

Toxicologie des nanoparticules : influence de la taille, de la composition chimique et de la réactivité de surface sur leurs effets pulmonaires et rénaux (NANOTOX)

P1 : Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire Université Paris Diderot Paris 7: Francelyne Marano PU coordinatrice, Armelle Baeza MCU, Sonja Boland IR, Rodolphe Hamel IE, Salik Hussain doctorant

P2 : Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire : Roger Marthan PUPH, Arnaud Courtois MCU, Isabelle Baudrimont MCU

P3 : Physiopathologie et Epidémiologie de l'Insuffisance Respiratoire : Jorge Boczkowski DR INSERM , Sophie Lanone CR INSERM,

P4: INERIS : Ghislaine Lacroix IR INERIS, Françoise Rogerieux Tech INERIS

P5 : Laboratoire de Biologie Cellulaire, Groupe d'étude de physiologie et de physiopathologie rénales : Jean Cambar PU, Béatrice L'Azou MCU, Patrick Brochard PU PH

P6: LEPI et Médecine et Santé au travail Paris 12 : Jean-Claude Pairon PUPH, Marie-Annick Billon-Galland IR, Laurent Martinon IR, Laurence Kheuang Tech, Jocelyne Fleury MCU PH,

P7 : Laboratoire de Pollution Atmosphérique et Sol (LPAS), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (Suisse) : Jean-Michel Rossi DR , Jean-Jacques Sauvain (IST), Ari Setyan Doctorant(IST)

A.Introduction :

L'exposition humaine à des particules atmosphériques ultrafines (PUF< 100 nm) est devenue au cours des dernières années une question importante de santé publique, mise en lumière par l'analyse de la composition des particules atmosphériques et de leurs effets biologiques (Peters et al 1997). Celles-ci, en milieu urbain, peuvent être formées de plus de 80% de suies fines (<1µm) et ultrafines provenant de la combustion des carburants fossiles (Baulig et al 2004). Ces particules, émises notamment par les véhicules Diesel, les véhicules à essence et les chauffages urbains, ont rapidement été suspectées d'être à l'origine de la morbidité et de la mortalité cardiorespiratoires observées dans les études épidémiologiques sur les effets à court terme de la pollution atmosphérique (Atkinson et al 2001, Le Tertre et al 2002). Elles seraient principalement à l'origine de réponses inflammatoires pouvant aggraver des pathologies pulmonaires telles que l'asthme (Gong et al 2003, Pietropaoli et al 2004) et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Elles auraient également un effet prothrombotique et pourraient être à l'origine d'athérosclérose et de pathologies cardiovasculaires (Schultz et al 2005).

Le développement récent des nanotechnologies va élargir les sources de pollution avec la production accrue de nanomatériaux manufacturés, dont des nanoparticules (NP), qui vont se retrouver en milieu professionnel et, vraisemblablement, en environnement général. Des différences existent entre PUF et NP, les premières ayant généralement une assez large distribution de taille et une composition chimique complexe alors que les secondes ont souvent une distribution étroite et une composition chimique définie. Cependant ces particules possèdent en commun des comportements biologiques qui restent encore largement incompris. Ceci tient essentiellement à des propriétés associées à leur très petite taille, leur très faible masse mais leur surface proportionnellement considérable. Ces propriétés physicochimiques et, en particulier, leur réactivité de surface, seraient à l'origine de leur réactivité biologique et de leur capacité à se disperser dans l'organisme. La réactivité de surface, qui augmente alors que décroît la taille de la particule, laisse prévoir que les PUF et NP vont avoir une activité biologique plus importante à masse comparable que les particules plus grosses. Ceci peut être favorable et être utilisé dans des approches thérapeutiques (transporteurs de médicaments pour leur capacité à franchir les barrières biologiques). Ceci peut être au contraire défavorable et engendrer une toxicité associée à leur aptitude à générer un stress oxydant et à se disperser dans l'organisme (Oberdörster et al 2005). Cette question de la dispersion dans l'organisme reste d'ailleurs encore un objet de débat. Berry et al, les premiers en 1977, ont montré que 30 mn après l'instillation intratrachéale de NP d'or colloïdal chez le rat, on retrouve une grande quantité de particules dans les plaquettes des capillaires pulmonaires. Ces résultats ont ensuite été confirmés chez l'animal avec l'utilisation de diverses nanoparticules. Cependant, chez l'homme, ils sont encore sujets à controverse, deux études récentes utilisant une exposition par inhalation à des particules de carbone de 20 nm marquées au ⁹⁹Tc chez des volontaires montrent, pour l'une, un passage rapide dans le sang et une accumulation dans le foie (Nemmar et al 2002) alors que l'autre ne trouve pas de translocation (Brown et al 2002). Il est cependant très probable que, selon leur taille, leur composition et leur réactivité de surface, les NP peuvent s'accumuler dans les épithéliums, franchir les barrières épithéliales et endothéliales et avoir des effets systémiques (Oberdörster et al 2005). Par ailleurs, la réponse inflammatoire induite au niveau des voies aériennes et des alvéoles pourrait largement participer à l'initiation et au développement des pathologies.

Il apparaît donc que beaucoup d'incertitudes subsistent sur la toxicité potentielle des PUF et des NP, sur leur capacité à interagir avec les tissus et sur leurs mécanismes d'action. Les études récentes donnent des résultats assez contradictoires sur l'accumulation pulmonaire puis le transfert de ces particules vers d'autres cibles. Les mécanismes de rétention seraient différents de ceux des particules fines et ces mécanismes d'accumulation ainsi que les réponses biologiques semblent dépendre essentiellement des caractéristiques physicochimiques des NP ainsi que de l'état de santé des individus. Il est donc important de déterminer quelles sont les caractéristiques des nanoparticules impliquées dans leurs effets biologiques : composition chimique, taille, réactivité de surface ; Les recherches réalisées dans le cadre du projet NANOTOX ont porté sur des nanoparticules manufacturées qui ont été caractérisées par une équipe de chimistes. Les études biologiques ont été essentiellement centrées sur les effets respiratoires et rénaux. Elles ont portées sur :

- **les capacités d'accumulation des nanoparticules dans l'appareil respiratoire ainsi que leur transfert et leur impact sur le rein, organe d'élimination**
- **les effets potentiels des nanoparticules sur des pathologies inflammatoires du poumon :** Peuvent-elles induire un stress oxydant et une réponse inflammatoire? Quelles sont les caractéristiques physicochimiques importantes dans la réponse: taille, composition, réactivité de surface? Quels sont leurs effets sur des malades atteints de pathologies pulmonaires chroniques : BPCO, asthme.

L'objectif général était d'évaluer en fonction des caractéristiques physico-chimiques des NP :

- (1) **leurs capacités et les mécanismes de leur accumulation** par les principales cellules cibles de l'appareil respiratoire (épithéliums respiratoire, macrophages, endothélium)
- (2) **leurs effets oxydatifs et inflammatoires** susceptibles de conduire à des pathologies inflammatoires du poumon.
- (3) **leurs effets sur des sujets atteints de pathologies pulmonaires telles que l'asthme et la BPCO** en utilisant des modèles animaux
- (4) **leurs effets sur le rein**, lieu privilégié d'élimination qui peut constituer une cible majeure des NP

