



HAL
open science

Capacité de modèles *in vitro* de complexité différente à prédire les réponses toxiques pulmonaires observées *in vivo* après exposition aiguë à des nanoparticules de TiO₂ et de CeO₂

Thomas Loret

► To cite this version:

Thomas Loret. Capacité de modèles *in vitro* de complexité différente à prédire les réponses toxiques pulmonaires observées *in vivo* après exposition aiguë à des nanoparticules de TiO₂ et de CeO₂. Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Technologie de Compiègne, 2017. Français. NNT : 2017COMP2358 . tel-01630236

HAL Id: tel-01630236

<https://theses.hal.science/tel-01630236>

Submitted on 7 Nov 2017

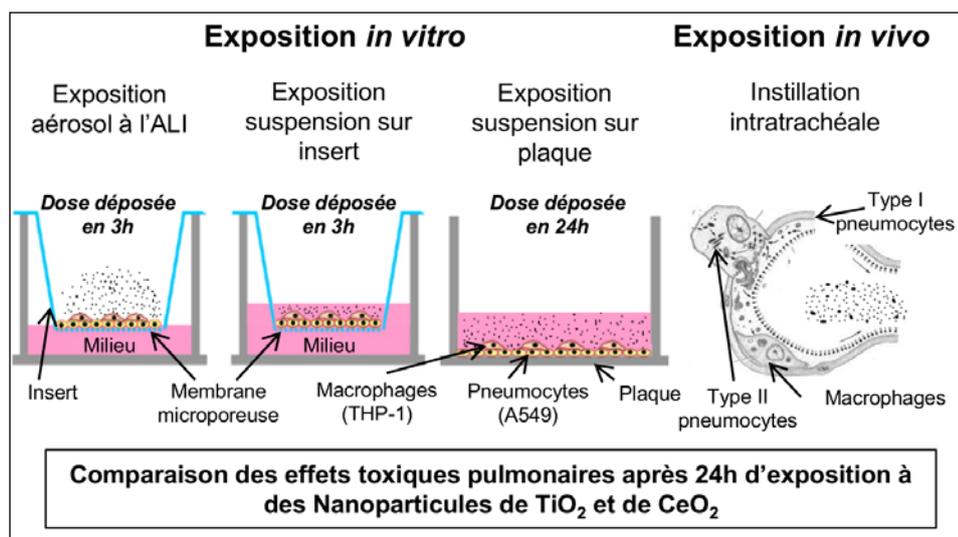
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

Par **Thomas LORET**

Capacité de modèles in vitro de complexité différente à prédire les réponses toxiques pulmonaires observées in vivo après exposition aiguë à des nanoparticules de TiO₂ et de CeO₂

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 20 mars 2017

Spécialité : Biomatériaux et Bio-ingénierie : Unité de Recherche Biomécanique et Bio-ingénierie (UMR-7338)

D2358

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

Par

Thomas LORET

**CAPACITE DE MODELES *IN VITRO* DE COMPLEXITE
DIFFERENTE A PREDIRE LES REPONSES TOXIQUES
PULMONAIRES OBSERVEES *IN VIVO* APRES EXPOSITION
AIGUË A DES NANOPARTICULES DE TiO_2 ET DE CeO_2**

Spécialité : Biomatériaux et Bio-ingénierie

Soutenue le : 20 mars 2017

Membres du jury :

| | |
|---|-----------------------|
| Dr Sonja Boland, Université Paris Diderot | Rapporteur |
| Pr Jérémie Pourchez, ENS Mines de Saint-Étienne | Rapporteur |
| Pr Muriel Vayssade, UTC | Examineur |
| Dr Anne Van der Meeren, CEA | Examineur |
| Dr Frédéric Cosnier, INRS | Examineur |
| Pr Christophe Egles, UTC | Directeur de thèse |
| Dr Ghislaine Lacroix, INERIS | Co-directeur de thèse |

Unités de rattachement

Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS)
Unité de toxicologie expérimentale (TOXI), Pôle dangers et impact sur le vivant (VIVA),
Direction des risques chroniques (DRC).
Parc Technologique ALATA - BP 2
F-60550 Verneuil-en-Halatte, FRANCE

Université de technologie de Compiègne (UTC)
Laboratoire Biomécanique et Bioingénierie (BMBI), UMR CNRS 7338
Centre de Recherche de Royallieu
60205 Compiègne, FRANCE

Financements

Cette thèse a été financée par l'Institut National de l'Environnement industriel et des RISques (INERIS) et le Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer (programme 190).



Les expérimentations, les déplacements et les communications ou publications réalisées dans le cadre du projet européen NANoREG ont reçu un financement de la part de la commission européenne (EU-FP7).



A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials

Résumé

Les nanoparticules (NPs) représentent un danger potentiel pour la santé des travailleurs et du grand public, notamment en cas d'exposition par voie respiratoire. Si une NP est évaluée *in vivo* comme toxique chez l'animal, cela peut inciter à prendre des mesures pour réduire l'exposition de l'Homme à celle-ci, avant qu'il y ait des conséquences sanitaires graves. Les études *in vivo* sont donc d'une importance capitale afin de diminuer les potentiels risques sanitaires des NPs pour l'Homme. Néanmoins, dans un contexte de réduction du nombre d'animaux utilisés et compte tenu du nombre important de NPs existantes et de leur grande diversité physico-chimique, la toxicologie a besoin de modèles alternatifs, comme le *in vitro*, permettant de prédire de manière fiable les potentiels effets pulmonaires chez l'Homme. Des progrès importants ont été faits pour développer des modèles *in vitro* pulmonaires plus physiologiques et des méthodes d'exposition permettant de simuler l'inhalation de NPs *in vitro*. Cependant, des incertitudes existent quant à la capacité de ces nouveaux modèles *in vitro* à prédire les réponses observées *in vivo* dans les poumons après exposition à des NPs.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'évaluer la capacité de plusieurs méthodes *in vitro*, de complexité différente, à prédire les effets toxiques observés *in vivo* chez le rat après exposition aiguë (24h) pulmonaire à des NPs métalliques faiblement solubles de TiO₂ et de CeO₂. Dans un premier temps, des expérimentations *in vitro* ont été effectuées afin d'évaluer si exposer des cellules alvéolaires à l'interface air-liquide (ALI) à des aérosols de NPs de TiO₂ et de CeO₂, génère des résultats différents par rapport à des expositions classiques à des suspensions en submergé. Dans un second temps, des expérimentations *in vivo* par aspiration intratrachéale ont été réalisées afin de comparer les réponses toxiques pulmonaires *in vitro* avec celles obtenues *in vivo*. Pour comparer les réponses pulmonaires *in vivo* et *in vitro*, des référentiels de dose similaires, notamment la masse par unité de surface ou par macrophage, ont été utilisés.

Après 24h d'exposition, des réponses biologiques significatives (inflammation principalement) ont été observées *in vitro* à des doses inférieures à l'ALI par rapport au submergé. Nous avons par ailleurs souligné la nécessité de prendre en compte les doses réellement déposées sur les cellules ainsi que le débit de dose pour effectuer les comparaisons entre les deux méthodes d'exposition *in vitro* utilisées. Nous avons ensuite comparé les résultats *in vitro* avec ceux obtenus *in vivo*. Nous avons constaté que la méthode ALI génère des résultats plus prédictifs du *in vivo*, en termes de niveau d'activation des réponses toxiques à 24h. Finalement, nous avons établi un classement des quatre NPs utilisées dans notre étude et celles-ci ont été classées similairement *in vivo et in vitro* et quelle que soit la méthode utilisée *in vitro*. Nous avons par ailleurs montré l'importance de considérer la surface active des NPs pour établir ce classement.

En conclusion, notre approche nous a permis de mieux évaluer le fossé existant entre le *in vivo* et le *in vitro*. Nos résultats soulignent l'intérêt d'utiliser des méthodes *in vitro* plus réalistes et plus proches de la physiologie humaine dans le but de modéliser les potentiels effets indésirables des NPs pour l'Homme. Cela ouvre des perspectives quant à l'utilisation et au développement de méthodologies *in vitro* de plus en plus représentatives des conditions d'exposition *in vivo*.

