCS) and zeta potential measurement, respectively (Zetasizer 300HS, Malvern Instruments, Malvern, UK).

Stock suspensions of MNPs were prepared by weighing out the dry powders and then suspending them in serum-free (0%) culture medium to reach the concentration of 2 $mg.ml^{-1}$. The stock suspensions were stored at -20°C. Ten minutes before starting the experiments, we sonicated the defrosted MNP stock suspensions in an ultrasound bath to achieve optimal dispersion. We then diluted the suspensions in serum-free culture medium by successive dilutions. Cells were exposed to MNP concentrations of 0.5, 5 and 10 $\mu g.cm^{-2}$ (of cultured surface) for 6, 24 and 48 hours. Given that cells were cultured in 75 cm^2 flasks containing 15 ml of DMEM, we needed suspensions to be diluted at the doses of 2.5, 25 and 50 $\mu g.ml^{-1}$ (corresponding to 0.5, 5 and 10 $\mu g.cm^{-2}$). To do that, the stock suspensions were first diluted at 1: 4, then a second dilution (1: 10) was made from the new suspension to reach the concentration of 50 $\mu g.ml^{-1}$ (or 10 $\mu g.cm^{-2}$). Finally, the suspensions of 0.5 and 5 $\mu g.cm^{-2}$ (2.5, 25 $\mu g.ml^{-1}$) were done by diluting the 10 $\mu g.cm^{-2}$ MNP suspension.

MNP endotoxin content was measured using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) kit QCL-1000 (Lonza, Basel, Switzerland). Briefly, particles in DMEM were sonicated (as described above), and the particle suspensions were centrifuged for 10 min at 18,000g. The supernatants were collected and centrifuged. This sequence was repeated twice and the endotoxin levels in the supernatants were then determined.

The main physico-chemical characteristics are summarized in Table 1.

2.3. *Cytotoxicity assay*

Cytotoxicity was assessed using the colorimetric WST-1 assay (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), which measures the mitochondrial dehydrogenase activity in viable cells. MRC5 and 16HBE cells were seeded in 96-well microplates at a density of 1.6 x 10^4cells/cm^2 in DMEM containing 10% FBS or 2% UG, then left in the medium for 24h. Shortly before starting the exposures, 10 $\mu g.cm^{-2}$ of each MNP suspension were prepared as described above. However, since surfaces (0.32 cm^2) and volumes (200 µl) in microplate

wells were different from those in flasks, to expose cells to the same MNP concentration, the doses were adapted considering that 10 µg.cm^{-2} corresponded to 16 µg.ml^{-1} of MNPs. After removing DMEM from wells and washing cells with 100µl/well of phosphate buffered saline (PBS), MNP suspensions were distributed in each well. After 24h of contact, MNP suspensions were removed and cells were washed with PBS. Then, cells were incubated with 100 µl/well of WST-1 solution for 2h, at 37°C, in the dark. Two hours later, the cytotoxicity was determined by measuring the absorbance with a scanning multi-well spectrophotometer (Multiskan Ex microplate photometer, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The absorbance directly correlates to the number of viable cells. Three independent experiments were performed with 3 replicate wells used for each condition in each experiment.

2.4. *Transmission electron microscopy*

2.4.1. Cell pellet fixation

Following exposure of cells to MNPs in flasks, attached cells were washed with culture media and fixed *in situ* with 2.5% glutaraldehyde in 0.045M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) at 4°C for 2 hours. The cells were then washed 3 times in sodium cacodylate buffer. Once recovered by de-adhering with scrapers, cell suspensions in 0.045M sodium cacodylate buffer were centrifugated at 1500 rpm for 5-7 min, and the pellets were post-fixed with 2% osmium tetroxide in distilled water for 30 min, at room temperature and in the dark.

2.4.2. Cell pellet embedding

The post-fixed pellets were dehydrated in graded ethanol series before being transferred into Beem capsules filled with epon resin (48.9%), dodecenyl succinic anhydride (17.9%) and nadic methyl anhydride (33.3%). Then, the capsules were incubated at 37°C, in an oven vacuum for 24h, followed by incubation in a 60°C oven for 24h, to complete the embedding.

2.4.3. Sample ultrathin cuts and staining

Ultrathin sections (60 nm thickness) were made with a Leika ultramicrotome and transferred without contrasting onto copper grids, they were observed with an analytical transmission electron microscope (TEM).

2.4.4. TEM evaluation

The microscope used for the study was a JEOL 1200 EX II TEM at 60kV (JEOL, Tokyo, Japan), fitted out with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDS OXFORD LINK ISIS 300 spectrometer) and a digital GATAN camera (ERLANGSHEN ES500W). Observed MNPs were classified as aggregated within cells. We defined an MNP aggregate as a cluster of more than 1 MNP (Hackley, 2001).

Measurements were made on 50 morphologically preserved cells chosen randomly from 5 different grids in each condition. Observations were performed by 2 different observers, between whom agreement was greater than 95%. The following parameters were calculated using the SAISAM software (MicroVision, Evry, France):

1. Cell localisation of MNPs (free in the cytoplasm or in vacuoles, mitochondria, or nuclei)
2. Percentage of cells containing MNPs
3. Mean number of aggregated MNPs in cells (per cell)
4. Mean size of intracellular MNP aggregates (per cell)

4.1. Mean size of each aggregate

4.2. Percentage of cell surface area occupied by MNP aggregates

To improve the accuracy of our estimate of intracellular MNP accumulation, each cell displaying morphological signs of cellular death (cellular membrane disruption, cellular splitting/blebbing) was systematically excluded. Thus, only cells with visible and well preserved cytoplasm, nucleus, and mitochondria were studied. Furthermore, the chemical nature of TiO_2 MNPs was checked using EDX analysis. Aggregated MNPs were classified based on their subcellular localisation (free in cytoplasm or in vacuoles, mitochondria, or nuclei). The time-response relationship was examined after 6, 24 and 48h exposure to 5 $\mu g.cm^{-2}$ and the dose-response relationship was investigated after 24h of contact to 0.5, 5 and 10 $\mu g.cm^{-2}$ of MNPs.

2.5. *Statistical analysis*

Three independent experiments were performed by exposing the cells to the different MNPs at the different doses and during the different time periods. In the TEM studies, we analysed 50 cells of each experiment. We compared MNP accumulation across doses and exposure times using the Chi-2 test and the other parameters using one-way ANOVA. When ANOVA showed statistically significant differences between treatments ($p<0.05$), pairwise comparisons were performed using Tukey's test. The cellular viability data were compared by performing a Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn's test. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). $p<0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Physico-chemical characterisation of MNPs

Table 1 shows the physico-chemical characteristics of the MNPs. The 3 types of MNP had similar sizes and a round-like shape (L'Azou, 2008). Furthermore, CB13 MNPs had a

significantly larger specific surface area than CB21 MNPs. The 3 MNPs shared a tendency to form aggregates of around 1 µm in the culture media, the CB21 aggregates being significantly larger than the TiO_2 aggregates. No endotoxin contamination was detected in any of the three MNP samples.

3.2. Cell localisation of MNP

Figures 1 and 2 show typical TEM images of MRC5 and 16HBE cells exposed to 5 $\mu g.cm^{-2}$ of CB13, CB21 or TiO_2 MNP for 6 hours. The results of MRC5 exposure to 5 $\mu g.cm^{-2}$ of MNPs are shown in figure 1. Panel A illustrates the CB13 MNP distribution in a MRC5 cell. CB13 MNPs were found as aggregates in the cytosol, usually in vesicle-like compartments and in rare instances free in the cytoplasm, being impossible to quantify such rare events. No particles were seen in the mitochondria, nuclei, or other organelles. Panels B and C of figure 1 show CB21 and TiO_2 MNP accumulation in the MRC5 cell line. Both MNP types were also found as aggregates in cytosolic vesicles. Panels A, B and C of figure 2 display the distributions of the 3 MNPs in 16HBE bronchial cells. As previously described in MRC5 cells, each MNP type was usually seen as aggregates in cytoplasmic vesicles and less often visualised free in the cytosol. Again, no MNPs were found in mitochondria or nuclei.

3.3. Percentage of cells containing MNPs

Figure 3 shows the percentages of the 2 cell lines containing the three MNPs.