B. Matériel et méthodes :

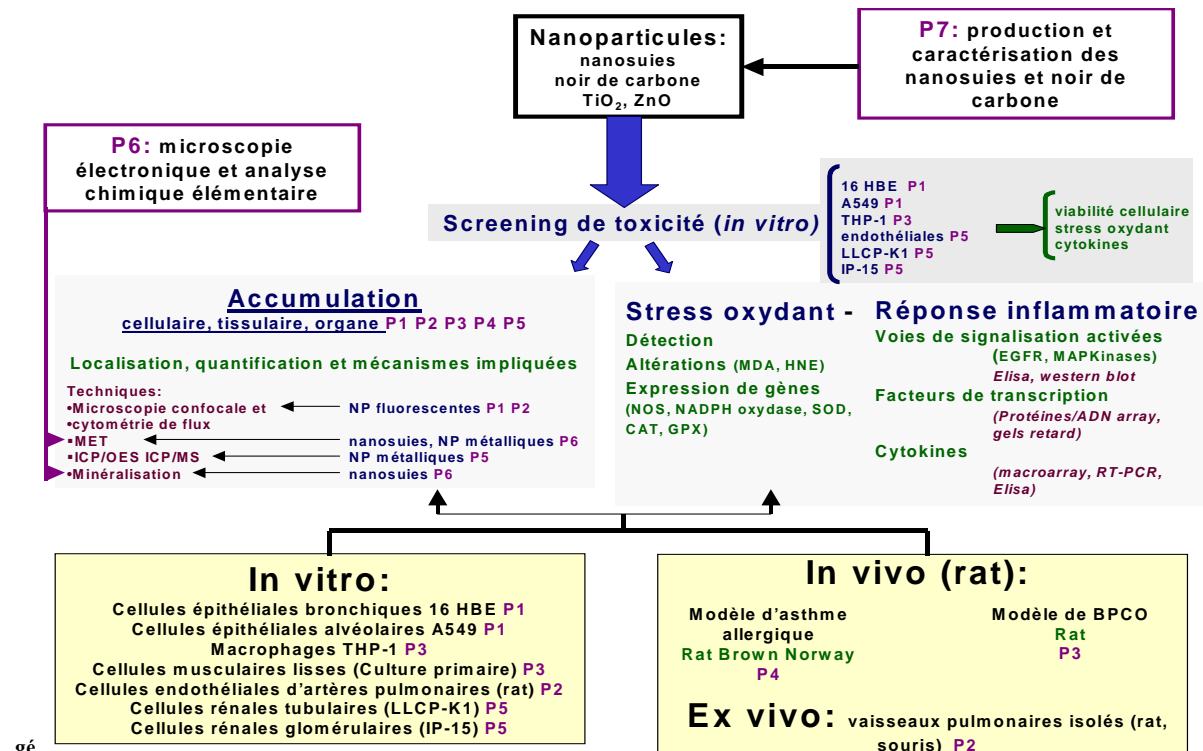
1. Nanoparticules :

Notre étude toxicologique a concerné des NP carbonées et métalliques dont les caractéristiques physico-chimiques sont indiquées dans le tableau 1. Afin d'approfondir et de mettre au point les études de l'internalisation des NP, des billes fluorescentes de différentes tailles et de différentes charges ont également été utilisées

Les NP étudiées étant fortement électrostatiques, lors de leur pesée nous utilisons des coupelles en aluminium et un appareil permettant de diminuer les charges électrostatiques (Ionisateur static line, Haug Biel AG). Ces NP sont mises en suspension dans du milieu DMEM/F12 à 2 mg/ml puis elles sont soniquées 3 fois 20 secondes à 60 kW à l'aide d'une sonde à influence (Ultrasonic processor, Bioblock Scientific). La morphologie des NP de carbone mises en suspension dans le milieu de culture selon le protocole décrit ci-dessus a pu être étudié en Microscopie Electronique à Transmission (MET, en collaboration avec le LEPI). Après leur mise en suspension, les NP ont été filtrées sur un filtre en polycarbonate de porosité 0.2 µm afin d'obtenir une concentration de 1 µg/cm² pour les NP (Fw2, P60) et de 10 µg/cm² pour les Fr101. En raison d'une forte sédimentation, les concentrations en NP ont été exprimées en unité de surface (µg/cm²)

	Ø (nm)	S (m ² /g)	pH	Composition	Fournisseur
Nanoparticules de carbone					
FW 2	13	350	2.5	Carbone	Degussa
P60	21	115	10	Carbone	Degussa
Fr101	95	20	7	Carbone	Degussa
Nanoparticules de titane : TiO₂					
Ti15	15	190-290	n.d.	Dioxyde de titane	Sigma
Ti50	25-75	20-25	n.d.	Dioxyde de titane	Sigma
Nanoparticules de zinc : ZnO					
Zn	50-70	15-25	n.d.	Oxyde de zinc	Sigma

Tab. 1. Caractéristiques des nanoparticules de carbone et des nanoparticules métalliques utilisées. Leur diamètre aérodynamique (Ø), leur surface (S) et leur pH ont été indiqués par les fournisseurs. Les caractéristiques spécifiques en particulier BET ont été déterminées. Les nanosuies ont été spécifiquement fabriquées et caractérisées pour le projet par l'équipe de l'EPFL (Suisse)



(pour le détail des techniques se reporter au rapport final et aux publications)

C. Résultats principaux

1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules.

Les particules testées ont été les mêmes pour l'ensemble des partenaires du projet. Pour les suies, elles ont été synthétisées, caractérisées (M. Rossi, J.J. Sauvain, équipe de physico-chimistes de l'Ecole Polytechnique et de l'Université de Lausanne) Par ailleurs, nous avons utilisé des NP de noir de carbone de différentes granulométries (Dégussa) enfin, des NP métalliques déjà utilisées dans l'industrie, le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc. **Au cours de ce travail une nouvelle méthode de caractérisation de nanoparticules a été mise en oeuvre. Elle se base sur la réaction chimique d'un gaz de sondage avec des groupes fonctionnels présents sur la surface de nanoparticules.** La consommation du gaz de sondage en présence de nanoparticules est détectée quantitativement par spectrométrie de masse jusqu'à la saturation de la capture du gaz de sondage et mis en relation avec la surface externe mesurée par métrologie. Cette dernière s'est effectuée par la mesure de la surface interne et externe BET (selon Brunauer-Emmett-Teller). Les résultats sont exprimés en nombre de molécules ou monocouches moléculaires par unité de surface de nanoparticule pour chaque gaz de sondage et représente la première étape de l'étude de la réactivité des nanoparticules en milieu biologique, soit en phase condensée. Cette méthode en effet rapporte une cartographie de la réactivité chimique à l'interface envers des gaz de sondage de différentes réactivités en plus de la caractérisation spectroscopique de nanoparticules. Les nanoparticules examinés étaient trois types de carbone amorphe (suie), soit FS101, Printex 60 et FW2, un échantillon de référence de suie (SRM 2975, standard reference material du NIST), un échantillon de terrain (Diesel TPG) collecté d'un filtre à particules Diesel des Transports Genevois, ainsi que deux suies de laboratoire produites sous conditions contrôlées à partir de flamme de diffusion alimentées à l'hexane. En outre, trois échantillons de TiO_2 ont été étudiés soit TiO_2 15, TiO_2 50 et TiO_2 P25. Les gaz de sondage utilisés sont la triméthylamine ($(\text{CH}_3)_3\text{N}$), l'hydroxylamine (NH_2OH), l'acide trifluoroacétique (CF_3COOH), l'acide chlorhydrique (HCl), l'ozone (O_3) et le dioxyde d'azote (NO_2). Le $(\text{CH}_3)_3\text{N}$ enregistre la densité des sites acides voire des groupes carboxyliques de la surface d'un aérosol organique tandis que NH_2OH sonde la densité des groupes carbonyle (cétones, aldéhydes). Ces deux sondes démontrent le caractère oxydé et partiellement oxydé de la surface de l'aérosol en question. Les acides CF_3COOH et HCl sont les témoins de la densité des groupes basiques à l'interface tandis que O_3 et NO_2 démontrent la capacité de la surface de subir une oxydation par un oxydant fort (O_3) et faible (NO_2). Les résultats et sur la capture à saturation des gaz de sondage (densité des groupes fonctionnels interfaciales) et leur probabilité de réaction sont en annexe. **En bref, nous avons fait les observations suivantes : la surface des tous les aérosols examinés est multifonctionnelle, ce qui veut dire que l'interface répond en général à tous les gaz de sondage en proportions différentes. Le carbone amorphe Printex 60 avait la plus petite densité de groupes fonctionnels, tandis que la suie Diesel TPG en avait la plus grande. La présence d'oxydes basiques a été enregistrée sur la surface des trois échantillons de carbone amorphe. Les suies produites par combustion d'hexane d'une flamme riche et pauvre, respectivement, ainsi que le carbone amorphe FS101 sont caractérisées par leur grande tendance d'être oxydable. TiO_2 15 se montre le plus pauvre en densité en groupes fonctionnels à l'interface malgré la taille la plus petite de ses particules primaires. Nos résultats montrent une grande variabilité de la composition de surface pour les suies et les nanoparticules de TiO_2 qui pourrait se traduire en réponses biologiques très différentes.**

Une caractérisation des NP dans les milieux de cultures a également été effectuée par le Partenaire 6

Cette caractérisation s'est faite au Microscope électronique à transmission en déposant sur des grilles des nanoparticules traitées de la même façon que pour l'exposition des cultures cellulaires, en particulier dans le milieu de culture, et ceci afin d'observer si elles restaient isolées ou si elles formaient des agrégats.