Mots clés : Nanoparticules, toxicité respiratoire, *in vitro*, *in vivo*, alternative à l'expérimentation animale, interface air-liquide

Abstract

Nanoparticles (NPs) represent a potential danger for workers and public, especially after inhalation. When a NP is shown toxic for the lungs *in vivo* in animals, this can incite regulators to implement measures to reduce human exposure risks. The *in vivo* studies are thus of utmost importance in reducing the potential health risks for humans. However, in a context of a diminution in the number of animals used in experimentations and considering the high number of NPs used and their physicochemical diversity, there is an urgent need for alternative methods, like the *in vitro*, which could be used to predict the potential health effects of NPs in human. Many progresses have been made recently to develop more physiological cell models and exposure methods simulating the inhalation of NPs *in vitro*. Nevertheless, uncertainties remain regarding the capacity of these new *in vitro* methods to predict the biological responses observed *in vivo* into the lungs after exposure to NPs.

In this context, the aim of our study was to assess the ability of several *in vitro* methods, differing in complexity, to predict the adverse responses observed *in vivo* in rat lungs after acute exposure (24h) to several metallic and poorly soluble TiO₂ and CeO₂ NPs. For this, *in vitro* experimentations were first performed to assess if exposing alveolar cells in monoculture or in co-culture at the ALI interface to aerosols of NPs, generated different results compared to classic exposure in submerged conditions to suspensions. In a second step, rats were exposed by intratracheal aspiration of NP suspensions to compare the biological responses *in vitro* to those obtained *in vivo*. To compare the pulmonary responses *in vivo* and *in vitro*, similar dose metrics were selected, including the mass per surface unit or per macrophage.

After 24h of exposure, significant biological responses (mostly inflammation) were observed at lower doses at the ALI compared to in submerged conditions. Moreover, we highlighted the necessity to take into account the deposited dose on the cells and the timing of the dose delivery in order to compare the two exposure methods used *in vitro*. When we compared the responses *in vitro* to those observed *in vivo*, we noticed that the ALI methods generated more predictive results than the submerged one, in term of biological activation levels after 24h of exposure. Finally, a ranking of the four NPs used in our study was provided and the NPs were ranked similarly both *in vivo* and *in vitro* and whatever the exposure method used *in vitro*. We also showed the importance of the surface area when ranking the poorly soluble NPs.

In conclusion, the gap existing between the *in vivo* and the *in vitro* has been evaluated in our study. Our results highlighted the relevance of using more realistic *in vitro* exposure methods to model the potential adverse effects of NPs for human. This brings perspectives about using and developing *in vitro* methods mimicking more closely the *in vivo* exposure conditions.

Key words: Nanoparticles, pulmonary toxicity, *in vitro*, *in vivo*, alternative to animal experimentation, air-liquid interface

Liste des publications et communications

Articles présentés dans le manuscrit

Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Aguerre-Chariol O, Bressot C, le Bihan O, Amodeo T, Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G.

Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Particle and Fibre Toxicology*, 2016.

Loret T, Rogerieux F, Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G.

Predicting the *in vivo* pulmonary toxicity induced by acute exposure to poorly soluble nanomaterials by using advanced *in vitro* methods. Soumis dans le journal *Nanotoxicology*.

Articles non présentés dans le manuscrit

Loret T, Hullo M, Rey N, Blazy K, Dubreuil M, Braun A, Egles C, Lacroix G.

Influence of the dispersion protocol used on the toxicological profile *in vitro* of several poorly soluble NMs. En préparation.

Loret T, Rogerieux F, Gamez C, Blazy B, Robidel F, Lecomte A Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G.

Coating and surface area are critical parameters in lung induced persistent inflammatory response by poorly soluble NMs. En préparation.

Relier C, Dubreuil M, Garcia OL, Cordelli E, Mejia J, Eleuteri P, Robidel F, Loret T, Pacchierotti F, Lucas S, Lacroix G, Trouiller B.

Study of TiO₂ P25 nanoparticles genotoxicity on lung, blood and liver cells in lung overload and non-overload conditions after repeated respiratory exposure in rats. *Toxicological sciences*, 2017.

Kooter I..., Loret T..., Lacroix G.

Air-liquid interface *in vitro* models for inhalation toxicology research: workshop report and recommendations. En préparation.

Communications orales :

Internationales

Loret T, Peyret E, Rogerieux F, Gamez C, Blazy B, Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G. Predicting toxic effects observed *in vivo* after acute exposure to poorly soluble and inhalable nanomaterials by using more complex *in vitro* models.

5th International Conference on Safe Production and Use of Nanomaterials (Nanosafe 2016), Grenoble, 7-10 novembre 2016.

Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Amodeo T, Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G.
Exposure of alveolar cells at the air-liquid interface to aerosols of metallic and non soluble nanomaterials gives different toxicity patterns compared to classic exposure with suspensions.
Air liquid interface workshop, Paris, 21 mars 2016.

Loret T, Peyret E, Amodeo T, Trouiller B, Egles C, Lacroix G.
An approach to evaluate which in vitro model and exposure method is more predictive for in vivo biological responses.
4th International Conference on Safe Production and Use of Nanomaterials (Nanosafe 2014), Grenoble, 18-20 novembre 2014.

Nationale

Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Amodeo T, Trouiller B, Egles C, Lacroix G.
Barrière pulmonaire et exposition air-liquide.
Groupe Interdisciplinaire pour l'étude des Effets environnementaux des Nanotechnologies (GIENS 2015), Luzarches, 27-29 octobre 2015.

Communication affichée

Internationale

Loret T, Peyret E, Rogerieux F, Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G.
A study to assess the ability of different in vitro exposure models to predict in vivo pulmonary adverse effects.
8th International Nanotoxicology conference (Nanotox 2016), Boston, 1-4 juin 2016.

Projet européen NANoREG (FP7), groupes de travail *vivo* et *in vitro* (Tasks 4.5 et 5.4).

Participation à l'écriture de trois livrables

D4.15. Protocol for inhalation exposure and choice of biological relevant endpoints.
D5.4. In vitro screening methodology to evaluate toxicity by inhalation.
D.5.5. In vitro-in vivo correlation studies for inhalation toxicity.

Présentations orales lors des réunions du consortium

Consortium meetings Nanoreg, May 2014, Paris, Nov 2014, Rotterdam, May 2015, Lisbonne, Nov. 2015, La Haye, Juin 2016, Bilbao.

Remerciements

Ces trois années de thèse, passées à l'INERIS au sein de l'unité de toxicologie expérimentale, ont été riches de défis à relever qui m'ont grandi énormément sur le plan professionnel comme personnel. Le projet s'est façonné au gré de rencontres, de questionnements, d'opportunités qui m'ont été données. Le fruit de ce travail n'aurait pu être ce qu'il est sans les nombreuses personnes qui y ont contribué, de près comme de loin, et que je souhaite aujourd'hui remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs et les examinateurs de ma thèse, le Dr Sonja Boland, le Pr Jérémie Pourchez, le Pr Muriel Vayssade, le Dr Anne Van der Meeren et le Dr Frederic Cosnier pour avoir accepté d'évaluer ce travail. C'est un plaisir de vous avoir dans mon jury!

Merci au Dr Sophie Lanone et au Pr Dominique Lison pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Vous avez consacré du temps à évaluer l'avancement de mon travail, m'aider, me conseiller et cela me touche beaucoup.

Un grand merci bien évidemment à Christophe et Ghislaine, mes directeurs de thèse, toujours disponibles, à l'écoute et sincères, qui ont su laisser planer autour de moi leur aura rassurante. Une mention particulière pour Ghislaine qui mise toujours sur les bons chevaux, mais qui aura quand même réussi à (presque) me faire perdre une dent tant elle m'a gâté de bonbons! Quelle chance j'ai eu de faire ma thèse avec toi, que cela soit d'un point de vue scientifique comme humain! Cette carie n'aura été que l'unique souffrance que tu m'auras infligée (et indirectement en plus). Que de bons moments nous avons passés, notamment en congrès européen ! Le mirage de la piscine de l'hôtel Holiday Inn de Bilbao me hantera toujours, mais m'aura permis de pratiquer mon espagnol, langue de mes ancêtres, avec les chauffeurs de taxis qui nous ont transportés chaque jour entre l'aéroport et le centre ville.