<u>Time-response relationship</u>

About 60% of MRC5 cells contained CB13 MNPs after 6h (Fig. 3A). This percentage increased to nearly 80% after 24h ($p<0.05$ vs. 6h) then remained stable until 48h. Moreover, the percentage of cells containing TiO_2 and CB21 MNPs also increased significantly over time.

Almost 95% of 16HBE cells accumulated CB13 MNPs after 6h and this value did not change over 24 and 48h (Fig. 3B). An absence of time-response effect was also observed with TiO_2 MNPs. Moreover, the percentage of cells containing MNPs after 6h was significantly lower with TiO_2 and CB21 MNPs than with CB13 MNPs ($p<0.05$).

Finally, with 16HBE cells, the percentage of cells containing CB13 and CB21 MNPs at 6h was significantly higher than MRC5 cells ($p<0.05$).

<u>Dose response relationship</u>

About 60% of MRC5 cells contained CB13 MNPs after exposure to 0.5 $\mu g.cm^{-2}$ (Fig. 3C). This percentage increased to near 80% when cells were exposed to 5 $\mu g.cm^{-2}$ ($p<0.05$ vs. 0.5 $\mu g.cm^{-2}$) and no further increase was observed after exposure to 10 $\mu g.cm^{-2}$. Similar results were obtained with CB21 MNPs. A slightly different response was observed after

exposure to TiO_2 MNPs, since the percentage increased significantly after exposure to 5 $\mu g.cm^{-2}$ compared to 0.5 $\mu g.cm^{-2}$ and then decreased when a dose of 10 $\mu g.cm^{-2}$ was used.

Almost 80% of 16HBE cells accumulated CB13 MNPs after exposure to 0.5 $\mu g.cm^{-2}$ and this value did not change when doses of 5 and 10 $\mu g.cm^{-2}$ were used (Fig. 3D). A similar response was observed with TiO_2 MNPs. However, with CB21 MNPs, the percentage of cells containing MNPs increased dose-dependently between 5 and 10 $\mu g.cm^{-2}$ ($p<0.05$ in both cases). Moreover, the percentage of cells containing MNPs after exposure to 0.5 $\mu g.cm^{-2}$ was significantly lower with TiO_2 and CB21 MNPs than with CB13 MNPs ($p<0.05$).

No significant difference in the dose-response effect was found between the 2 cell lines, except for CB13 accumulation that seemed to occur in more 16HBE cells with the lowest dose.

Overall, these results show time- and dose-dependent modulations in the percentage of MRC5 cells containing the three MNPs. These modifications were not found consistently with 16HBE cells.

3.4. Mean number of aggregated MNPs in cells

Figure 4 shows the average number of aggregated MNPs observed in both cell lines. Indeed, as accumulated MNPs were found chiefly as aggregates in both cell types, we therefore counted only MNP aggregates.

Time-response relationship

With MRC5 cells, we found a time-dependent increase in the number of CB13 MNP aggregates but not in the number of CB21 and TiO_2 MNPs (Fig. 4A). By contrast, a time-dependent modification in the number CB21 and TiO_2 MNPs aggregates was observed in 16HBE cells (Fig. 4B). In neither cell type were there any major differences across the 3 MNP types. Finally, differences were found between the MNP aggregate numbers in 16HBE and MRC5 cells after 6h but not after 24h or 48h.

Dose response relationship

A dose-response effect was observed for the 3 MNPs in MRC5 cells (Fig. 4C). With 16HBE cells, a dose-response effect was noted only with TiO_2 MNPs (Fig. 4D). Finally, 16HBE cells contained larger aggregate numbers of CB13 and CB21 MNPs at 0.5 $\mu g.cm^{-2}$ than did MRC5 cells ($p<0.05$).

3.5. Mean size of intracellular MNP aggregates

3.5.1. Mean size of individual aggregates (Fig. 5).

Figure 5 shows the mean size of individual MNP aggregates observed in both cell lines. As we performed these observations by TEM, a two-dimensional technique, the aggregate size was expressed as a surface (µm²).

Time-response relationship

In MRC5 cells, the mean size of individual CB13 and CB21 MNP aggregates increased transiently at 24h (Fig. 5A). After 6h, the mean size was significantly greater for TiO_2 MNP aggregates than for CB13 and CB21 MNP aggregates (6 fold increase, $p<0.05$ for both comparisons) and did not change significantly over time. A similar general pattern was observed in 16HBE cells (Fig. 5B) except that the transient increase was noted only with TiO_2 MNPs. No major differences were found between the 2 cell lines.

Dose response relationship

The size of MNP aggregates showed no major dose-dependency with either cell line (Fig. 5C and 5D). In both cell lines, the size with exposure to 0.5 µg.cm^{-2} was higher with TiO_2 MNPs than with the other 2 MNPs ($p<0.05$ for both comparisons). The size was greater in 16HBE cells than in MRC5 cells.

3.5.2. Percentage of cell surface area occupied by MNP aggregates (Fig. 6).

As compared to the size of individuals MNP aggregates, similar time- and dose-dependencies of aggregate size were obtained when the results were expressed as the percentage of the cell surface area occupied by MNP aggregates on TEM sections (Fig. 6).

3.6. Cytotoxicity of MNPs in MRC5 and 16HBE cell lines

Figure 7 shows the percentage of viable MRC5 and 16HBE cells after 24h exposure to each MNP in a dose of 10 µg.cm^{-2}.

After 24h of exposure to 10 µg.cm^{-2} of CB13 MNPs, the percentage of viable MRC5 cells decreased significantly to about 30%. No changes in 16HBE cell viability were noted under the same conditions. Furthermore, the viability of MRC5 and 16HBE cells did not change after exposure to CB21 and TiO_2 MNPs.

4. Discussion

The main results of our study are as follows: *1)* MNP accumulation occurred in a high percentage of cells overall (60-80%), was close to the peak value after only 6h, and occurred even with the lowest dose of 0.5 µg.cm^{-2}; *2)* MNPs accumulated chiefly as aggregates in cytosolic vesicles, and the number of aggregates increased over time or with the dose, except with CB MNPs in 16HBE cells whose aggregate number was at the peak after 6h (CB13) or with the lowest dose studied (CB13 and CB21); and *3)* with the shortest exposures and lowest doses, the size was higher overall for TiO_2 MNP aggregates than for the 2 CB MNP

aggregates. Although several statistically significant differences between the 2 cell lines were found, these differences were quantitatively minor, indicating that the behaviour of the 2 cell lines was similar overall after exposure to all 3 MNP types. Thus, intracellular MNP accumulation seems to be a common and rapid phenomenon that occurs in both epithelial and mesenchymal cells. However, the chemical nature of the MNPs influences intracellular accumulation. Thus, compared to the 2 CB MNP types, TiO_2 MNPs had a larger mean aggregate size within cells and a smaller specific surface area and aggregate size in the culture media (Table 1). Finally, MNP accumulation was dissociated from cellular toxicity. Indeed, CB13 was the only cytotoxic MNP type, and this cytotoxicity occurred only with the MRC5 cells.

The first aim of the study was to compare MNP accumulation in different cell types. Since the respiratory system is a major route of MNP entry into the body, we used 16HBE and MRC5 cells as models of the bronchial epithelium and subjacent connective tissue, respectively. It is reasonable to use TEM to confirm cellular uptake of MNPs, TEM being a good qualitative method to analyse particle uptake. However, because any TEM picture is only reflecting one plane of cells, this technique is considered at most as a semiquantitative method to determine the MNP distribution in a whole cell. Therefore, to obtain reproducible and representative results, 50 cells on several different fields were observed and each entire cell was examined. In both cell types, MNPs accumulated rapidly, in more than half the cultured cells, but occupied a small percentage of the cell surface area (between 0.04 and 4%). Furthermore, in both cell types, invaginations of the plasmic membrane were observed and MNPs were found chiefly as aggregates located in cytosolic vesicles. These observations suggest an endocytosis-mediated mechanism of internalisation, as described previously (Faklaris et al., 2009; Saxena et al., 2008; Singh et al., 2007; Stearns et al., 2001; Thurn et al., 2010). In these studies, various endocytic pathways have been suspected to be involved in MNP accumulation (e.g., macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, or caveolae-mediated endocytosis). The results showed that macropinocytosis seemed to be the principal mechanism of MNP uptake. Our observations are in agreement with these results. Indeed, membrane invaginations and cytoplasmic vesicles are signs of an endocytic mechanism. Moreover, Hussain and coworkers showed that macropynocitosis was involved in 16HBE internalisation of the same CB MNP than those used in the present study (Hussain et al., 2009). We did not find MNPs in the mitochondria or nuclei, in agreement with studies by Xia et al. (2006) and Bhattacharya et al. (2009). However, in other studies that used primary human monocyte macrophages or mesenchymal stem cells, MNPs were found in these

compartments (Hackenberg et al., 2011; Porter et al., 2006), suggesting that the site of accumulation may depend on the MNP type and/or cell type. Overall, the data reported here suggest that MNPs may accumulate similarly in lung epithelial cells and fibroblasts.