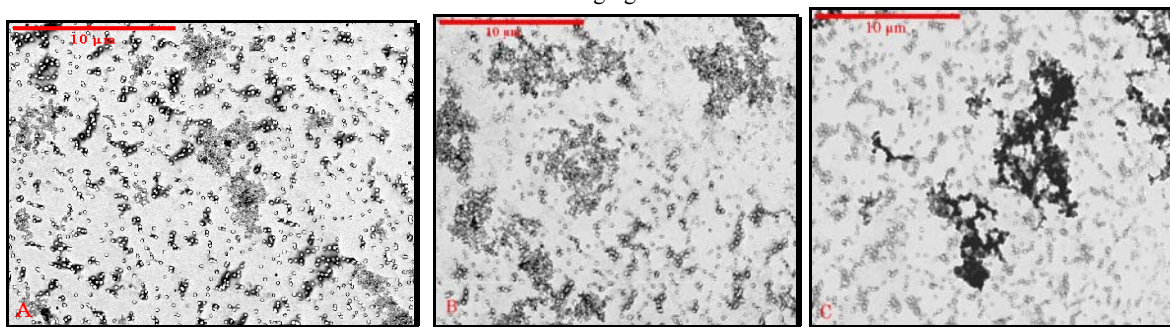


Fig.1. Photographies des NP de carbone obtenues en MET. Les figures A, B et C sont des photos des NP de carbone Fw2, P60 et Fr101 obtenues en MET avec un grossissement de 5000. Les pores des filtres apparaissent sous forme de cercles blancs et les NP de carbone se présentent sous forme d'agrégats de couleur grise à noire et de tailles variées. Il est possible de distinguer que les agrégats sont formés d'éléments de base de très petite taille pour les NP Fw2 et P60 et qu'ils sont de taille beaucoup plus grosse pour les NP Fr101. Les cellules seront donc exposées à des NP de carbone dont la taille est bien définie mais qui tendent à former des agrégats de tailles diverses dans le milieu.

2. Etude in vitro de la cytotoxicité des Nanoparticules.

Cette première étape des recherches a porté sur la détermination de la cytotoxicité des NP caractérisées par P6 et P7. La taille des NP allant de 13 à 95 nm (carbone, dioxyde de titane, oxyde de zinc) (Voir tab. 1).

Les études ont été réalisées sur différentes lignées représentatives des organes cibles : cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée 16 HBE), les macrophages pulmonaires (THP1) les fibroblastes pulmonaires(RMC5), les cellules endothéliales, les cellules rénales (LLCP-K1 et IP-15)

Les tests de cytotoxicité utilisés ont été

1) le test WST-1 (Water Soluble Tétrazolium) qui est un test colorimétrique basé sur la transformation d'un sel de tétrasolium en un substrat coloré (formazan) par des déshydrogénases mitochondriales

2) le test IP, l'iodure de propidium (IP) qui est un marqueur d'exclusion colorant uniquement les cellules mortes en s'intercalant entre les bases nucléiques.

Deux exemples de résultats sont présentés ci dessous :

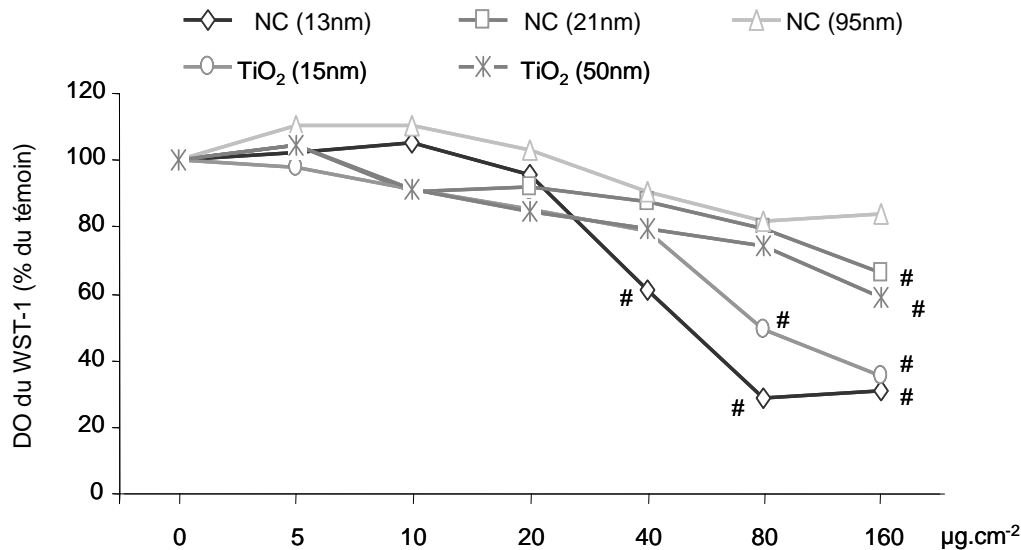


Fig 2 a : Evaluation de la cytotoxicité par la mesure de l'activité métabolique des cultures (test WST-1). Les cellules 16HBE sont traitées avec des NP de NC (13 nm, 21 nm, 95nm) ou TiO₂ (15nm, 50nm) de 5 à 160 µg/cm² pendant 24h (n= 6 en A et n=3 en B).

Significativement différent du témoin (p<0.05, ANOVA puis Dunetts t test)

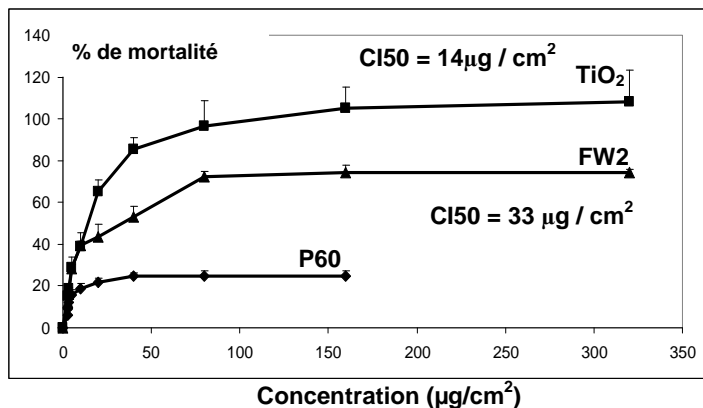


Fig2 b: Evaluation de la viabilité cellulaire après 24 h d'intoxication des cellules endothéliales par les différents types de NP (Test WST1)

En résumé : Ces 2 tests de cytotoxicité montrent :

- que les NP d'oxyde de zinc sont les plus toxiques des NP testées, cette toxicité étant associée à la solubilisation du Zn et à sa toxicité chimique. Les NP de ZNO ont ensuite été écartées pour cette raison.
- que parmi les NP de carbone et de TiO₂ testées, les plus petites (FW2, Ti15) sont les plus toxiques.
- que l'évaluation de la viabilité cellulaire par le test IP révèle une plus grande sensibilité par rapport au test WST1 mais on aboutit globalement au même classement des particules avec les 2 tests.
- que la cytotoxicité diffère en fonction du modèle cellulaire et des NPs utilisées. Les macrophages sont les cellules les plus résistantes alors que les cellules tubulaires rénales sont très sensibles, les cellules bronchiques

et endothéliales donnant une réponse intermédiaire. Ceci apparaît clairement si on compare les tests de toxicité réalisés dans les mêmes conditions sur les cellules glomérulaires et sur les cellules tubulaires proximales.

- Une détermination de la mort cellulaire par nécrose et/ou par apoptose sur les cellules bronchiques humaines (P1) et sur les cellules rénales (P5) a donné des résultats différents : les cellules rénales meurent par nécrose alors que les cellules bronchiques meurent essentiellement par apoptose.

3. Etude de l'accumulation des nanoparticules au niveau cellulaire, tissulaire et dans l'organisme.

Cette étude a été réalisée *In vitro*, sur les cellules épithéliales bronchiques, sur des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires et les cellules rénales. L'accumulation a été suivie par cytométrie de flux pour une approche quantitative. Elle a été complétée par des observations en Microscopie électronique à transmission de l'accumulation de NP de carbone et de NP métalliques. Une quantification de l'accumulation a été réalisée.