Merci aussi à ma hiérarchie qui m'a fait confiance et notamment à Anne Braun, ma responsable d'unité. C'est grâce à ton soutien que j'ai pu participer au projet européen NANoREG ainsi qu'à plusieurs congrès internationaux ou nationaux. Les échanges lors de ces événements m'ont apporté énormément, c'est pourquoi je t'en suis très reconnaissant.

Je remercie tous les membres de l'équipe TOXI. Kelly Blazy et Christelle Gamez avec qui j'ai apprécié travailler dans la bonne humeur sur les manips *in vivo*. Françoise Rogerieux et Bénédicte Trouiller qui ont été un soutien important, notamment grâce à leurs commentaires constructifs sur mon projet. Tous les thésards de TOXI que j'ai côtoyé avec grand plaisir pendant mon séjour à l'INERIS, Soafara Andrianome, Nihal Ouadah, Yasmina Wallace, Charlène Relier et Nicolas Petitdant, à qui je souhaite le meilleur pour la suite. Anne-Sophie Villegier, Brahim Selmaoui et René de Seze, de la partie Champs électromagnétique de l'équipe, que je remercie pour leur sympathie.

Je n'oublierais pas non plus tous les stagiaires ou intérimaires de TOXI avec qui j'ai interagi. J'aurais une pensée particulière pour Nicolas Rey et Marie Hullo, que j'ai encadré et qui se dirigent aujourd'hui vers la recherche en toxicologie. Je n'ai pas de doute sur le fait qu'on se reverra, mais j'espère qu'on retravaillera ensemble un jour! Merci aussi à Marielle Dubreuil qui a fait quelques manips *in vitro* avec moi. C'était très agréable de travailler en ta compagnie ! Je souhaite également le meilleur à Julie Peiffer et Ludivine Lusson.

Merci beaucoup aux filles et aux gars de l'animalerie, Stéphanie Rodrigues, Sophie Desmots, Franck Robidel, Anthony Lecomte et Emmanuel Peyret, qui m'ont accueilli avec bienveillance dans leur antre. Vous allez beaucoup me manquer, pour les bons moments passés et pour tous ce que vous m'avez appris, mais aussi pour les valeurs que vous véhiculez, votre franchise, votre humanité et votre humour!

J'aurais une pensée pour tous les participants du projet NANoREG avec qui j'ai pu échanger. J'étais tout stressé quand Ghislaine m'a emmené avec elle à Berlin (et en plus elle a failli rater l'avion) pour ma première sortie (sous la neige) et un workshop en janvier 2014 chez le BAUA. Mais l'accueil chaleureux qui nous a été offert m'a vite mis en confiance. C'est lors de ce meeting que nous avons lancé les bases de notre groupe de travail sur les expositions *in vitro* à l'interface air-liquide. J'en profite pour remercier tous les membres de la Task 5.4 et notamment Blanca Suarez, Felipe Goñi, Hannah Karlsson, Gunter Linsel, Dirk Broßell, Silke Steinborn et Maria Silva. Je n'oublierais pas de saluer au passage Frédéric Cosnier, Laurent Gaté et Valérie Fessard. Les consortiums meeting n'auraient pas été les mêmes sans vous!

Je remercie également tous les collègues de l'INERIS qui m'ont aidé dans mon projet. Plus particulièrement Olivier le Bihan, Christophe Bressot, Olivier Aguerre-Charriol et Tanguy Amodeo de chez NOVA ; Emeric Fréjafon et Jacques Bouillard de la DRC ; ou encore les membres de RESA qui ont effectué des analyses pour mon projet.

Merci à toutes les personnes que j'ai rencontré à l'INERIS, en congrès, ou encore à l'UTC, avec qui j'ai passé de très bons moments. Et bon courage et bonne chance à tous les thésards qui soutiendront leur thèse bientôt!

Merci à tous les aficionados du foot de l'INERIS. Les matchs du mercredi midi vont beaucoup me manquer. Je garderais des bons souvenirs de vous tous et de nos matchs passés dans le fair-play et la bonne humeur. Le match durant la canicule et en plein cagnard restera pour moi un moment à part (35°C à l'ombre)! Ce sera avec la plus grande fierté que je dirais plus tard à mes petits enfants que j'y étais! Il ne me reste plus qu'à vous souhaiter bons matchs, et bon tournoi 2017! En espérant que VIVA réussisse à récupérer son titre de champion cette année.

J'adresse mes profonds remerciements à toute ma famille et ma belle-famille. Il n'y a pas plus rassurant que de se sentir aimé et j'espère être à la hauteur de tout ce que vous m'apportez. C'est avec la plus grande fierté que je rentre dans le clan des docteurs en science de la famille, mais je n'y serais jamais arrivé sans vous! Et je suis certain que je ne serais pas le dernier à en faire partie!

Et enfin je souhaiterais dédier cette thèse à ma femme Camille. C'est grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui. Et heureux d'y être! Tu réussiras toujours à me faire faire des trucs que je n'aurais peut-être jamais osés! Je t'aime.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Introduction | 19 |
| Contexte | 22 |
| 1. Les Nanomatériaux : généralités | 22 |
| 1.1 Définitions..... | 22 |
| 1.2 Propriétés d'intérêt et utilisations | 22 |
| 1.3 Les NPs de TiO ₂ et CeO ₂ | 26 |
| 2. Potentielle exposition de l'Homme aux NMs..... | 29 |
| 2.1 Relargage et comportement des NMs dans l'environnement | 29 |
| 2.2 Cas particuliers des expositions sur le lieu de travail | 33 |
| 2.3 Voies d'exposition possibles..... | 33 |
| 3. Comportement des NMs inhalés au niveau de l'arbre respiratoire..... | 35 |
| 3.1 Anatomie générale de l'arbre respiratoire..... | 35 |
| 3.2 Dépôt des NMs au niveau des poumons | 38 |
| 3.3 Interactions entre NMs et cellules alvéolaires | 39 |
| 4. Inhalation de NMs et potentiels effets sanitaires chez l'Homme | 42 |
| 4.1 NMs et effets sur la santé humaine | 42 |
| 4.2 Particules Fines et effets sur la santé humaine..... | 42 |
| 4.3 Les études de toxicologie : une nécessité pour évaluer les effets sanitaires chez l'Homme après inhalation de NMs | 43 |
| 5. Les modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> pour évaluer la toxicité pulmonaire des NMs | 45 |
| 5.1 Les modèles <i>in vivo</i> | 45 |
| 5.2 Les modèles <i>in vitro</i> | 52 |
| 5.3 Conclusion sur les méthodes <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> utilisables pour évaluer la toxicité des NMs par voie respiratoire | 73 |
| 6. Toxicité des NMs au niveau pulmonaire et utilisation de méthodes <i>in vitro</i> plus complexes..... | 75 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 6.1 | Mécanisme général de toxicité..... | 75 |
| 6.2 | Toxicité des nanoparticules (NPs) métalliques faiblement solubles au niveau pulmonaire : exemples du TiO ₂ et du CeO ₂ | 78 |
| 6.3 | Mise en perspective des effets toxiques <i>in vitro</i> par rapport à <i>in vivo</i> après exposition pulmonaire à des NPs | 83 |
| 6.4 | Toxicité aigue des NPs au niveau pulmonaire après exposition de cellules à l'ALI à des aérosols..... | 87 |
| 7. | Conclusions et objectifs du travail..... | 90 |
| | Matériels et Méthodes | 92 |
| 1. | Nanoparticules utilisées | 93 |
| 1.1 | Caractéristiques physico-chimiques des NPs..... | 93 |
| 1.2 | Préparation et caractérisation des suspensions mères pour les expérimentations <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> | 94 |
| 2. | Expérimentations <i>in vitro</i> | 95 |
| 2.1 | Modèles cellulaires utilisés | 96 |
| 2.2 | Exposition de cellules à l'interface air-liquide aux aérosols de NPs | 97 |
| 2.3 | Exposition aux suspensions de NPs..... | 103 |
| 2.4 | Évaluation de l'activité biologique | 104 |
| 3. | Expérimentations <i>in vivo</i> | 107 |
| 3.1 | Animaux..... | 107 |
| 3.2 | Préparation et caractérisation des suspensions de NPs | 107 |
| 3.3 | Exposition par aspiration intratrachéale..... | 108 |
| 3.4 | Dosage des NPs dans les poumons | 108 |
| 3.5 | Évaluation de l'activité biologique | 108 |
| 4. | Analyses statistiques..... | 110 |
| | Résultats et discussions | 112 |