We evaluated the influence of MNP physico-chemical characteristics on intracellular accumulation. We focused on MNP with a narrow range of diameters (13-21 nm), but differences in chemical composition (TiO_2 *vs*. CB), and specific surface area (CB13 *vs*. CB21). Both TiO_2 and CB MNPs accumulated rapidly, in keeping with earlier studies in several lung models showing accumulation after only 6h (Geiser et al., 2005; Stearns et al., 2001). For example, a flow cytometry study reported in 2011 showed that internalisation of SiO_2 MNPs measuring 50 to 300 nm by the alveolar epithelial cell line A549 cells occurred chiefly within the first 2 hours and reached a plateau after 6 hours (Shapero et al., 2011). The percentage of cells containing MNPs was similar with the 3 MNP types, all of which were visible as aggregates surrounded by a membrane, and, rarely, as isolated particles. Aggregates may reflect internalisation of isolated MNPs and/or of MNP aggregates. The granulometric evaluation of MNPs in the culture media strongly supports the second possibility, since all 3 MNP types were detected as aggregates measuring about 1 µm in diameter. Furthermore, it has been shown that non-phagocytic cells internalise MNP aggregates more easily than isolated MNPs (Andersson et al., 2011; Hackenberg et al., 2011). Therefore, the cells probably internalised the MNPs chiefly as aggregates. The mean size of MNP aggregate within cells, as determined using TEM to evaluate sections, seemed to be smaller (about 0.1µm²) than the mean diameter of aggregates in culture medium, as determined using PCS. If the particles have a round-like shape, then the aggregate size in the culture medium should be greater than 0.8µm², and MRC5 and 16HBE cells may unable to internalize the largest aggregates. However, these considerations must be viewed with caution because we compared a measured aggregate size within cells (obtained using TEM) to a calculated aggregate size in the culture medium. Overall, our results suggest that the chemical nature and specific surface area of the 3 MNPs influenced neither the kinetics of MNP internalisation nor the percentage of cells containing accumulated MNPs. Furthermore, all 3 MNP were found as aggregates within cells.

Internalised TiO_2 MNPs behaved differently from accumulated CB MNPs. Thus, the size of intracellular TiO_2 MNP aggregates was higher overall than that of the CB MNP aggregates. This different was seen with both cell types, starting at 6h and with the lowest dosages. This result suggests that TiO_2 MNPs may penetrate the cell and accumulate in a single vesicle that is constantly full. Pan et al. (2009) obtained similar results using primary

dermal fibroblasts incubated with rutile TiO_2 MNPs. However, they also observed that anatase particles produced huge holes in the cell cytoplasm, a finding not replicated in our study. MNP size was similar in the study by Pan et al. (2009) and in our study, but the discrepancy may be related to other differences in the experimental conditions (e.g., presence *vs*. absence of serum in the culture media with the MNPs and primary *vs.* fibroblastic cell line). Since the 3 MNPs used in our study were closely similar in size and shape, these 2 parameters were probably not involved in the difference between TiO_2 and CB MNPs. A role for the specific surface area of the MNPs (Hsiao et al., 2011; Yue et al., 2010) is unlikely since this parameter was similar for the TiO_2 and CB21 MNPs. Furthermore, specific surface area was greater for the CB13 MNPs than for the CB21 MNPs, whereas the size of the intracellular aggregates was similar for these 2 MNPs. The chemical nature of the MNPs may affect the capacity for aggregation, leading to differences in intracellular behaviour. There is evidence that TiO_2 MNPs form aggregates easily and rapidly in (hydrophilic) polar environments such as culture media (Geiser et al., 2005). The zeta potential data showing that TiO_2 MNPs in DMEM had the lowest aggregation capacity and the smaller size of the TiO_2 MNP aggregates compared to the CB21 MNP aggregates argue against this possibility. However, we cannot exclude a high capacity for aggregation in the intracellular environment, which differs from DMEM. Another possibility is disaggregation of CB MNPs within cells, leading to a smaller size compared to TiO_2 MNP aggregates. Although data supporting this hypothesis was observed in MRC5 cells between 24 and 48h (fig. 5A), a similar phenomenon was observed concerning TiO_2 aggregates, thus ruling out this hypothesis. Further work is needed to explain the difference in aggregate size between TiO_2 MNPs and CB MNPs.

We evaluated MNP cytotoxicity by performing the WST-1 assay on MNP-exposed cells. Of the 3 MNP types, only CB13 induced a decrease in MRC5 cellular viability. None of the 3 MNP types affected the viability of 16HBE cells. These results suggest that *1)* internalised MNPs do not always exert cytotoxic effects such as those described in murine macrophages exposed to gold nanoparticles (Zhang et al., 2010), and that *2)* the biological responses induced by MNP depend on the cell type. Inversely, we demonstrated previously that carbon nanotubes induced cytotoxicity in epithelial cells in the absence of internalisation (Tabet et al., 2009). The relationship between intracellular accumulation and cellular responses such as inflammation remains to be investigated. Another remarkable fact is that CB13 MNPs, the only cytotoxic particles in our study, also had the highest specific surface area. This parameter seems to play a crucial role in the biological effects of CB13 MNPs. *In vivo* and *in vitro* biological responses such as oxidative stress or inflammation correlate

closely with the specific surface area of particles such as CB or silica (Brown et al., 2001; Hussain et al., 2009; Stoeger et al., 2006; Waters et al., 2009). However, this parameter was unrelated to accumulation in our study, emphasising the complexity of MNP effects on cells.

5. Conclusion

In conclusion, we showed that MNPs were widely and rapidly internalised by bronchial cells and pulmonary fibroblasts. In both cell types, MNPs accumulated as aggregates in cytosolic vesicles and were absent from the mitochondria or nuclei. MNP accumulation was rapid, and dependent on exposure time or concentration. Overall, CB and TiO_2 MNP had similar accumulation patterns, although TiO_2 aggregates had a higher size than CB aggregates. Intracellular MNP accumulation was dissociated from cytotoxicity. These results shed new light on the interactions between MNPs and cells and indicate that internalisation is a relatively stereotyped cellular response to MNP exposure, at least in non-phagocytic cells.

Conflict of Interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the “Agence Nationale de la Recherche France” (Nanotox project, ANR N° 05979-5 SET 024-01), by the Department of Paris**,** by the “Agence nationale de sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail” for a PhD grant and funding of Esther Belade, and by the “ABIES” PhD program for a PhD grant of Lucie Armand.

References

Al-Rawi M., Diabaté S., Weiss C., 2011. Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO(2) particles in HeLa cells. Arch Toxicol.

Andersson P.O., Lejon C., Ekstrand-Hammarström B., Akfur C., Ahlinder L., Bucht A., Osterlund L., 2011. Polymorph- and Size-Dependent Uptake and Toxicity of TiO(2) Nanoparticles in Living Lung Epithelial Cells. Small. 7, 514-23.

AshaRani P.V., Low Kah Mun G., Hande M.P., Valiyaveettil S., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano. 3, 279-90.

Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Cogliano V., WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, 2006. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. Lancet Oncol. 7, 295-6.

Bartneck M., Keul H.A., Singh S., Czaja K., Bornemann J., Bockstaller M., Moeller M., Zwadlo-Klarwasser G., Groll J., 2010. Rapid uptake of gold nanorods by primary human blood phagocytes and immunomodulatory effects of surface chemistry. ACS Nano. 4, 3073-86.