In vivo, elle s'est faite chez le rat normal après instillation intratrachéale. La recherche de particules dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) et les tissus a été réalisée après fixation et observation au MET.

Les mécanismes d'accumulation ont été recherchés sur la lignée de cellules bronchiques humaines 16HBE et sur les cellules rénales: endocytose par vésicule recouverte ou non, médiée ou non par des récepteurs, autres mécanismes d'internalisation, accumulation spécifique dans certains organites ex: mitochondrie, noyau a été recherchée

3.1 Mesure de l'accumulation des NP par cytométrie de flux :

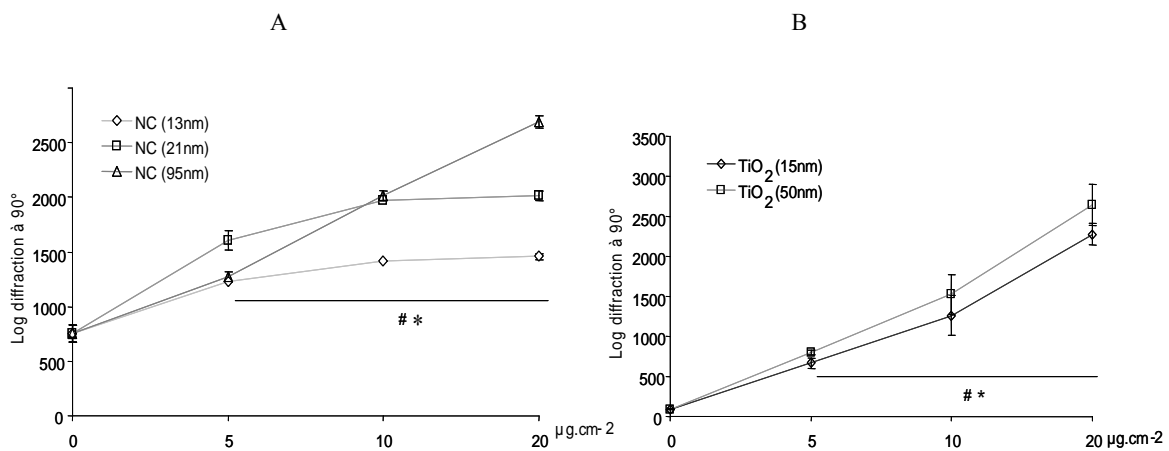


Fig 3 : Mesure en cytométrie en flux de la diffraction de la lumière à 90° indicative de la granularité des cellules. Les cellules 16HBE sont exposées aux NP de (A) Noir de Carbone (13 nm, 21 nm, 95nm) ou (B) TiO₂ (15nm, 50nm) de 5 à 20 µg/cm² pendant 24h (n=3).

Significativement différent du témoin (p<0.05, ANOVA puis Dunett's t test)

- L'accumulation des NP de noir de carbone et de TiO₂ est dose-dépendante et dépend de la taille seulement pour les NP de NC.

3.2 Etude de l'accumulation par microscopie confocale et microscope électronique

a) Microscopie confocale de cellules bronchiques humaines (16HBE) ayant accumulé des NP fluorescentes et des NP de noir de carbone. Celles-ci sont localisées dans le cytoplasme cellulaire et à la périphérie des cellules.

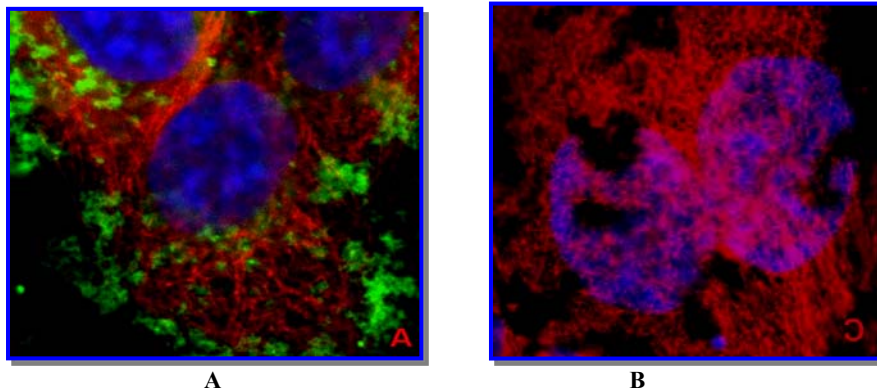


Fig 4 : Photos des billes de latex fluorescentes et des NP de carbone réalisées en microscopie confocale. Les billes fluorescentes carboxylées de 32 nm apparaissent en vert sur la photo A, les NP de NC Fw2 apparaissent sous forme de taches

sombres sur la photo B. Les microtubules sont marqués en rouge et les noyaux apparaissent en bleu.
b) Microscopie électronique à transmission

Trois types de NP [noirs de carbone P60 et TiO₂; dose unique de 5 µg/cm² pendant 24h] ont été évalués dans 3 types cellulaires : 16HBE, CE et LLCPK. Une étude de la cinétique de l'internalisation avec évaluation de la relation dose-effet a ensuite été effectuée dans deux lignées respiratoires humaines : l'une épithéliale (16HBE), l'autre fibroblastique (MRC5) (temps de traitement des cellules de 6h, 24h et 48h ; doses de NP sont de 0,5, 5 et 10 µg/cm²) Les observations ont été réalisées avec un MET (JEOL1200 EX II) couplé à un dispositif d'analyse chimique élémentaire - spectromètre dispersif en énergie de rayons X (EDS LINK ISIS 300) et à une caméra digitale (GATAN) pour les prises de vues. Le logiciel d'analyse d'images SAISAM (MicroVision, version 5.6.2) a été utilisé pour la mesure des paramètres d'internalisation des NP.

Les différents résultats obtenus pour les deux lignées cellulaires suggèrent des comportements différents vis-à-vis de l'internalisation des NP, et en fonction de la nature des NP :

- Pour les deux lignées cellulaires étudiées (MRC5, CE et 16HBE), l'internalisation des NP est un phénomène rapide et fréquent, concernant la majorité des cellules (plus de 90%). Les NP internalisées sont observées essentiellement dans des vésicules dans notre étude.
- L'étude de la cinétique d'accumulation suggère que l'internalisation est plus précoce dans la lignée 16HBE que dans la lignée MRC5, si l'on se base sur le pourcentage de cellules ayant internalisé des NP.
- L'internalisation des NP semble dépendre du type de NP surtout dans les cellules MRC5 et les CE : la surface de NP de TiO₂ internalisée est en effet nettement plus élevée que pour les NP de noir de carbone. La taille des agrégats de NP de TiO₂ est aussi franchement plus élevée que pour les agrégats de NP de noir de carbone. Ce phénomène d'internalisation différentielle en fonction du type de NP est plus discutable pour les cellules 16HBE (avec cependant une surface de NP de TiO₂ internalisées plus élevée à 24h que pour les NP de noir de carbone).
- La taille des agrégats augmente nettement entre 6h et 24h dans les cellules 16HBE, ce qui n'est pas observé (ou en tous cas de façon beaucoup plus discrète) dans les cellules MRC5.
- L'ensemble de ces résultats suggère une cinétique d'internalisation fonction du type cellulaire et du type de NP