| | |
|---|-----|
| 1. Article n°1 : L'exposition à l'interface air-liquide à des aérosols de nanomatériaux induit des niveaux d'activation biologique différents par rapport à l'exposition à des suspensions..... | 113 |
| 2. Article n°2 : Prédiction de la toxicité <i>in vivo</i> pulmonaire induite par l'exposition aiguë à des nanomatériaux faiblement solubles en utilisant des méthodes <i>in vitro</i> avancées..... | 165 |
| Conclusions et perspectives | 192 |
| Bibliographie..... | 197 |
| Annexes..... | 209 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Pourcentage de molécules à la surface en fonction du diamètre. | 23 |
| Figure 2 : Produits contenant des NMs répertoriés en 2015 dans l'inventaire des produits de nanotechnologie de consommation créé en 2005 par le « Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Project on Emerging Nanotechnologies ». | 24 |
| Figure 3 : les différentes formes cristallines du TiO ₂ | 27 |
| Figure 4 : Organisation cristalline du CeO ₂ | 28 |
| Figure 5 : Passage des NMs à travers les différents compartiments environnementaux après relargage depuis la source. | 30 |
| Figure 6 : Estimation haute des quantités de NMs relarguées chaque année dans le monde dans les principaux compartiments environnementaux..... | 31 |
| Figure 7 : Concentrations estimées dans la région de Los Angeles après 1 an de relargage de NMs dans l'environnement. | 32 |
| Figure 8 : Schéma de l'appareil respiratoire chez l'Homme..... | 35 |
| Figure 9 : Représentation schématique des alvéoles (A) et de la barrière alvéolo-capillaire (B). | 37 |
| Figure 10 : Modélisation du dépôt des particules au niveau des voies aériennes. | 39 |
| Figure 11 : Exemple d'une chambre d'exposition corps entier. | 48 |
| Figure 12 : Schéma d'une tour d'inhalation par le nez seulement. | 49 |
| Figure 13 : Monocultures de cellules épithéliales ou de macrophages sur plaque..... | 53 |
| Figure 14 : Exemples de co-cultures de cellules sur des plaques ou des inserts..... | 54 |
| Figure 15 : Représentation schématique de la culture à l'ALI sur des inserts. | 55 |
| Figure 16 : Culture de cellules primaires bronchiques en 3-D à l'ALI..... | 56 |
| Figure 17 : Exposition de cellules en submergé à des NMs en suspensions dans du milieu de culture..... | 59 |
| Figure 18 : Formation d'une corona de protéines autour d'une nanoparticule (en gris), au contact des protéines et des macromolécules présentes dans le milieu (en rouge, bleu, vert, jaune et noir)..... | 60 |
| Figure 19 : Contact direct entre les NMs et les cellules par exposition à l'ALI à des aérosols. | 62 |
| Figure 20 : Interactions NMs-cellules alvéolaires et effets biologiques possibles. | 75 |
| Figure 21 : Métriques de doses communes entre le <i>in vivo</i> et le <i>in vitro</i> | 85 |

| | |
|---|-----|
| Figure 22 : Observation des NPs au microscope électronique à transmission (MET). Images du JRC. | 94 |
| Figure 23 : Représentation graphique du dispositif de sonication « cup horn » utilisé pour disperser les suspensions de NPs. | 95 |
| Figure 24 : Méthodologies utilisées <i>in vitro</i> pour exposer des cellules pulmonaires à des NPs de TiO ₂ et de CeO ₂ | 96 |
| Figure 25 : Protocole de culture pour exposer les cellules à l'ALI à des aérosols de NPs. | 98 |
| Figure 26 : Photo (A) et schéma détaillé (B) du système d'exposition de cellules à l'ALI aux aérosols de NPs ou à l'air. | 100 |
| Figure 27 : Montage utilisé pour les prélèvements gravimétriques des aérosols. | 101 |
| Figure 28 : Photo du SMPS. | 101 |
| Figure 29 : Évaluation de l'activité biologique après 24h d'exposition sur insert. | 104 |
| Figure 30 : Cellules de LBA d'un rat exposé 24h au TiO ₂ NM105. Observation au microscope optique x40. | 109 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1: Exemples de propriétés améliorées grâce à l'utilisation des NMs..... | 23 |
| Tableau 2 : Production annuelle en 2012 en t/an de NMs parmi les plus produits dans le monde | 25 |
| Tableau 3 : Production annuelle estimée aux USA en 2011 de 5 NMs parmi les plus produits dans le monde..... | 26 |
| Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques du TiO ₂ et du CeO ₂ | 26 |
| Tableau 5 : Principaux avantages et inconvénients des modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> | 45 |
| Tableau 6 : Paramètres physiologiques respiratoires chez l'homme et l'animal | 46 |
| Tableau 7 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes utilisées pour exposer des animaux à des NMs..... | 50 |
| Tableau 8 : Principaux modèles d'épithélium pulmonaires utilisés..... | 57 |
| Tableau 9: Exemples de systèmes utilisés pour exposer des cellules à l'ALI à des aérosols de NMs..... | 65 |
| Tableau 10 : Exemples de méthodes utilisées pour caractériser des aérosols de NMs..... | 69 |
| Tableau 11 : Avantages et inconvénients des méthodes utilisés pour exposer des cellules à des aérosols de NMs..... | 73 |
| Tableau 12 : Comparaison des effets des NMs par rapport à des particules plus larges..... | 76 |
| Tableau 13 : Récapitulatif des matériels et méthodes utilisés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> | 92 |
| Tableau 15 : Paramètres utilisés pour estimer la fraction déposée sur les cellules / unité de temps avec le modèle mathématique ISDD. | 104 |

Abréviations

ALI : Interface Air-Liquide

ALICE : « Air-Liquid Interface Cell Exposure »

AlO_x : Oxyde d'aluminium

BET : Aire de surface d'une particule mesurée par la méthode de Brunauer–Emmett–Teller

CeO₂ : Dioxyde de cérium

CNC : Compteur de Noyaux de Condensation

CNT : Nanotubes de carbone

CPC : « Condensation Particle Counter »

DCF : Dichlorofluorésceine

DMA : « Differential Mobility Analyzer »

ELISA : « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »

FeO_x : Oxyde de fer

HBSS : Hanks Balanced Salt Solution

ICP-MS : Spectroscopie de Masse à Plasma à Couplage Inductif

IL-1β : Interleukine-1β

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine-8

ISO : « International Organization for Standardization »

LBA : Lavage Broncho Alvéolaire

LDH : Lactate Déshydrogénase

LIBS : « Laser Induced Breakdown Spectroscopy »

LOAEL : « Lowest Observed Adverse Effects Level »

LPS: Lipopolysaccharide

MET : « Microscopie Electronique à Transmission »

MPPD : « Multiple Path Particle Dosimetry Model »

NM : Nanomatériau

NOAEL : « No Observed Adverse Effect Level »

NP : Nanoparticule

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

PBS : « Phosphate Buffered Saline »

pH : Potentiel Hydrogène

PMA : Phorbol Myristate Acetate

QCM : Microbalances à Cristal de Quartz

REACH : « Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals »

RPMI : « Roswell Park Memorial Institute medium »

SiO₂ : Dioxyde de silicium

SMPS : « Scanning Mobility Particle Sizer »

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TEOM : « Tapered Element Oscillating Microbalance »

TiO₂ : Dioxyde de titane

TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale α

UE : Union Européenne

UV : Ultraviolet

VTR : Valeur Toxicologique de Référence

ZnO : Oxyde de zinc

INTRODUCTION

L'augmentation croissante des nanomatériaux (NMs) dans les produits issus des nanotechnologies entraîne une augmentation potentielle de l'exposition [1]. Cela suscite des interrogations quant à de potentiels effets sanitaires pour les travailleurs et le Grand Public [2-4].