Bhattacharya K., Davoren M., Boertz J., Schins R.P., Hoffmann E., Dopp E., 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. Part Fibre Toxicol. 6, 17.

Boczkowski J., Lanone S., 2007. Potential uses of carbon nanotubes in the medical field: how worried should patients be? Nanomedicine (Lond).2, 407-10.
Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K., 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. Toxicol Appl Pharmacol. 175, 191-9.
Churg A., Stevens B., Wright J.L., 1998. Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO_2 in a tracheal explant system. Am J Physiol. 274, L81-6.
Conner S.D., Schmid S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 422, 37-44.
Cozens A.L., Yezzi M.J., Kunzelmann K., Ohrui T., Chin L., Eng K., Finkbeiner W.E., Widdicombe J.H., Gruenert D.C., 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 10, 38-47.
Dombu C.Y., Kroubi M., Zibouche R., Matran R., Betbeder D., 2010. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. Nanotechnology. 21, 355102.
Donaldson K., Tran L., Jimenez L.A., Duffin R., Newby D.E., Mills N., MacNee W., Stone V., 2005. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. Part Fibre Toxicol. 2, 10.
Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J., 2010. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. Reprod Toxicol. 30, 343-52.
Faklaris O., Garrot D., Joshi V., Druon F., Boudou J.P., Sauvage T., Georges P., Curmi P.A., Treussart F., 2008. Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalisation pathway. Small. 4, 2236-9.
Faklaris O., Joshi V., Irinopoulou T., Tauc P., Sennour M., Girard H., Gesset C., Arnault J.C., Thorel A., Boudou J.P., Curmi P.A., Treussart F., 2009. Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: study of the uptake mechanism in mammalian cells. ACS Nano. 3, 3955-62.
Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Im Hof V., Heyder J., Gehr P., 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. Environ Health Perspect. 113, 1555-60.
Geiser M., Casaulta M., Kupferschmid B., Schulz H., Semmler-Behnke M., Kreyling W., 2008. The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. Am J Respir Cell Mol Biol. 38, 371-6.
Geiser M., Kreyling W., 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. Part Fibre Toxicol. 7, 2.
Gupta A.K., Gupta M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. 26, 3995-4021.
Gupta A.K., Gupta M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. 26, 3995-4021.
Hackenberg S., Scherzed A., Kessler M., Hummel S., Technau A., Froelich K., Ginzkey C., Koehler C., Hagen R., Kleinsasser N., 2011. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. Toxicol Lett. 201, 27-33.
Hackley V.A., Ferraris C.F., 2001. The use of nomenclature in dispersion science and technology. US Government Printing Office, National Institute of Standards and Technology, Special Publication, Washington DC, pp 960–963

Hsiao I.L., Huang Y.J., 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO_2 nanoparticles toward human lung epithelial cells. Sci Total Environ. 409, 1219-28.

Hussain S., Boland S., Baeza-Squiban A., Hamel R., Thomassen L.C., Martens J.A., Billon-Galland M.A., Fleury-Feith J., Moisan F., Pairon J.C., Marano F., 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. Toxicology. 260, 142-9.

Hussain S., Thomassen L.C., Ferecatu I., Borot M.C., Andreau K., Martens J.A., Fleury J, Baeza-Squiban A., Marano F., Boland S., 2010. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. Part Fibre Toxicol. 7, 10.

Jacobs J.P., Jones C.M., Baille J.P., 1970. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. Nature. 227, 168-70.

Kreyling W.G., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H., Oberdörster G., Ziesenis A., 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. J Toxicol Environ Health A. 65, 1513-30.

L'Azou B., Jorly J., On D., Sellier E., Moisan F., Fleury-Feith J., Cambar J., Brochard P., Ohayon-Courtès C., 2008. *In vitro* effects of nanoparticles on renal cells. Part Fibre Toxicol. 5, 22.

Lanone S., Boczkowski J., 2006. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. Curr Mol Med. 6, 651-63.

Lanone S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Maillot-Marechal E., Boczkowski J., Lacroix G., Hoet P., 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. Part Fibre Toxicol. 6, 14.

Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environ Health Perspect. 111, 455-60.

Liu R., Zhang X., Pu Y., Yin L., Li Y., Zhang X., Liang G., Li X., Zhang J., 2010. Small-sized titanium dioxide nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages *in vivo*. J Nanosci Nanotechnol. 10, 5161-9.

Moon C., Park H.J., Choi Y.H., Park E.M., Castranova V., Kang J.L., 2010. Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO2) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide. J Toxicol Environ Health A. 73, 396-409.

Mroz R.M., Schins R.P., Li H., Drost E.M., Macnee W., Donaldson K., 2007. Nanoparticle carbon black driven DNA damage induces growth arrest and AP-1 and NFkappaB DNA binding in lung epithelial A549 cell line. J Physiol Pharmacol. 58 Suppl 5, 461-70.
Mroz R.M., Schins R.P., Li H., Jimenez L.A., Drost E.M., Holownia A., MacNee W., Donaldson K., 2008. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. Eur Respir J. 31, 241-51.
Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y., 2010. Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. Pharmazie. 65, 199-201.
Nativo P., Prior I.A., Brust M., 2008. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. ACS Nano. 2, 1639-44.
Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J., 2005a. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect. 113, 823-39.
Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H. and A report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group, 2005b. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials : elements of a screnning strategy. Part Fibre Toxicol. 2, 8.
Oh W.K., Kim S., Choi M., Kim C., Jeong Y.S., Cho B.R., Hahn J.S., Jang J., 2010. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. ACS Nano. 4, 5301-13.
Pan Z., Lee W., Slutsky L., Clark R.A., Pernodet N., Rafailovich M.H., 2009. Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. Small. 5, 511-20.
Park E.J., Yi J., Chung K.H., Ryu D.Y., Choi J., Park K., 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Toxicol Lett. 180, 222-9.
Porter A.E., Muller K., Skepper J., Midgley P., Welland M., 2006. Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. Acta Biomater. 2, 409-19.

Renwick L.C., Brown D., Clouter A., Donaldson K., 2004. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. Occup Environ Med. 61, 442-7.

Saxena R.K., Gilmour M.I., Hays M.D., 2008. Isolation and quantitative estimation of diesel exhaust and carbon black particles ingested by lung epithelial cells and alveolar macrophages *in vitro*. Biotechniques. 44, 799-805.

Schrand A.M., Schlager J.J., Dai L., Hussain S.M., 2010. Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy. Nat Protoc. 5, 744-57.

Shapero K., Fenaroli F., Lynch I., Cottell D.C., Salvati A., Dawson K.A., 2011. Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells. Mol Biosyst. 7, 371-8.

Singh S., Shi T., Duffin R., Albrecht C., van Berlo D., Höhr D., Fubini B., Martra G., Fenoglio I., Borm P.J., Schins R.P., 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO_2: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. Toxicol Appl Pharmacol. 222, 141-51.

Stearns R.C., Paulauskis J.D., Godleski J.J., 2001. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 24, 108-115.

Stoeger T., Reinhard C., Takenaka S., Schroeppel A., Karg E., Ritter B., Heyder J., Schulz H., 2006. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. Environ Health Perspect. 114, 328-33.

Stone V., Johnston H., Clift M.J., 2007. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. IEEE Trans Nanobioscience. 6, 331-40.

Su Y., Xu J.Y., Shen P., Li J., Wang L., Li Q., Li W., Xu G.T., Fan C., Huang Q., 2010. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullerenol in different cell lines. Toxicology. 269, 155-9.

Tabet L., Bussy C., Amara N., Setyan A., Grodet A., Rossi M.J., Pairon J.C., Boczkowski J., Lanone S., 2009. Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. J Toxicol Environ Health A. 72, 60-73.

Thurn K.T., Arora H., Paunesku T., Wu A., Brown E.M., Doty C., Kremer J., Woloschak G., 2010. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. Nanomedicine. 7, 123-30

Trono J.D., Mizuno K., Yusa N., Matsukawa T., Yokoyama K., Uesaka M., 2011. Size, Concentration and Incubation Time Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Pancreas

Cancer Cells and its Future Application to X-ray Drug Delivery System. J Radiat Res. 52, 103-9.

Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl R.H., 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. Cancer Res. 69, 8784-9.

Val S., Hussain S., Boland S., Hamel R., Baeza-Squiban A., Marano F., 2009. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. Inhal Toxicol. 21 Suppl 1, 115-22.