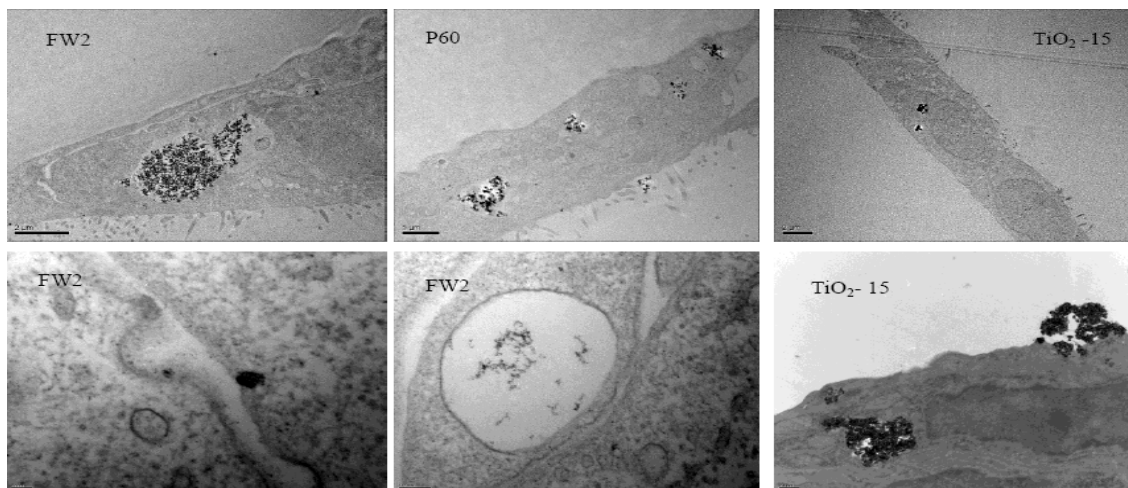
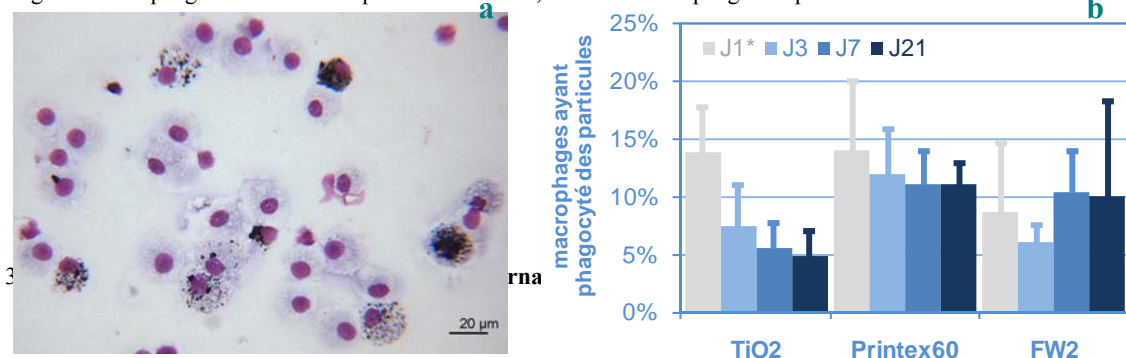


Fig 5: Images de microscope électronique à transmission de cellules LLC-PK₁ après 24 heures d'exposition à 5 µg/cm² de FW2, P60 et TiO₂ (études réalisées par l'équipe 6 LEPI). Images de microscope électronique à transmission de cellules IP15 après 24 heures d'exposition à 5 µg/cm² de FW2 et TiO₂ (études réalisées au centre de microscopie de Bordeaux2).

3.3 Etude de l'accumulation pulmonaire chez le rat

Dès 3 jours après l'exposition, une phagocytose des particules par les macrophages alvéolaires a été observée.

Fig 6a : macrophages alvéolaires empoussiérés au MO, b : % de macrophages empoussiérés.



L'étude des mécanismes d'internalisation des NP a été réalisée sur les cellules bronchiques humaines et sur les cellules rénales en utilisant de inhibiteurs des différentes voies d'endocytose en particulier la cytochalasine D qui inhibe la macropinocytose. Les résultats ci-dessous montrent que sur les cellules bronchiques l'internalisation se fait en partie seulement par macropinocytose en utilisant la méthode de mesure de l'internalisation par cytométrie en flux.

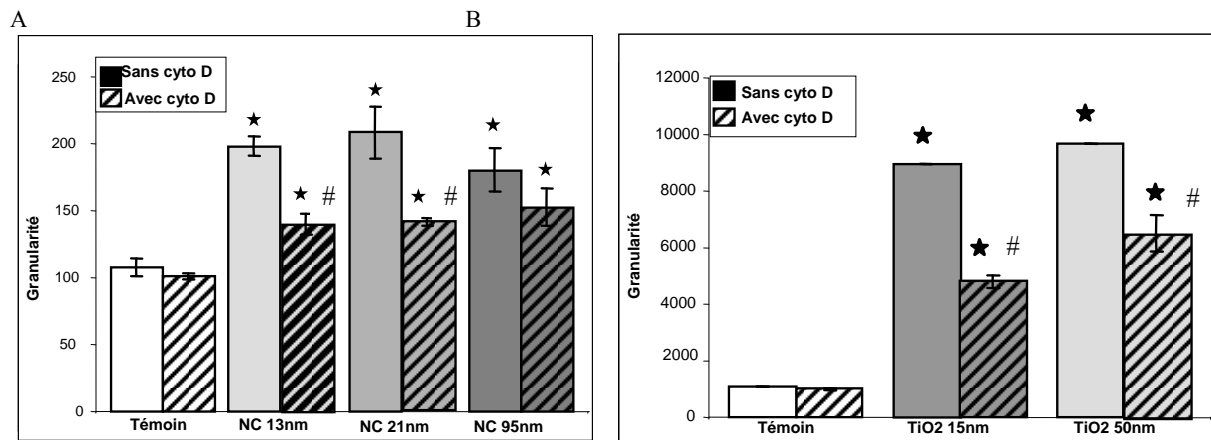


Fig.7 Effet de la cytochalasine D sur l'internalisation déterminé par cytométrie en flux en mesurant la diffraction de la lumière à 90° indicative de la granularité des cellules. Les cellules 16HBE sont prétraitées pendant 30 min avec de la cytochalasine D à 20µM puis exposées aux NP de (A) NC (13 nm, 21 nm, 95nm) 10 µg/cm² ou (B) TiO₂ (15nm, 50nm) à 5 µg/cm² pendant 3h30 en présence ou absence de cytochalasine D (n=3).

* Significativement différent du témoin respectif (p<0.05, ANOVA puis Dunetts t test)

Significativement différent des conditions sans cytochalasine D (p<0.05, ANOVA puis Dunetts t test)

4 Etude du stress oxydant et des réactions inflammatoires induites par les nanoparticules en relation avec leur taille, leur composition chimique et leur réactivité de surface. Interaction avec des cytokines et des enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

Cette étude a été réalisée *in vitro* sur les différents modèles cellulaires proposés et *in vivo* chez le rat normal ou après sensibilisation. Chez le rat, l'analyse des réponses a été effectuée à partir de lavages broncho-alvéolaires (LBA).

Une analyse du transcriptome après traitement des cellules bronchiques humaines par les NP de TiO₂ et de NC en utilisant la technique des microarrays (20 000 gènes) a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le département de radiobiologie du CEA (Dr S.Chevillard)

L'expression et la sécrétion des facteurs de l'inflammation a été recherchée sur les différents modèles *in vitro*. Une recherche de l'induction de l'apoptose par les NP de TiO₂ et de NC a également été effectuée.

4 1. Etude *in vitro* du stress oxydant induit par les NP sur les cellules bronchiques, endothéliales, rénales.

L'oxydation de l'hydroéthidine (HE) en éthidium, composé fluorescent, permet de suivre la production d'EAO intracellulaire par une analyse de l'intensité de fluorescence en cytométrie en flux.

Cette mesure a été réalisée sur des cellules 16 HBE exposées pendant 4h aux différentes NP (Fig. 8). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 400 µM) qui est une ERO est utilisé comme contrôle positif. Parmi les NP de carbone et de TiO₂, ce sont les plus petites (Fw2 et TiO₂ 15) qui induisent le plus d'effet.