Les nanoparticules (NPs) métalliques et faiblement solubles comme les oxydes de titane (TiO_2) ou de cérium (CeO_2) sont parmi les NMs les plus utilisés dans le monde et la voie d'exposition majeure pour ces NPs est l'inhalation [5]. Néanmoins, les atmosphères environnementales et professionnelles ne sont pas bien caractérisées pour les NPs [6], ce qui peut expliquer le manque d'études épidémiologiques sur la relation entre l'exposition à des NPs et de potentiels effets indésirables. Malgré cela, se basant sur des études épidémiologiques montrant des associations entre l'exposition à des particules fines et ultrafines présentes dans l'atmosphère et des effets sanitaires indésirables [7-10], leur potentielle toxicité a été étudiée sur des modèles animaux ou cellulaires [11, 12]. Les résultats de toxicité provenant de l'expérimentation animale restent les plus fiables pour modéliser de potentiels effets chez l'Homme [13, 14], car ils proviennent d'un organisme entier. Les études *in vitro* sont prometteuses, d'autant plus qu'elles sont moins onéreuses et plus faciles à mettre en place [15]. Néanmoins, leur capacité à prédire les résultats *in vivo* doit être évaluée avec attention.

In vivo, les NPs inhalées peuvent se déposer dans les alvéoles qui se trouvent à l'interface air-liquide (ALI) [16, 17], puis interagir avec les composants de la barrière alvéolo-capillaire [17]. À la partie apicale de la barrière, les NPs insolubles peuvent d'abord entrer en contact avec la fine couche de surfactant sécrétée par les pneumocytes, qui recouvre la surface entière des alvéoles [17]. Les NPs peuvent ensuite être prises en charge par les macrophages alvéolaires pour être éliminées, mais elles peuvent aussi interagir directement avec les pneumocytes [17, 18]. Si les NPs traversent la barrière alvéolaire [19, 20], elles peuvent entrer en contact avec d'autres éléments la composant, comme les cellules endothéliales ou les cellules de l'immunité, et ensuite passer dans le sang ou les vaisseaux lymphatiques [20, 21]. En conséquence de ces interactions, des mécanismes de défense peuvent être activés et des dommages cellulaires peuvent avoir lieu. Par exemple, la fonctionnalité des cellules peut être

altérée, des médiateurs pro- et anti- inflammatoires peuvent être sécrétés, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être produites et des lésions de l'ADN peuvent apparaître [4, 5, 22].

In vitro, des cellules pulmonaires en monocultures sont habituellement exposées dans des conditions submergées à des suspensions de NPs, pour mettre en évidence des mécanismes d'action [23], faire du criblage haut débit [15] ou évaluer les effets toxiques. Cependant, utiliser de telles conditions expérimentales n'est pas représentatif des interactions qui ont lieu *in vivo* dans les poumons entre différents types cellulaires ou entre les cellules et les particules, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile [13, 14, 24-26]. De plus, en conditions submergées, les interactions particules-cellules sont très dépendantes de la composition du milieu [27, 28]. Par exemple, les NPs peuvent interagir avec les macromolécules présentes dans le milieu de culture, ce qui entraîne la formation d'une corona spécifique au milieu utilisé [29, 30]. Les NPs peuvent également s'agglomérer et former des particules plus larges et de différentes tailles, ce qui rend leur caractérisation difficile. Par ailleurs, en suspension, la dose délivrée aux cellules dépend du comportement des NPs et notamment de leur capacité à sédimenter, ce qui complique la dosimétrie [31-33].

Poussé par la nécessité de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les expérimentations et de trouver des alternatives à l'expérimentation animale, des modèles *in vitro* cellulaires [34] et d'exposition plus complexes ont néanmoins été et sont en cours de développement [25, 35]. Par exemple, les cellules peuvent être cultivées en co-culture, ce qui permet de mimer les communications existantes *in vivo* dans les poumons entre plusieurs types cellulaires [11, 24]. Ces co-cultures sont mises en place en associant ensemble plusieurs types cellulaires différents, comme des cellules épithéliales, des macrophages, des cellules endothéliales ou encore des cellules dendritiques [36]. Des systèmes permettant d'exposer des cellules à l'ALI directement à des aérosols de NPs ont également été développés pour mimer les interactions directes entre les cellules et les particules qui ont lieu dans les poumons [25]. Cependant, il n'a pas encore été clairement démontré qu'utiliser des modèles *in vitro*, cellulaires et d'exposition, plus proches de la physiologie, permettrait de mieux prédire les effets toxiques observés *in vivo* chez l'animal.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse a été d'évaluer la capacité de différents modèles *in vitro* plus ou moins complexes à prédire les effets constatés *in vivo* après exposition aigue par voie respiratoire à des NPs de TiO₂ et de CeO₂.

Pour cela, la première étape a consisté à évaluer si exposer des cellules en monoculture ou en co-culture à l'interface l'ALI à des aérosols de NPs, générant des résultats différents comparé à des expositions classiques en submergé à des suspensions.

La deuxième étape a consisté à comparer les résultats de toxicité obtenus *in vitro* avec ceux obtenus *in vivo*.

CONTEXTE

1. Les Nanomatériaux : généralités

1.1 Définitions

A l'heure actuelle, il n'existe pas de définition universelle pour les nanomatériaux (NMs). L'union européenne (UE) définit un NM comme étant un matériau d'origine naturelle, formé accidentellement, ou manufacturé, contenant des particules sous forme libres, agrégées ou agglomérées, dont au minimum 50% des particules présentent une ou plusieurs dimensions externes dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm [37].

La spécification technique ISO/TS 80004:2015 [38] définit un NM comme ayant une dimension externe ou interne ou une structure de surface de taille inférieure à 100 nm. Cela inclut notamment les nano-objets qui possèdent au moins une dimension externe de longueur inférieure à 100 nm et qui étaient déjà définis par l'ISO/TS 27687 : 2008. Trois types de nano-objets existent : les nanoparticules (NPs) possèdent trois dimensions de taille inférieure à 100 nm, les Nanofibres en possèdent deux, les Nanoplaques n'en ont qu'une seule. La nouvelle définition (ISO/TS 80004:2015) se démarque cependant de la précédente (l'ISO/TS 27687 : 2008) en incluant également les matériaux nanostructurés, c.-à-d. formés d'un assemblage de nano-objets. Les matériaux nanostructurés peuvent être composés de poudres de nano-objets liés entre eux par des liaisons fortes (agrégats) ou des liaisons faibles (agglomérats). Il peut également s'agir de nanocomposites (matériau solide multiphasé dont une des phases a au moins une dimension inférieure à 100 nm), de mousses solides formées de nano-objets, de matériaux nanoporeux, ou encore de fluides composés de nano-objets (suspensions, aérosols...).

1.2 Propriétés d'intérêt et utilisations

De par leur taille nanométrique, les NMs possèdent des propriétés particulières [2]. En effet, plus un matériau est de petite taille, plus le rapport surface/volume va être élevé, ce qui signifie qu'à volume égal, les NMs vont avoir une activité de surface beaucoup plus grande que des matériaux de taille micrométrique (Figure 1). C'est cette activité de surface élevée,

qui confère aux NMs ou aux produits manufacturés contenant des NMs des propriétés exceptionnelles.