Vanwinkle B.A., de Mesy Bentley K.L., Malecki J.M., Gunter K.K., Evans I.M., Elder A., Finkelstein J.N., Oberdörster G., Gunter T.E., 2009. Nanoparticle (NP) uptake by type I alveolar epithelial cells and their oxidant stress response. Nanotoxicology. 3, 307-318.

Waters K.M., Masiello L.M., Zangar R.C., Tarasevich B.J., Karin N.J., Quesenberry R.D., Bandyopadhyay S., Teeguarden J.G., Pounds J.G., Thrall B.D., 2009. Macrophage responses to silica nanoparticles are highly conserved across particle sizes. Toxicol Sci. 107, 553-69.

Win K.Y., Feng S.S., 2005. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. Biomaterials. 26, 2713-22.

Xia T., Kovochich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J.I., Wiesner M.R., Nel A.E., 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. Nano Lett. 6, 1794-807.

Yue H., Wei W., Yue Z., Lv P., Wang L., Ma G., Su Z., 2010. Particle size affects the cellular response in macrophages. Eur J Pharm Sci. 41, 650-7.

Zhang Q., Hitchins V.M., Schrand A.M., Hussain S.M., Goering P.L., 2010. Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators. Nanotoxicology.

Zhao J., Bowman L., Zhang X., Vallyathan V., Young S.H., Castranova V., Ding M., 2009. Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. J Toxicol Environ Health A. 72, 1141-9.

Zucker R.M., Massaro E.J., Sanders K.M., Degn L.L., Boyes W.K., 2010. Detection of TiO_2 nanoparticles in cells by flow cytometry. Cytometry A. 77, 677-85.

Tables

	Provider data				Data from the physico-chemical characterisation study				
	Primary particle size (nm)	Shape	Crystalline phase	Purity (%)	Specific surface area (m^2/g)	Zeta potential (mV)	Granulometry (nm)	Endotoxin (U/ml)	Provider
Carbon black									
CB13	13	round	-	99	373.1 ± 10.5 *	-11.9	1033,4 ± 88,1	nd	Evonik/ Degussa
CB21	21	round	-	99	106.2 ± 0.8	-10.8	1573,8 ± 175,6	nd	Evonik/ Degussa
Titanium dioxide									
TiO_2	15	rond	anatase	99.7	140.9 ± 3.3	-0.1	833,7 ± 38,6 *	nd	Sigma-Aldrich

Table 1. Physico-chemical characterisation of manufactured nanoparticles.
Zeta potential and granulometry were evaluated in DMEM without foetal bovine serum. Corresponding data are presented as the mean ± SEM. * Significantly different compared to CB21 ($p<0.05$). nd = not detected.

Figure Legends

Fig. 1. Transmission electron microscopy views of MRC5 cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of manufactured nanoparticles (MNPs) for 6 hours. (A) Typical MRC5 cell with CB13 MNPs within a vesicle (scale bars: 2 µm on the left, 0.5 µm on the right). (B) CB21 MNPs being internalised by a MRC5 cell (scale bars: 5 µm on the left, 0.5 µm on the right). (C) MRC5 cell with TiO_2 MNPs in a vesicle (scale bars: 5 µm on the left, 0.5 µm on the right).

Fig. 2. Transmission electron microscopy views of 16HBE cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of manufactured nanoparticles (MNPs) for 6 hours. (A) Typical 16HBE cell with CB13 MNPs in a vesicle (scale bars: 10 µm on the left, 0.5 µm on the right). (B) 16HBE cell with a vesicle containing CB21 MNPs (scale bars: 5 µm on the left, 0.5 µm on the right). (C) 16HBE cell with TiO_2 MNPs in a vesicle (scale bars: 2 µm on the left, 0.5 µm on the right).

Fig. 3. Percentage of cells containing manufactured nanoparticles (MNPs). (A) MRC5 cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of MNPs for 6h, 24h, or 48h. (B) 16HBE cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of MNPs for 6h, 24h or, 48h. (C) MRC5 cells incubated for 24h with 0.5, 5, or 10 µg.cm^{-2} of MNPs. (D) 16HBE cells incubated for 24h with 0.5, 5 or 10 µg.cm^{-2} of MNPs. The Figure displays the results of one representative experiment (N = 50 cells) of 3 independent experiments. * Significant difference across MNP types ($p < 0.05$). # Significant difference between cell types ($p < 0.05$). Y axis: percentage of cells containing MNPs.

Fig. 4. Number of manufactured nanoparticles (MNPs) in cells. (A) MRC5 cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of MNPs for 6h, 24h, or 48h. (B) 16HBE cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of MNPs for 6h, 24h, or 48h. (C) MRC5 cells incubated for 24h with 0.5, 5 or 10 µg.cm^{-2} of MNPs. (D) 16HBE cells incubated for 24h with 0.5, 5 or 10 µg.cm^{-2} of MNPs. The Figure displays the results of one representative experiment (N = 30-40 cells) of 3 independent experiments. Data are mean ± SEM. * Significant difference across MNP types ($p < 0.05$). # Significant difference between cell types ($p < 0.05$). Y axis: number of MNPs in cells.

Fig. 5. Mean size of individual manufactured nanoparticles (MNPs) aggregates in cells. (A) MRC5 cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of MNPs for 6h, 24h, or 48h. (B) 16HBE cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of MNPs for 6h, 24h or 48h. (C) MRC5 cells incubated for 24h with 0.5, 5 or 10 µg.cm^{-2} of MNPs. (D) 16HBE cells incubated for 24h with 0.5, 5 or 10 µg.cm^{-2} of MNPs. The Figure displays the results of one representative experiment (N = 30-40 cells) of 3 independent experiments. Data are mean ± SEM. * Significant difference across MNPs ($p < 0.05$). # Significant difference between cell types ($p < 0.05$). Y axis: mean size of individual MNP aggregates (µm²).

Fig. 6. Percentage of cell surface area occupied by manufactured nanoparticles (MNPs) aggregates. (A) MRC5 cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of MNPs for 6h, 24h or 48h. (B) 16HBE cells incubated with 5 µg.cm^{-2} of MNPs for 6h, 24h or 48 hours. (C) MRC5 cells incubated for 24h with 0.5, 5 or 10 µg.cm^{-2} of MNPs. (D) 16HBE cells incubated for 24h with 0.5, 5 or 10 µg.cm^{-2} of MNPs. The Figure displays the results of one representative experiment (N = 30-40 cells) of 3 independent experiments.. Data are mean ± SEM. * Significant difference across MNP types ($p < 0.05$). # Significant difference between cell types ($p < 0.05$). Y axis: percentage of cell surface area occupied by MNP aggregates.

Fig. 7. Cytotoxicity of manufactured nanoparticles (MNPs) in MRC5 and 16HBE cells. Cells were exposed to 10 µg.cm-² of MNPs for 24 h. Cell viability was measured using the WST-1 assay. Data are the percentages of surviving cells relative to the control reported as the mean ± SEM of three independent experiments. * Significantly different from control ($p < 0.05$).