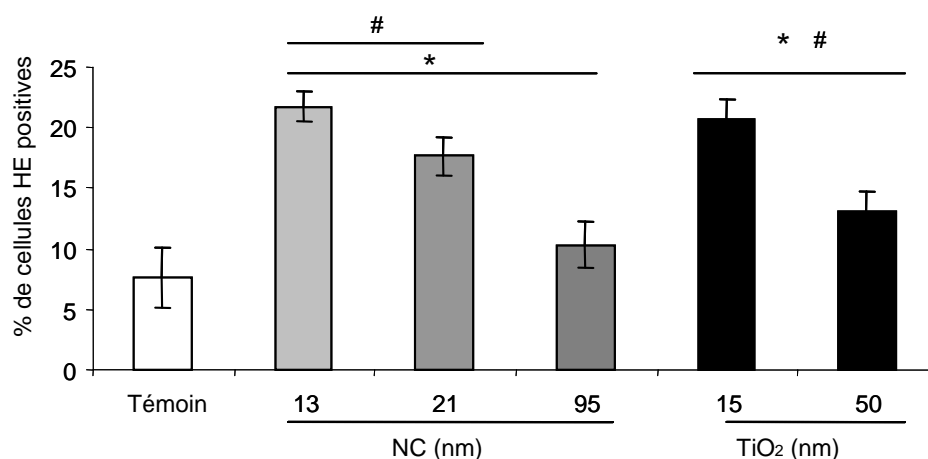


Fig 8 : Détection de la production intracellulaire d'espèces activées de l'oxygène par la mesure du % de cellules HE positives par cytométrie en flux. Les cellules 16HBE sont exposées aux NP de NC (13 nm, 21 nm, 95nm) ou TiO₂ (15nm, 50nm) à 20 µg/cm² pendant 4h (n=3).# Significativement différent du témoin (p<0.05, ANOVA puis Dunetts t test) * significativement différent entre eux (p<0.05, ANOVA puis Dunetts t test)

Sur les cellules endothéliales les particules les plus fines telles que les FW2 (13 nm) et les TiO₂ 15 induisent une augmentation de la production d'ERO beaucoup plus importante que les P60 (21nm) et de manière concentration dépendante après 4 h d'intoxication. Les particules métalliques induisent un stress oxydant très important dès les plus faibles concentrations Ces résultats montrent, également, que la cytotoxicité des NP (2,5-20 µg/cm²) semble être corrélée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Par contre, sur les cellules rénales, seules les NP FW2 (NP 13 nm) génère une **production** significative de **radicaux libres (ROS)** mesurée par le **test DCFH-DA** après 6 heures d'exposition à des concentrations de 1, 5 et 10 µg/cm² sur les 2 types cellulaires. En revanche, aux concentrations testées, P60 et TiO₂ n'ont pas induit de production significative de ROS.

Ces différents résultats montrent la capacité des NP les plus fines, en particulier les NP de NC 13nm et TiO₂ 15 nm à produire des ROS intracellulaires. Cependant, les réponses diffèrent selon les types cellulaires, ceci pouvant être lié à une plus ou moins grande capacité d'endocytose. Il est intéressant de noter qu'un test abiotique, le test DTT, a permis de montrer que si les NP génèrent des ROS dans ces conditions, ce n'était pas le cas des NP de TiO₂ qui doit donc être internalisé pour être à l'origine d'un stress oxydant.

4.2 Réponse inflammatoire induite par les NP sur les modèles cellulaires in vitro

Elle a été recherchée sur la lignée bronchique humaine 16HBE, sur les deux lignées de cellules rénales et sur les cellules endothéliales. La sécrétion des cytokines a été tout d'abord mesurée par dosage Elisa. Puis, l'observation d'artefacts pour certaines NP, les cytokines s'adsorbant à leur surface, ce qui conduisait à sous estimer le résultat, la détection des ARN m a été réalisée par Q PCR et le dosage des cytokines intracellulaires.

Là encore les réponses diffèrent selon les NP et les types cellulaires :

Sur les cellules bronchiques humaines, les NP de TiO₂ 15nm et de NC 13 nm, aux concentrations les plus élevées, induisent une augmentation de l'expression du GM CSF, de l'IL6 et du TNF α, le dosage des protéines intracellulaires semble être le meilleur critère. Pour les cellules rénales, les études réalisées par des **tests ELISA** pour mesurer l'inflammation n'ont **pas montré de production de cytokines IL6** (sur cellules LLC-PK₁) et **IL8** (sur cellules IP15) avec des valeurs inférieures à la significativité pour l'IL8. Enfin, sur les cellules endothéliales, après 24 h d'exposition avec des concentrations en NP non cytotoxiques, il apparaît, que les NP de carbone et de TiO₂ induisent une augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 par rapport aux cellules témoins et que ce phénomène inflammatoire semble être corrélé à la production d'ERO.

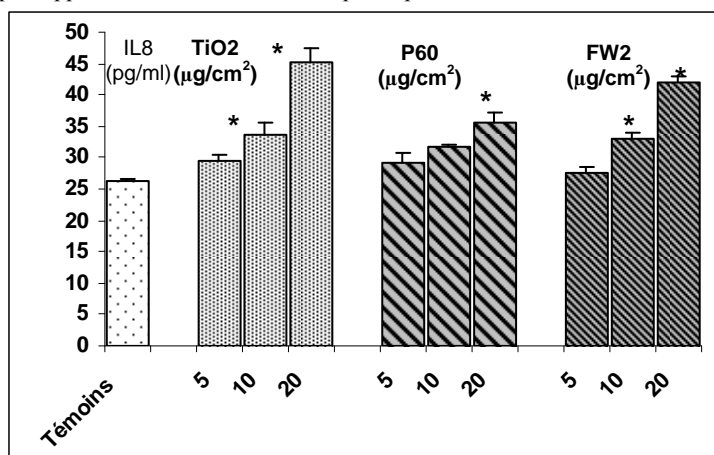


Fig 9 : Evaluation de la réponse pro-inflammatoire après 24 h d'intoxication des cellules endothéliales par les différents types de NP *, p<0,05.

4.3. Analyse du transcriptome des cellules bronchiques humaines pour la recherche de marqueurs spécifiques de stress.

Dans un premier temps, l'approche transcriptomique basée sur la détection d'un large nombre de gènes par la technique des macro-arrays avait été proposée pour analyser l'expression différentielle des gènes dans les différents types cellulaires utilisés. Durant le déroulement du projet, il a semblé plus pertinent pour l'ensemble des partenaires de s'orienter vers la technique des micro-arrays ou « puce à ADN ». La finalité, conservée par rapport au projet initial, étant de proposer des voies de signalisation impliquées dans la réponse cellulaire aux nanoparticules et de sélectionner quelques gènes d'intérêts pour lesquelles des vérifications pourraient être réalisées par RT-qPCR dans un deuxième temps. L'utilisation du microarray (20 000 gène) réalisée en collaboration avec l'équipe de S.Chevillard (CEA) a montré la sur ou sous expression de nombreux gènes dont plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire aux nanoparticules de noir de carbone FW2. Par

exemple, des gènes impliqués directement ou indirectement dans la régulation de l'expression de l'IL6 trouvée surexprimée ont été détectés. L'ensemble des informations obtenues avec cette étude sur micro-array est en cours d'analyse.

4.4 Réponse inflammatoire in vivo sur des rats normaux, asthmatiques, et BPCO

a) L'objectif a été d'évaluer sur rat sain ou sensibilisé au pollen, l'impact pulmonaire des nanoparticules manufacturées (TiO₂, noir de carbone - Printex 60 et FW2) ou de suies issues d'un processus de combustion de l'hexane en utilisant comme critère la réponse inflammatoire

- Les particules ont montré une faible toxicité chez les rats sains dans nos conditions expérimentales, FW2 étant la particule induisant l'inflammation la plus marquée.
- Dans le modèle de rat sensibilisé, seul le noir de carbone FW2 a montré un léger effet adjuvant sur l'allergie. Une réponse inflammatoire cellulaire a été observée chez les animaux sensibilisés en particulier quand ils étaient conjointement traités par les particules.
- Les suies issues de la combustion de l'hexane induisent une faible réponse inflammatoire et semblent posséder un pouvoir adjuvant marqué sur la réponse allergique.

En conclusion les nanoparticules à base de carbone (noir de carbone FW2, suies) apparaissent capables d'induire des effets pulmonaires inflammatoires quelques jours après instillation intratrachéale de 100 ou 400 µg chez le rat et semblent également augmenter l'intensité de la réponse allergique au pollen. Le dioxyde de titane nanométrique en revanche, n'a pas présenté de toxicité significative dans nos conditions expérimentales.

b) Le deuxième objectif in vivo était d'examiner si l'effet inflammatoire pulmonaire des NP est potentialisé dans un modèle d'emphysème (induit par l'élastase chez le rat) composant majeur de la bronchopneumopathie chronique obstructive.

Des rats Sprague-Dawley ont reçu une instillation intratrachéale d'élastase, puis 7 jours après, une instillation intratrachéale de 100 µg de FW2 ou de TiO₂ 15 nm. Un groupe d'animaux a été sacrifié un jour après l'instillation de NP, pour évaluer leur effet inflammatoire aigu (examen histologique, analyse de la cellularité du liquide de lavage bronchoalvéolaire et dosage des cytokines proinflammatoires dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire), et un autre groupe a été sacrifié 14 jours après l'instillation de NP pour quantifier l'emphysème.