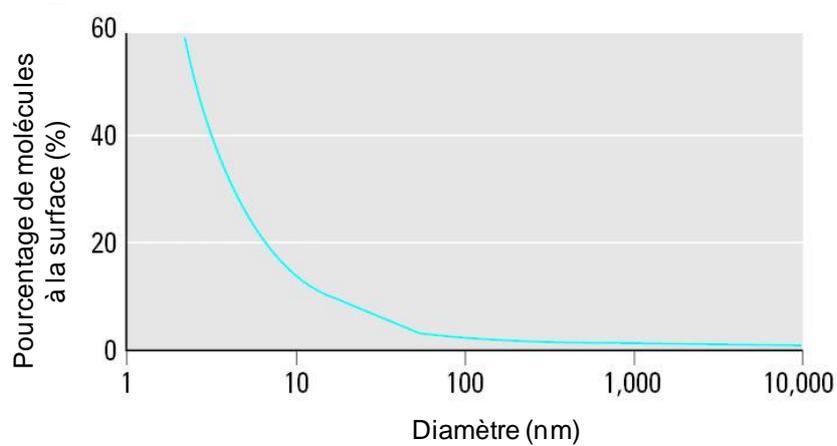


Figure 1 : Pourcentage de molécules à la surface en fonction du diamètre [2].

Notamment, la présence de NMs peut améliorer les propriétés mécaniques, électriques, optiques, électromagnétiques, catalytiques, mécaniques, thermiques des matériaux nanostructurés (Tableau 1). Pour ces raisons, ils sont utilisés dans de nombreux domaines d'activité, comme par exemple en électronique, en magnétique, en construction, dans l'agro-alimentaire, l'imagerie médicale, la cosmétique, l'industrie pharmaceutique ou encore en dentisterie [39, 40].

Tableau 1: Exemples de propriétés améliorées grâce à l'utilisation des NMs (adapté de [41]).

| Propriétés | Intérêts |
|--------------------|---|
| Mécanique | Amélioration de la plasticité, ce qui augmente la résistance des matériaux sans compromettre leur ductilité |
| Électrique | Modulation de la conductivité électrique de matériaux isolants |
| Optique | Amélioration des propriétés optiques de certains matériaux (exemple : transparence) |
| Thermique | Modification de la conductivité thermique de fluides caloporteurs |
| Barrière | Augmentation des propriétés de barrière des nanocomposites vis-à-vis des fluides |
| Magnétique | Augmentation de l'intensité du champ magnétique |
| Catalytique | Augmentation du pouvoir catalytique |
| Ergonomique | Diminution de la masse |
| Antimicrobologique | Augmentation de l'effet antimicrobien |

Au cours des dix dernières années, le nombre de produits développés et commercialisés contenant des NMs a considérablement augmenté. Notamment, selon l'inventaire des produits de nanotechnologie de consommation créé en 2005 par le « Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Project on Emerging Nanotechnologies », le nombre de produits répertoriés comme étant commercialisés a été multiplié par 5 entre 2006 et 2014 [40]. Bien que l'inventaire ne soit pas exhaustif, car aucune réglementation internationale n'a obligé les industriels à répertorier leurs produits durant cette période, cela donne une idée de cette augmentation. Selon cet inventaire, les NMs les plus utilisés en 2015 sont les métaux ou oxydes métalliques (oxydes de titane, de zinc, de cérium, d'aluminium, de cuivre, l'argent, l'or, le platine le cadmium...), les NMs carbonés (noir de carbone, nanotubes de carbone (CNT), graphènes, fullerènes sphériques), les silicium, les oxydes de silicium (SiO_2) [39, 40, 42] (Figure 2). À noter que la France a été pionnière en matière d'obligation de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire [43]. Depuis 2013 toute production en NMs supérieure à 100 grammes doit être déclarée. La déclaration est également obligatoire depuis 2015 au Danemark et le sera en Belgique à partir de 2017. Par ailleurs, la Commission européenne pourrait mettre en place dans un avenir proche un registre européen des nanoparticules ce qui permettrait de recenser de manière exhaustive les substances nanoparticulaires entrant sur le marché européen.

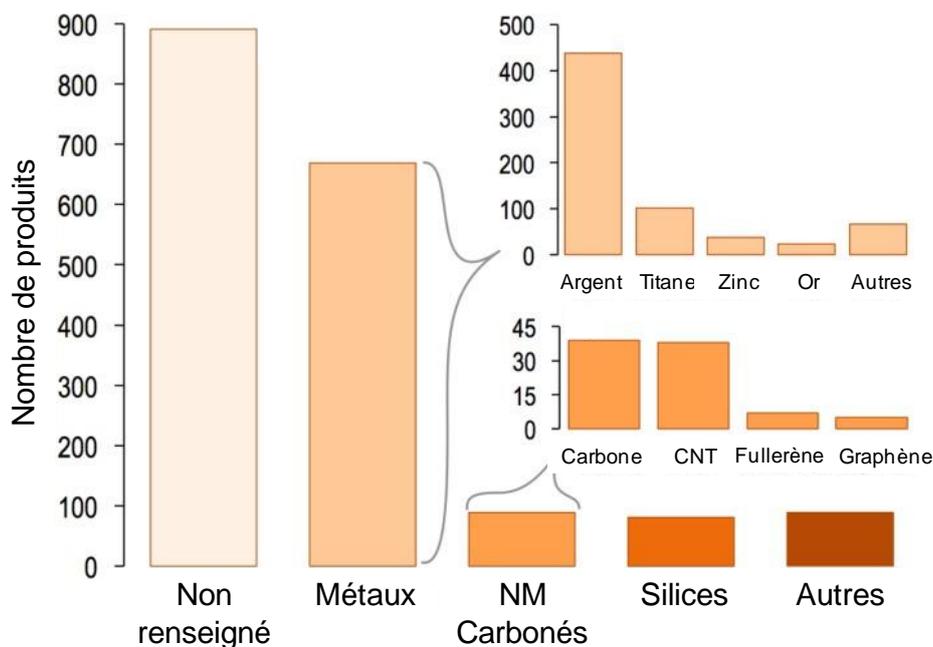


Figure 2 : Produits contenant des NMs répertoriés en 2015 dans l'inventaire des produits de nanotechnologie de consommation créé en 2005 par le « Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Project on Emerging Nanotechnologies » (Adapté de [40]).

En masse, les NMs les plus produits chaque année sont les SiO₂, les TiO₂, les oxydes de Zinc (ZnO) et les nanotubes de carbone. La production de NMs d'argent est beaucoup plus faible, bien que cela soit le matériau le plus utilisé dans les produits de consommation. Il est autant produit que des NMs comme les CeO₂ ou les oxydes d'aluminium (AlO_x) et de fer (FeO_x), qui sont pourtant beaucoup moins fréquemment utilisés dans les matériaux nanostructurés. (Tableau 2) [42]. Cependant, les données de production indiquées dans le tableau 2 ne sont pas exhaustives. Celles-ci proviennent des réponses volontaires des industriels ou des laboratoires scientifiques à un questionnaire. D'après des estimations réalisées dans plusieurs études, les masses de NMs produites chaque année pourraient être beaucoup plus importantes [44] (Tableau 3).

Tableau 2 : Production annuelle en 2012 en t/an de NMs parmi les plus produits dans le monde (adapté de [42]).

| NM | Production dans le monde (t/an) |
|------------------|--|
| SiO ₂ | 5500 |
| TiO ₂ | 3000 |
| ZnO | 550 |
| CNT | 300 |
| Ag | 55 |
| CeO ₂ | 55 |
| AlO _x | 55 |
| FeO _x | 55 |
| Fullerenes | 0,6 |
| Quantum dots | 0,6 |

Tableau 3 : Production annuelle estimée aux USA en 2011 de 5 NMs parmi les plus produits dans le monde (adapté de [44]).

| NM | Estimation basse (T/an) | Estimation haute (T/an) |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| TiO ₂ | 7800 | 38 000 |
| Ag | 2,8 | 20 |
| CeO ₂ | 35 | 700 |
| CNT | 55 | 1101 |
| Fullerenes | 2 | 80 |

1.3 Les NPs de TiO₂ et CeO₂

Les NPs de TiO₂ et de CeO₂ sont parmi les NPs métalliques les plus produites dans le monde (Tableau 2 et 3). Elles ont la caractéristique d'être très faiblement soluble en milieu aqueux (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques du TiO₂ et du CeO₂.

| Propriétés | TiO ₂ | CeO ₂ |
|---|-------------------------|--------------------------|
| CAS | 13463-67-7 | 1306-38-3 |
| Masse molaire (g/mol) | 79,866 O 60%, Ti 40% | 172,115 O 19%, Ce 81% |
| Masse volumique (g/cm ³) | 3,9 – 4,3 | 7,2 |
| T° fusion (°C) | 1800 | 2400 |
| T° ébullition (°C) | 2500 - 3000 | 3500 |
| Solubilité | Insoluble dans l'eau | Insoluble dans l'eau |

1.3.1 Propriétés et intérêts des NPs de TiO₂

Le TiO₂ existe sous trois formes cristallines appelées rutile, anatase et brookite (Figure 3). Le TiO₂ peut être extrait de l'ilménite (FeTiO₃) par procédé au sulfate, ce qui permet d'obtenir du TiO₂ sous forme rutile. Le TiO₂ rutile peut être transformé par procédé au chlore en anatase. Les NPs de TiO₂ peuvent être ensuite obtenues par divers procédés, comme par exemple par hydrolyse thermique ou hydrolyse à la flamme [45].