Figure 1

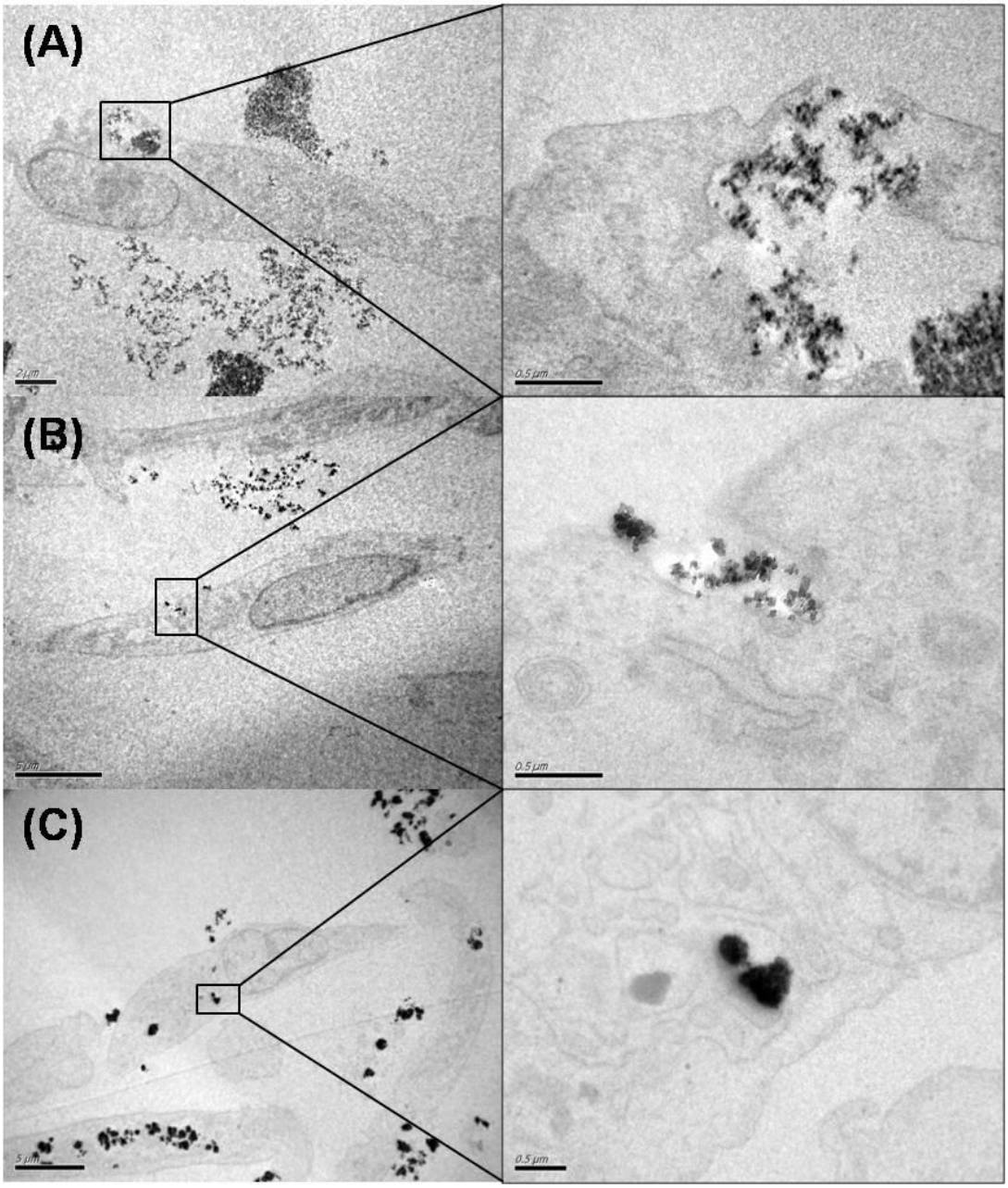


Figure 2

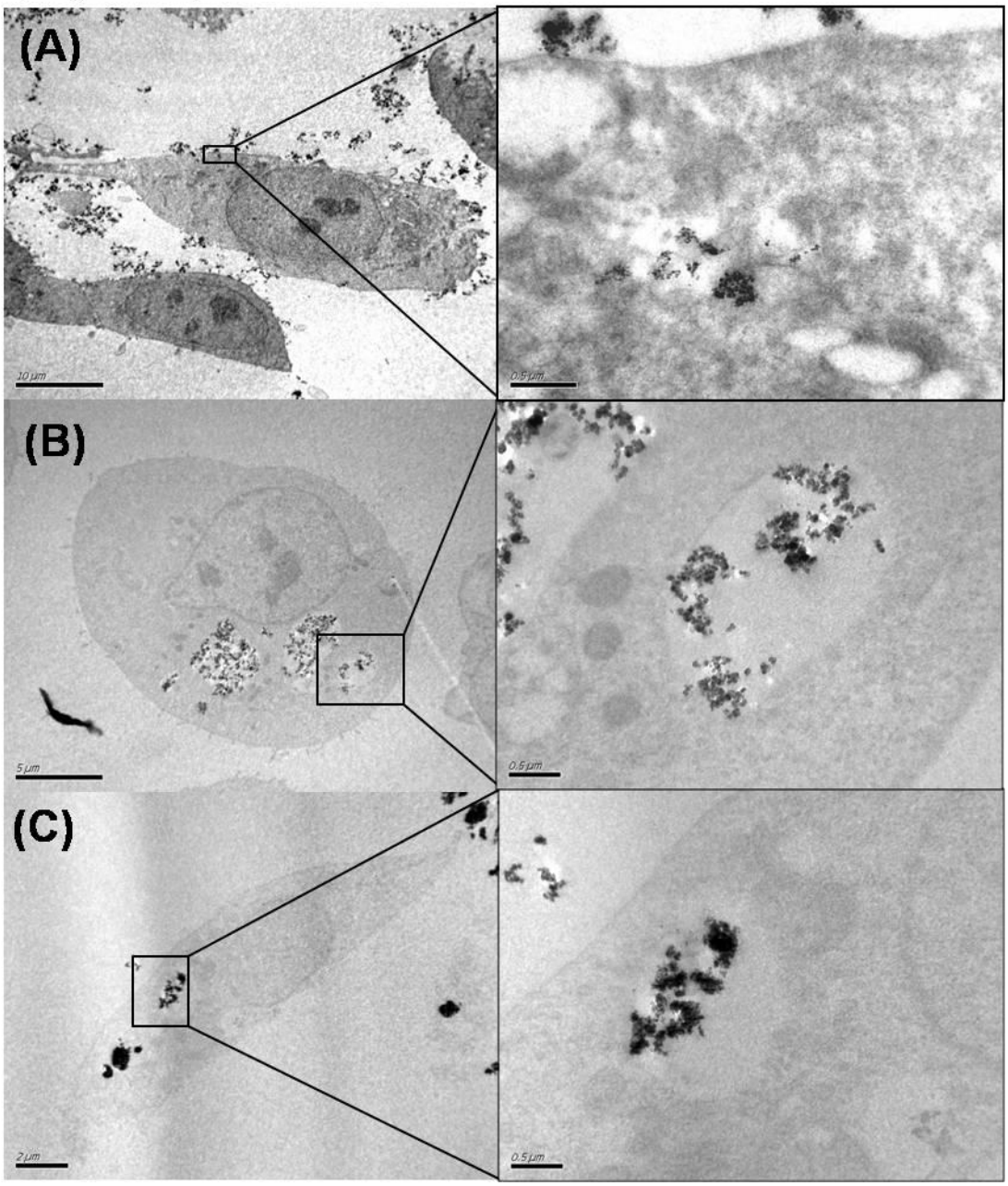


Figure 3

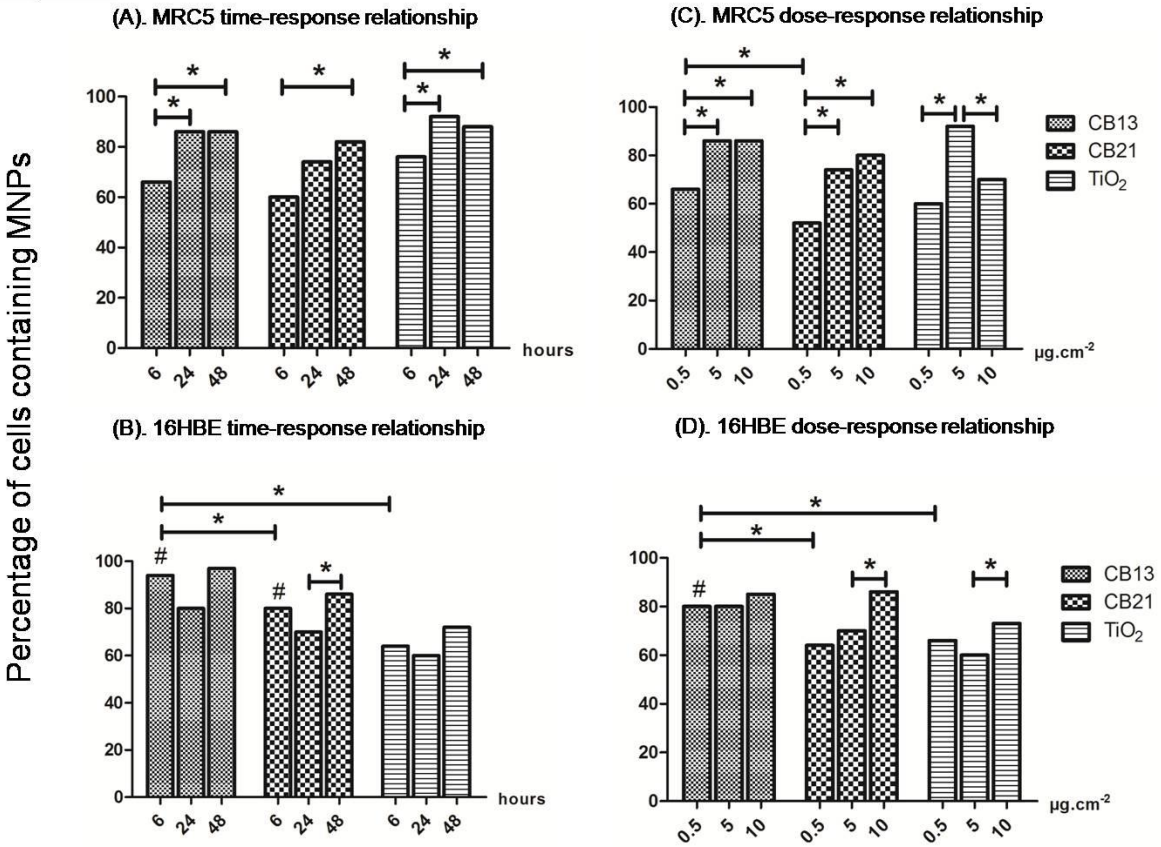


Figure 4

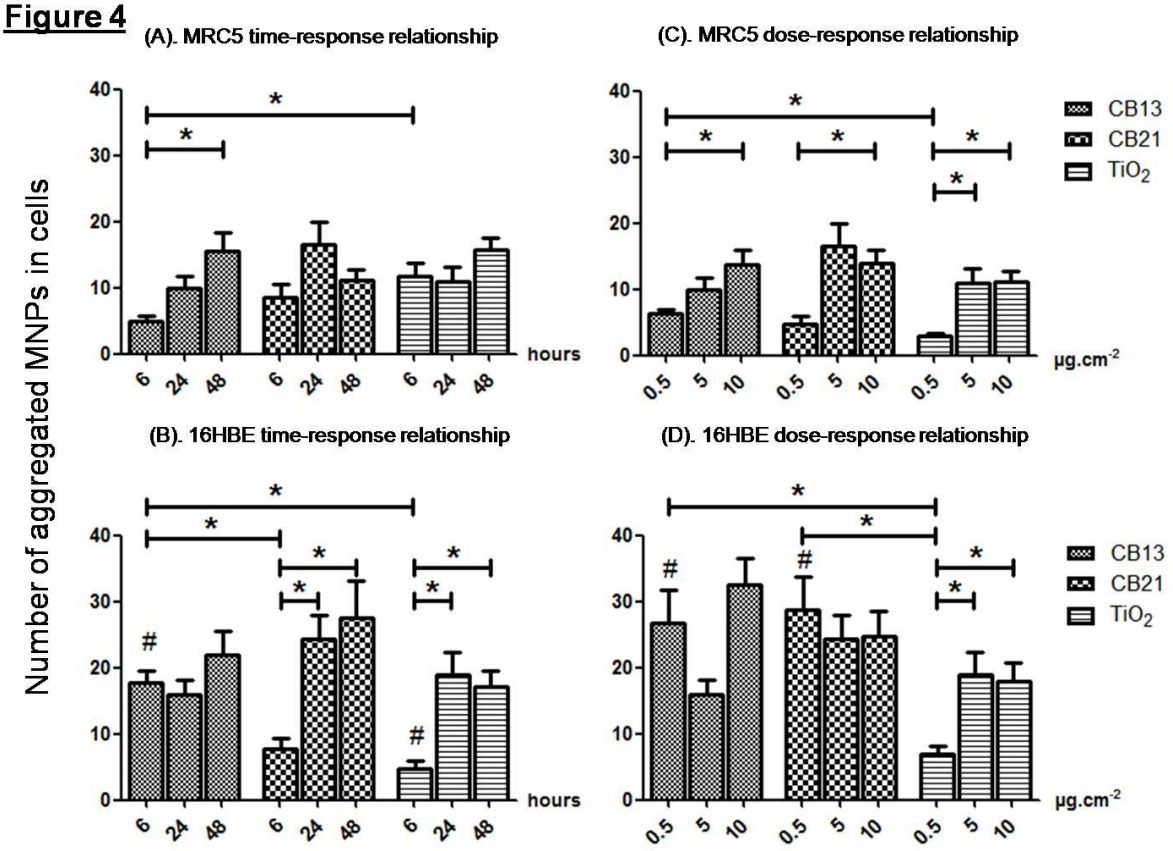


Figure 5

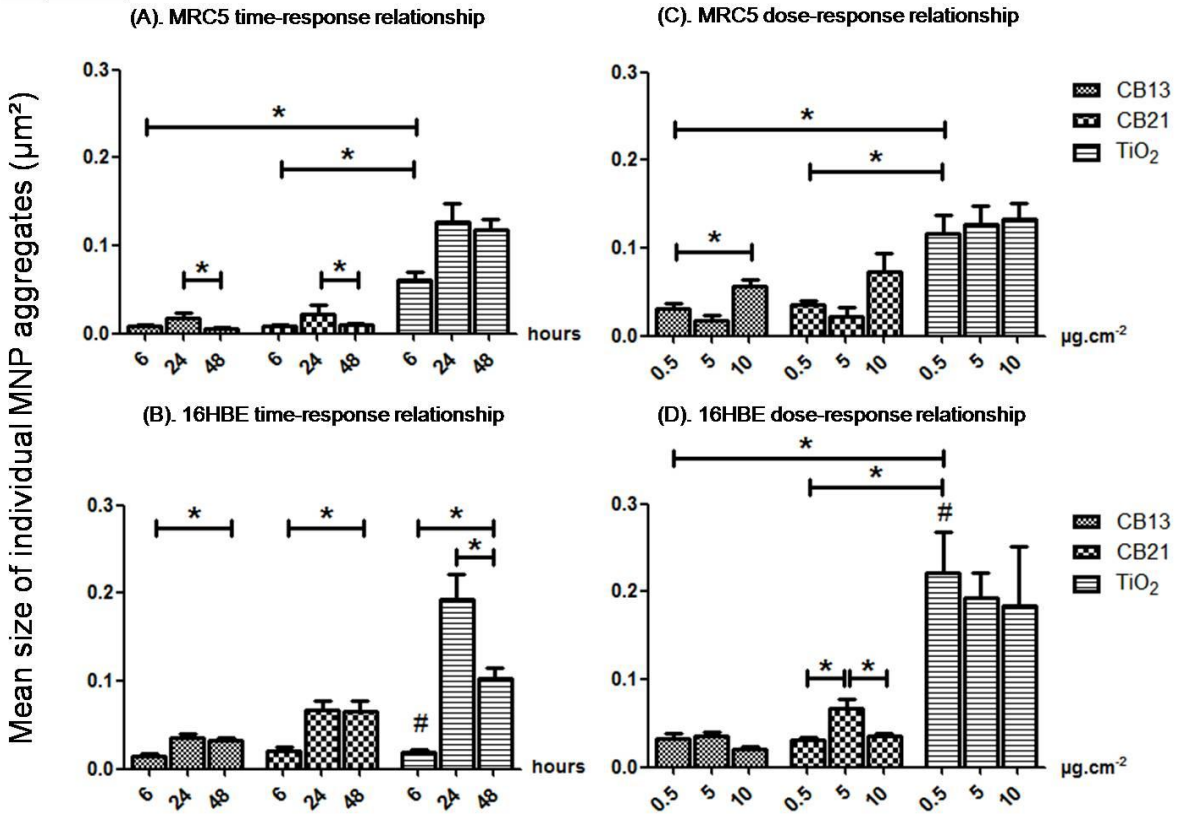


Figure 6

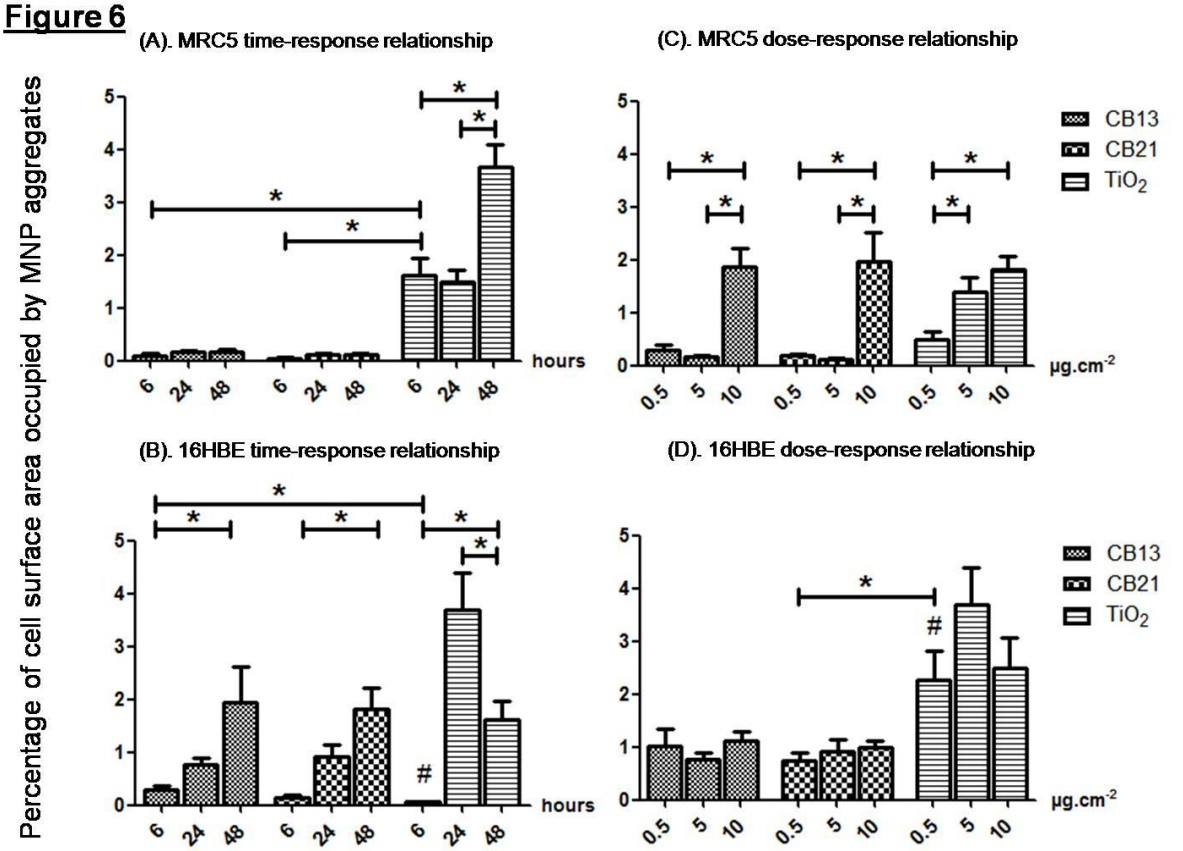
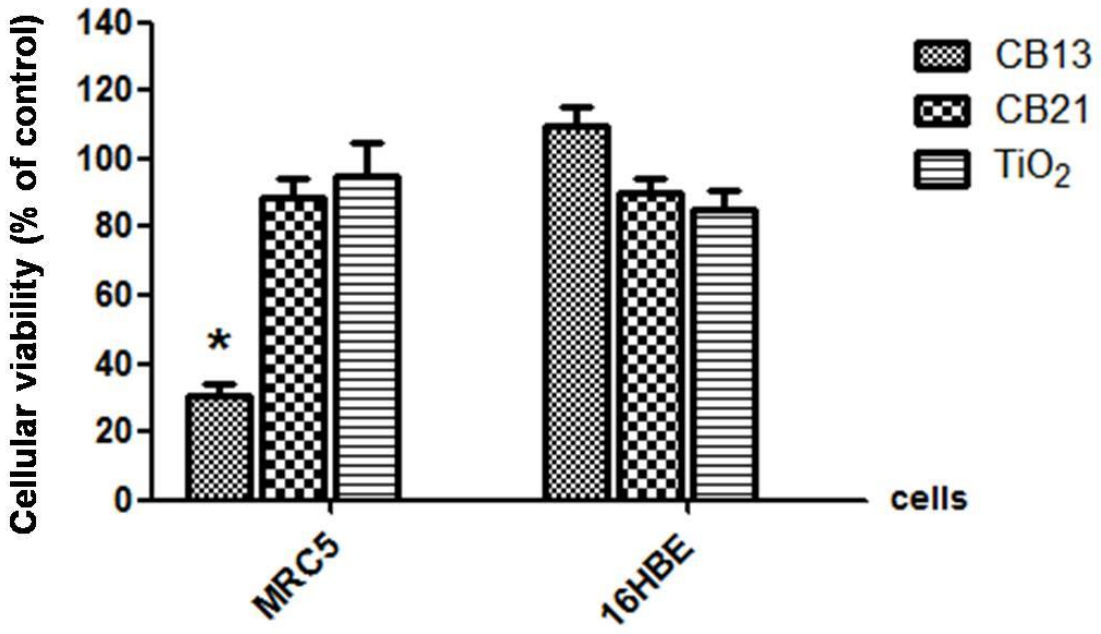


Figure 7


Cellular viability (% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
CB13
CB21
TiO2
cells
MRC5
16HBE

Résumé de la thèse

Une exposition aux nanoparticules (NP) de dioxyde de titane (TiO_2) peut entraîner un remodelage matriciel, dans lequel la Matrix Metalloprotéase-1 (MMP-1) notamment pourrait jouer un rôle important. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons 1/ mesuré l'expression de la MMP-1 sur des fibroblastes pulmonaires humains après exposition à des particules de TiO_2 de différentes tailles, formes et variétés cristallines, ainsi qu'une NP de noir de carbone (NC), et 2/ administré des NP de TiO_2 et de NC sur un modèle d'emphysème pulmonaire induit par l'élastase