Les résultats montrent :

1) un effet inflammatoire aigu des NP de FW2, mais présent seulement à l'analyse histologique, et

2) une absence de potentialisation de l'emphysème par l'instillation des NP.

En conclusion de ces études préliminaires in vivo, il apparaît que ce sont les NP de carbone qui possèdent à la fois un potentiel pro-inflammatoire et un pouvoir adjuvant sur la réponse allergique avec cependant des modulations selon le mode de production de ces suies et donc leur réactivité de surface.

4.5. Etude de l'expression de marqueurs du remodelage bronchique sur des fibroblastes pulmonaires humains après traitement par les NP

L'objectif a été d'examiner l'effet des NP sur des fibroblastes pulmonaires humains, acteurs majeurs du remodelage de la MEC, en examinant l'effet des NP sur l'expression de facteurs impliqués dans le remodelage de la MEC : métalloprotéases matricielles (MMPs), alpha-actine (α-SMA) et procollagène I.

L'étude montre que les particules de TiO₂ entraînent une diminution significative de l'expression du procollagène I et de l'α-SMA. Cet effet est accompagné par une surexpression de MMP-1 qui s'est révélée significative pour les plus fines particules de TiO₂ (15nm). Les plus fines particules de TiO₂ sont capables d'induire une augmentation de l'expression de la SOD2 sans affecter l'expression de HO-1. Enfin, un traitement au TGF-β ne permet pas aux cellules, pré stimulées 24 heures aux NP de TiO₂, de retrouver un profil d'expression des marqueurs de fibrose comparable à celui des cellules non pré traitées aux NP.

Ces résultats montrent que les NP de TiO₂ ne sont pas cytotoxiques pour les fibroblastes et qu'elles induisent un phénotype « antifibrosant ».

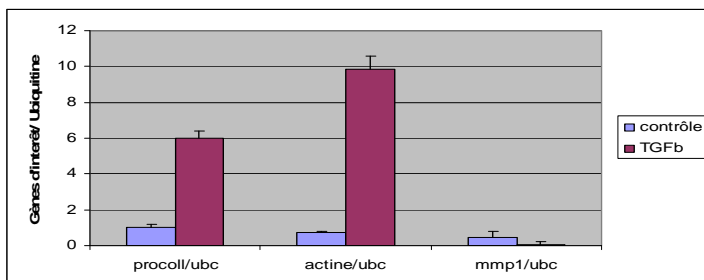


Fig10: Etude, par RT-PCRq, de l'expression en ARNm de l'α-SMA, du procollagène-1 et de MMP-1 par les cellules MRC-5 après 6 heures de stimulation au TGF-β. Une étoile signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin d'après l'analyse de variance suivi d'un test Kruskal-Wallis (p<0,05, moyenne ±SEM N=4) Il me semble qu'il manque les étoiles.

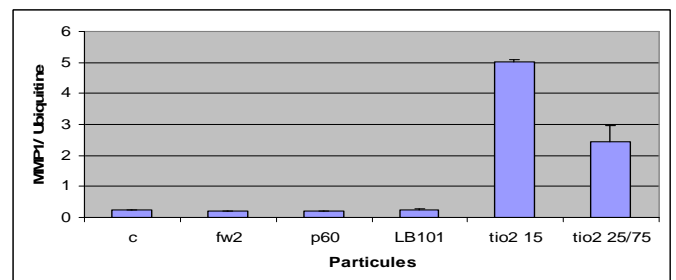


Fig11 : Etude, par RT-PCRq, de l'expression en ARNm de l'α-SMA, par les cellules MRC-5 après 48 heures de stimulation aux différentes NP à 20µg/cm². Une étoile signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin d'après l'analyse de variance suivi d'un test Kruskal-Wallis (p<0,05, moyenne ±SEM N=4) Il me semble qu'il manque les étoiles.

4.6. Etude de l'impact des NP de carbone ou d'oxyde de titane sur la fonction vasomotrice (fonctions contractile et relaxante) des artères pulmonaires intralobaires isolées chez le rat .

Nous avons pu montrer, par une approche *in vitro*, que les nanoparticules de carbone sont capables d'interagir fortement avec divers agents pharmacologiques ce qui a pour conséquence de diminuer de manière significative l'activité biologique de ces derniers. Par ailleurs les NP de carbone sont également capables d'induire une relaxation des vaisseaux précontractés par le Chlorure de Potassium. Cet agent, en dépolarisant la membrane plasmique des cellules musculaires lisses, entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants ce qui conduit à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique et aboutit à la contraction des vaisseaux. L'effet relaxant produit par les NP pourrait être dû à une perturbation de ces canaux calciques voltage-dépendants et/ou une perturbation de la sensibilité de l'appareil contractile au calcium intracellulaire. Par contre une exposition de 24 heures des artères pulmonaires en présence de nanoparticules d'oxyde de titane ou de carbone ne modifie pas la réactivité de ces vaisseaux. Enfin, l'exposition *in vivo* aux NP de carbone issues d'une flamme pauvre en oxygène altèrent la voie de relaxation du monoxyde d'azote dans l'artère pulmonaire chez le rat.

D. Discussion et conclusion

Les objectifs initiaux du projet étaient :

- a) dans une phase préalable de « screening » de la cytotoxicité des nanoparticules, de déterminer l'importance des caractéristiques physicochimiques : taille, composition, réactivité de surface et si les réponses différaient en fonction du type cellulaire. Cette phase a été rigoureusement préparée avec l'utilisation des mêmes NP caractérisées et des mêmes protocoles expérimentaux. Elle a permis :
 - de classer les tests de cytotoxicité en fonction de leur sensibilité : le test IP est plus sensible que le test WST1.
 - de montrer qu'effectivement les plus petites NP de même composition chimique étaient les plus cytotoxiques.
 - de montrer que la composition chimique jouait également un rôle ainsi que la solubilité.
 - que les cellules cibles choisies étaient plus ou moins sensibles aux NP, ce qui signifie que le choix d'un test de cytotoxicité simple sur une lignée cellulaire standard pour un classement des NP n'est sans doute pas pertinent. .

Pour continuer cette première phase, il faudrait tester un nombre plus grand de particules et standardiser les essais afin d'établir une batterie de tests.

b) la seconde étape a été de déterminer les capacités d'accumulation des nanoparticules dans l'appareil respiratoire et, plus généralement dans des cellules cibles, épithéliums, endothélium, macrophages, ainsi que leur transfert et leur impact sur le rein, organe d'élimination. Des méthodes de détection devaient être mises au point et des comparaisons faites entre les différents types cellulaires et les différentes particules en fonction de la taille, de la composition chimique. Une méthode de quantification par cytométrie en flux a été mise au point et a permis de montrer des cinétiques d'accumulation en comparant les NP. Cette méthode a également permis de mettre en évidence l'importance de la macro-pinocytose dans les processus d'internalisation. La MET a complété ces données en mettant en évidence qu'environ 80 à 90 % des cellules *in vitro* internalisaient les NP et que, selon leur nature, elles pouvaient se trouver exclusivement dans des vésicules sous forme d'agrégats denses NP de TiO₂ ou parfois isolées dans le cytoplasme (NP de noir de carbone) voire le noyau. Aucune NP n'a été vue dans les mitochondries. Il reste cependant à déterminer les mécanismes moléculaires de l'internalisation ainsi que les transferts potentiels qui n'ont pas pu être étudiés faute de NP marquées.

- b) la troisième étape a été la recherche des effets pro-oxydants et pro-inflammatoires des NP ainsi que des effets potentiels des nanoparticules sur des pathologies inflammatoires du poumon, BPCO, asthme.