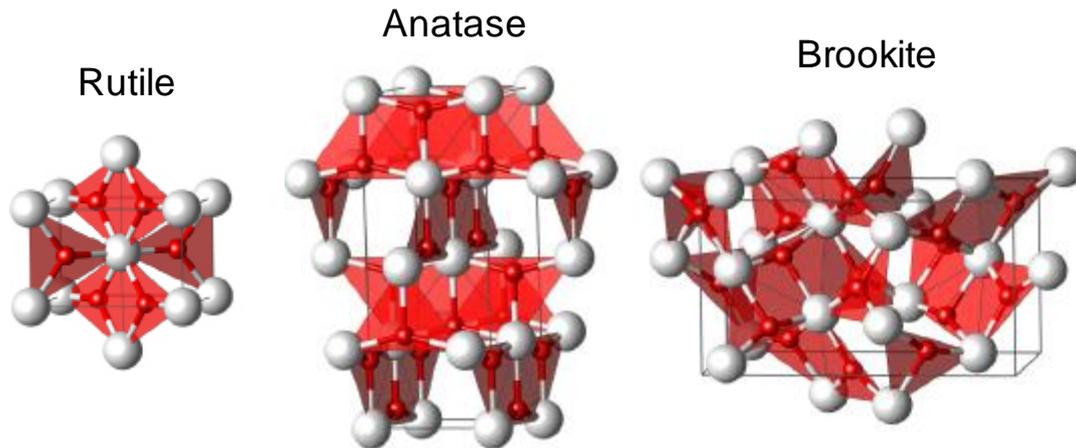


Figure 3 : les différentes formes cristallines du TiO₂ ([46]).

Le TiO₂ est un matériau semi-conducteur, stable dans le temps, et bon marché [46]. Les NPs de TiO₂ absorbent les rayons ultraviolets (UV) (surtout sous leur forme anatase), c'est pourquoi elles sont principalement utilisées en cosmétique, notamment dans les crèmes solaires (environ 70% de l'utilisation) [42]. De plus les NPs de TiO₂ ont un indice de réfraction et un pouvoir couvrant élevé. Pour ces raisons, elles sont également utilisées dans les peintures ou dans l'industrie plastique, ou encore dans certains revêtements de surface [47]. Le TiO₂ possède par ailleurs une activité photo-catalytique après activation par des rayons UV, ce qui peut lui conférer une activité antimicrobologique [48]. Il est aussi parfois utilisé comme excipient de certains médicaments ou comme additif en industrie agroalimentaire [47].

1.3.2 Propriétés et intérêts des NPs de CeO₂

Le cérium est un métal rare qui s'oxyde très rapidement à température ambiante. Il existe principalement sous forme oxydée (CeO₂) (Figure 4).

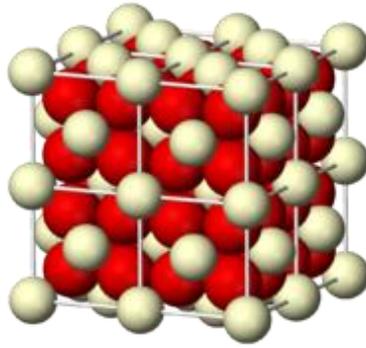


Figure 4 : Organisation cristalline du CeO_2 .

Le CeO_2 possède une activité catalytique élevée. Les NPs de CeO_2 sont principalement utilisées comme additif du diesel, car elles permettent d'augmenter l'efficacité de combustion et de diminuer les émissions en particules diesel. Elles sont également utilisées dans certains produits de consommation comme les cigarettes. Les NPs de CeO_2 sont capable d'absorber fortement les UV, mais elles ne sont pas utilisées dans les crèmes solaires [49].

2. Potentielle exposition de l'Homme aux NMs

L'augmentation en production et en utilisation des NMs provoque une augmentation potentielle du relargage des NMs, de leurs précurseurs ou de leurs produits dérivés dans l'environnement (air, eau, sol). Le risque que l'Homme soit exposé au cours de chaque étape du cycle de vie des NMs augmente donc lui aussi [1, 50, 51], ce qui pourrait entraîner des effets sanitaires indésirables.

2.1 Relargage et comportement des NMs dans l'environnement

Peu de données expérimentales existent concernant le relargage et le comportement des NMs dans l'environnement, notamment de par la difficulté à les quantifier dans chaque compartiment [1]. Des travaux de recherche ont néanmoins été réalisés dans le but de modéliser le relargage et le devenir des NMs dans les différents compartiments environnementaux, en prenant en compte des paramètres comme les propriétés des NMs et des milieux, la géographie, le relargage à la source [50-52].

2.1.1 Relargage et concentrations environnementales

En fonction des sources, les NMs peuvent être relargués directement dans les sols, l'atmosphère ou dans les eaux de surface. Ils peuvent après cela passer dans d'autres compartiments et notamment dans les sédiments [53] (Figure 5).