chez le rat. Sur les fibroblastes pulmonaires humains, certaines NP de TiO_2 induisent l'expression de la MMP-1 via l'interleukine-1β (IL-1β) et augmentent son activité. Les particules de TiO_2 micrométriques induisent l'expression de la MMP-1 sans lien avec l'IL-1β et les NP de NC ne modulent pas l'expression de la MMP-1. L'exposition des rats aux NP de TiO_2 n'entraîne pas d'effet ; l'exposition aux NP de NC entraîne une inflammation et une induction de l'expression de la MMP-12. Cette exposition aggrave, de plus, l'inflammation provoquée par l'élastase, ce qui n'est pas observé avec les NP de TiO_2. Au total, notre travail montre bien un rôle pour les NP de TiO_2 dans le remodelage matriciel, via l'induction et l'activation de la MMP-1 *in vitro*. *In vivo*, les NP de NCpeuvent aggraver ceertaines réponses à l'élastse. La composition chimique et la taille des particules semblent être des déterminants importants de leurs effets.

Thesis abstract

Exposure to titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles (NP) can lead to matrix remodeling, a phenomenon in which Matrix metalloprotease-1 (MMP-1) notably could play an important role. To validate this hypothesis, we 1/ studied MMP-1 expression in human pulmonary fibroblasts after exposure to TiO_2 particles of different sizes, shapes and crystal phases and one Carbon Black (CB) NP, and 2/ measured the effect of TiO_2 CB NP on an elastase-induced emphysema model in rats.On human lung fibroblasts, some TiO_2 NP induced MMP-1 through an interleukin-1β (IL-1β) dependent mechanism, and increased MMP-1 activity. TiO_2 micrometric particles induced MMP-1 without IL-1β implication, and CB NP did not induce MMP-1. Rat exposure to TiO_2 NP had no effect but exposure to NC NP induced inflammation and MMP-12 expression. TiO_2 NP did not modulate elastase effects. NC NP aggravated elastase-induced inflammation.In total, our work shows a role for TiO_2 NP in matrix remodeling, via MMP-1 induction and activation *in vitro*. *In* vivo, CB NP can aggravate some elastase-induced effects. Particles composition and size seem to be important determinants of their effect.