Des réponses ont été fournies qui méritent d'être approfondies. Il a été montré :

- Que les NP induisent bien l'augmentation intracellulaire d'ERO dans les différents modèles cellulaires testés et que plus elles sont petites, plus la réponse est forte. Cependant, alors que les NP de Noir de carbone peuvent produire des ERO en condition abiotique, ce n'est pas le cas des NP de TiO₂. Pourtant, après internalisation, la production d'ERO est similaire. Il existe donc des mécanismes moléculaires spécifiques pour chaque type de NP qui restent à déterminer.
- Que la réponse pro-inflammatoire est variable selon le type cellulaire choisi et le type de cytokine mesuré. Un point important a été la mise en évidence d'une adsorption de ces protéines sur les NP, adsorption qui dépend du type de NP. Ceci rend les résultats des dosages dans le milieu difficiles à interpréter. Pour cette évaluation, il est préférable de mesurer la modulation de l'expression des gènes et/ou les cytokines intracellulaires. Les réponses chez l'animal sont également variables et méritent d'être approfondies par une étude plus systématique.
- Que certaines NP de noir de carbone jouent un rôle d'adjuvant dans la réponse à l'allergène.

- c) Enfin des études non initialement programmées ont donné des résultats prometteurs qui doivent être approfondis :

- **Un résultat interpellant concerne l'effet fibrosant des NP sur les fibroblastes pulmonaires.** Au vu de la littérature, nous étions parti de l'hypothèse que les NP de TiO₂ étaient potentiellement pro-fibrogéniques. Dans l'objectif de comparer cet effet à celui des NP de NC de différentes tailles, l'expression de différents marqueurs de fibrose a été étudiée. **Il ressort de cette étude que les NP de NC, quelque soit leur taille, n'ont aucun effet sur l'expression des marqueurs analysés (procollagène-1, α -SMA, MMP-1) cependant les NP de TiO₂ ont**

induit une diminution de l'expression des marqueurs de fibrose (procollagène et α -SMA) associée à une surexpression de MMP-1 (ou collagénase 1) enzyme chargée de dégrader la MEC. Il est important de noter que cet effet est dissocié d'un effet cytotoxique. Les études in vitro et in vivo ont donc permis de montrer des effets différents des NP de noir de carbone et de TiO₂ en fonction de la nature chimique et de la taille. Ainsi, les NP de TiO₂ apparaissent comme induisant un profil colagénolytique dans les fibroblastes pulmonaires in vitro, alors que les NP de noir de carbone de petite taille (FW2) induisent un effet cytotoxique in vitro et inflammatoire in vivo. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets.

➤ **Un autre résultat intéressant concerne les effets des NP sur la vasomotricité pulmonaire :**

Au contraire des NP d'oxydes de titane, les NP de carbone modifient le tonus vasculaire des artères intrapulmonaire chez le rat. Certaines de ces modifications ont pu être attribuées à une interaction directe des NP avec les agents utilisés, modifiant l'activité biologique de ces derniers. Il semble important de prendre en compte cette observation dans la mesure où de telles interactions peuvent conduire à une mauvaise interprétation des résultats expérimentaux. Cependant, les résultats obtenus, à la fois au niveau des vaisseaux isolés et sur les cellules endothéliales, suggèrent que les NP exercent un effet délétère sur l'homéostasie vasculaire ce qui pourrait contribuer au déclenchement ou à l'aggravation de pathologies cardiovasculaires.

Le projet NANOTOX a démarré il y a trois ans à une période où de nombreuses interrogations se posaient sur les dangers et les risques des nanomatériaux. Il a été proposé essentiellement pour répondre aux questions concernant les dangers à l'aide d'une approche pluridisciplinaire associant des chimistes, des métrologistes, des toxicologues, des physiologistes. Cette approche a été fructueuse puisqu'un nombre conséquent de publications et de présentations dans des congrès associe plusieurs partenaires.

L'apport des chimistes a été de mettre en évidence pour les biologistes l'importance de la caractérisation des NP, en particulier de leur réactivité de surface. Cette caractérisation est essentielle pour toute interprétation biologique ultérieure.

L'approche comparative sur les différentes cibles cellulaires a permis de montrer des éléments communs dans la réponse toxique : la confirmation du rôle de la taille, du stress oxydant dans la toxicité. Par contre, les résultats sont plus contrastés sur la réponse inflammatoire avec de fortes différences selon la cible. L'importance de l'internalisation des NP dans l'apparition d'un stress oxydant et dans la réponse inflammatoire a été mise en évidence mais les mécanismes moléculaires associés sont encore peu clairs. Il est vraisemblable qu'ils sont différents selon le type cellulaire et le type de NP. Ceci mets l'accent sur le danger d'une approche trop réductrice de l'évaluation de la toxicité des NP. Une évaluation à des fins réglementaires se devra d'être multiparamétrique.

Les études in vivo sont restées encore préliminaires mais conclues à un effet de certaines des NP testées, en particulier dans les modèles de pathologie respiratoire. Cependant, le mode d'exposition retenu par injection intratrachéale devra être complété par des expositions plus réalistes à condition de pouvoir générer un aérosol bien contrôlé.

En conclusion, ce projet de recherche a apporté de nombreuses données méthodologiques, chimiques, toxicologiques, physiologiques. Il a également ouvert de nombreuses pistes de recherche qu'il faudra poursuivre.

Il a commencé à être valorisé par 9 publications internationales dans des revues à comité de lecture dont 5 sont publiées et 1 sous presse, 2 en révision, 1 soumise ainsi que de nombreuses communications et présentations dans des congrès nationaux et internationaux. D'autres publications sont en cours de rédaction dans le cadre de 4 thèses dont une déjà soutenue à Lausanne (Ary Setyan 2009).

Principales publications obtenues :

1. Val S., Hussain S., Boland S., Hamel R., Baeza A., Marano F. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need of multiparametric evaluation due to adsorption artefacts toxicity in bronchial epithelial cells

Inhalation Toxicology , 21, 1037-1044 (2009)

2. Hussain S., Vanoirbeek J.A.J, Boland S., Thomassen L., Abid J.P., Marano F., Nemery B., Hoet P.H.M. Gold and titanium dioxide nanoparticles reduce dermal sensitization to isocyanate in mice

Toxicology Letters, en révision

3. Hussain S., Boland S., Baeza A., Hamel R., Billon-Galland MA., Fleury-Feith J., Moisan F., Pairon JC., Marano F. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide : role of particle surface area and internalized amount .

Toxicology, 260, 142-149, (2009)

4. Courtois A., Andujar P., Ladeiro Y., Baudrimont I., Delannoy E., Leblais V., Begueret H., Billon Galland M.A., Brochard P., Marano F., Marthan R., Muller B. Impairment of NO-dependent relaxation in intralobar pulmonary arteries: Comparison between Urban Particulate Matter and manufactured nanoparticles. **Environ. Health Perspect. 116(10):1294-9, 2008.**

5. Courtois A. Andujar P., Ladeiro Y., Ducret T., Rogerieux F., Lacroix G., Baudrimont I., Guibert C., Roux E., Brochard P., Marano F., Marthan R., Muller B. Effect of engineered carbon nanoparticles on vasomotor responses in rat intrapulmonary artery. **Tox Appl Pharmacol, En révision .**

6. P. Andujar, S. Lanone, P. Brochard, and J. Boczkowski. Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. **Rev. Mal. Respir. Sous presse.**

7..L'Azou B, Ohayon-Courtès C, On D, Passagne I, Cambar J, Brochard P: In vitro effects of nanoparticles on renal glomerular mesangial and tubular epithelial cells. **Toxicology letters 2007, 172 (1, 7): S68.**

8. L'Azou B., Jorly J., On D., Sellier E., Moisan F., Fleury-Feith J., Cambar J., Brochard P., Ohayon-Courtès C. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. **Particle and Fibre Toxicology**, 2008, 5: 22.

9. Setyan, J.-J. Sauvain and M.J. Rossi, The use of Heterogeneous Chemistry for the Characterization of Functional Groups at the Gas – Particle Interface of amorphous carbon, Diesel, hexane flame soot and TiO₂ Nanoparticles, **soumis à Physical Chemistry Chemical Physics.**

Articles de vulgarisation:

F.Marano :

1. « A-t- on raison de considérer que les particules atmosphériques fines et ultrafines sont dangereuses pour la santé ? »
Editorial Extrapol 2007

2. « Nanoparticules : quels risques ? » **Quotidien du médecin 2008**
« Quels sont les problèmes posés par l'évaluation des risques des nanoparticules sur la santé? »

3. ADSP 2008

« Nanotechnologies : les enjeux et les risques pour la santé et l'environnement » **Encyclopédia Universalis 2008**