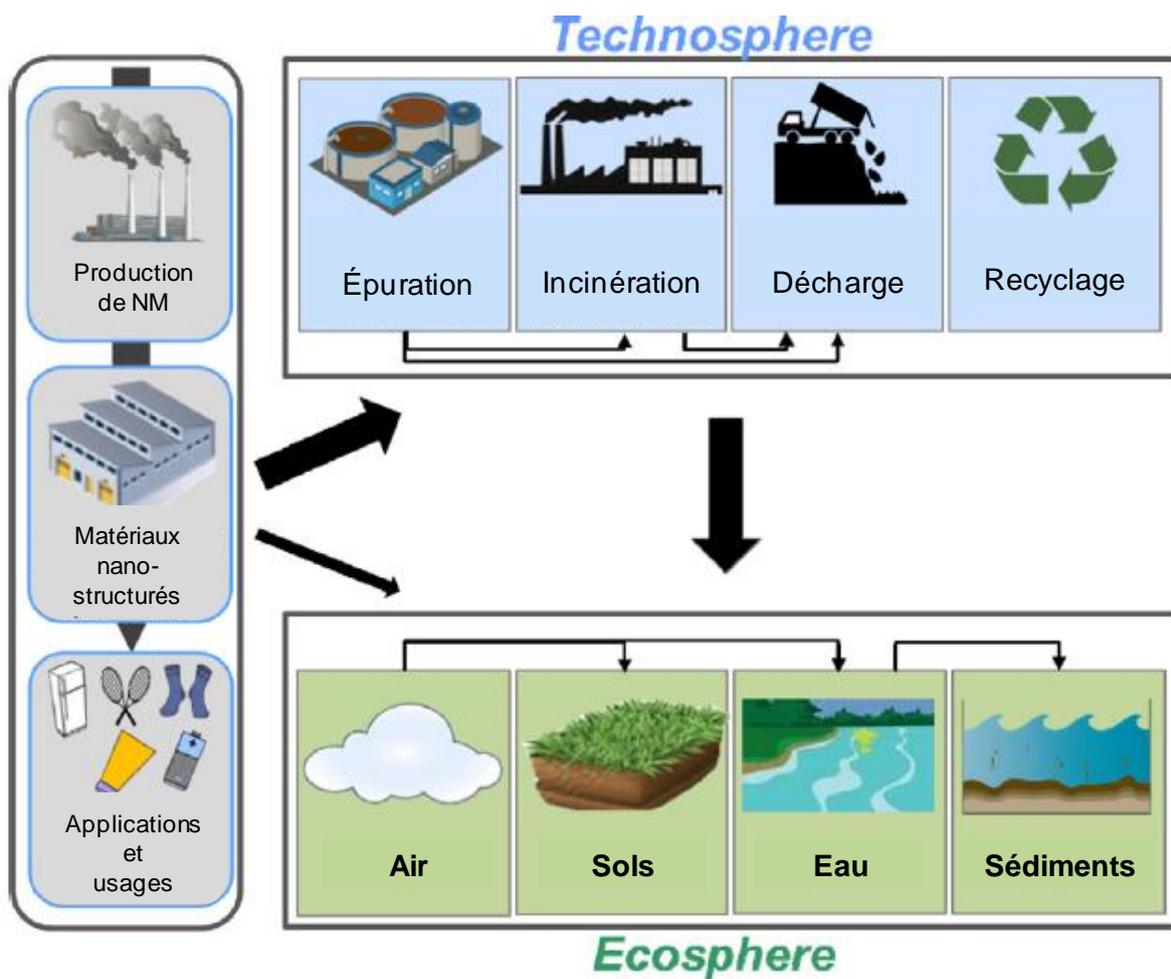


Figure 5 : Passage des NMs à travers les différents compartiments environnementaux après relargage depuis la source (adapté de [53]).

En quantité, les NMs sont principalement relargués dans les sols, notamment après épandage de boues de stations d'épuration [50, 52]. Une partie va également être émise dans l'air et dans l'eau par émission directe depuis la source [52] (Figure 6).

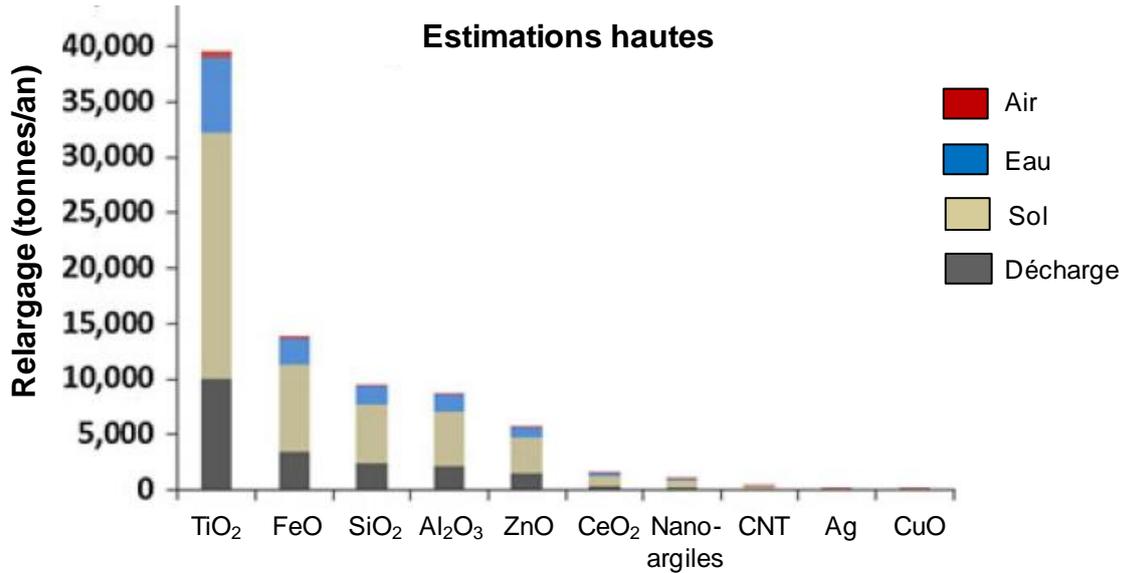


Figure 6 : Estimation hautes des quantités de NMs relarguées chaque année dans le monde dans les principaux compartiments environnementaux (adapté de [52]).

Les concentrations estimées dans les différents milieux dépendent des quantités relarguées et des transferts entre les différents compartiments environnementaux [52]. En fonction des concentrations relarguées estimées dans la région de Los Angeles, Liu et Cohen [51] ont par exemple évalué les concentrations en NMs dans les différents compartiments environnementaux après un an de relargage (Figure 7). Les concentrations sont faibles : elles sont de moins de 1 ng/m³ dans l'air, de quelques dizaines à une centaine de ng/L dans l'eau de surface, moins de 1 µg/kg dans les sols et jusqu'à quelques milliers de µg/kg dans les sédiments (Figure 7). Dans des études réalisées dans d'autres régions du globe, des valeurs similaires ont été estimées dans ces mêmes compartiments environnementaux [50].

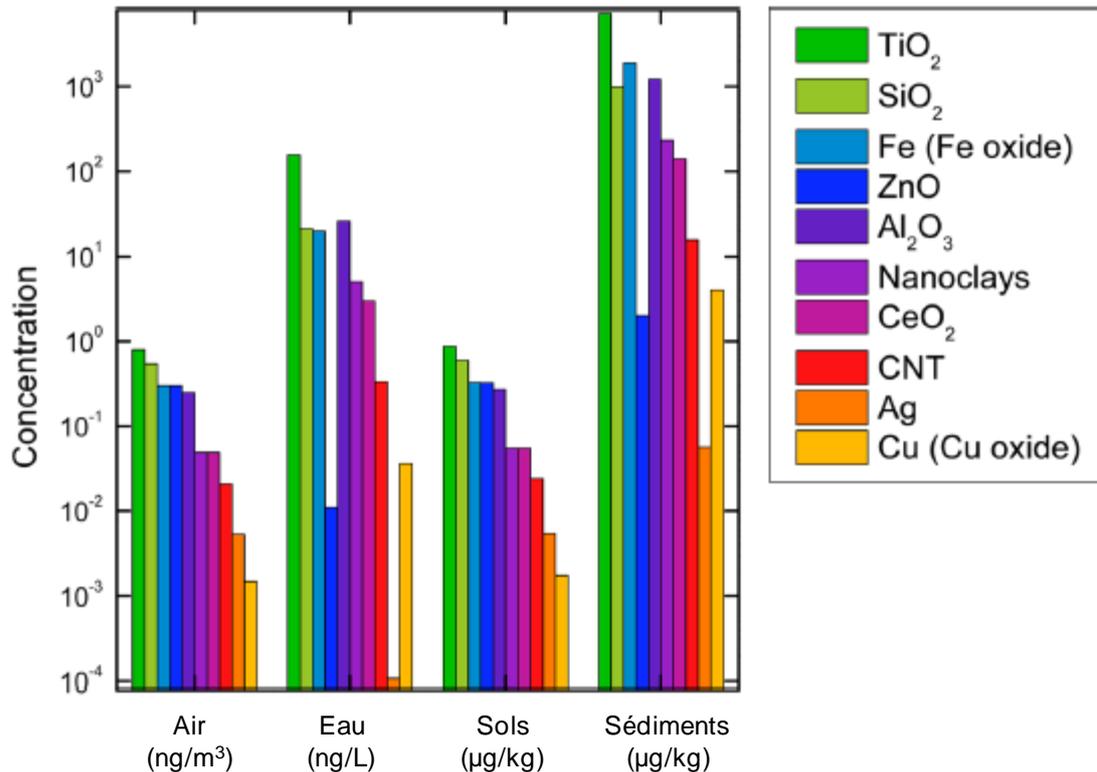


Figure 7 : Concentrations estimées dans la région de Los Angeles après 1 an de relargage de NMs dans l'environnement [51].

2.1.2 Interaction des NMs avec l'environnement

Les NMs vont agir différemment dans chaque compartiment environnemental et la nature des interactions va dépendre des propriétés des NMs et du milieu à leur contact.

En milieu fluide (liquide ou gaz), les NMs peuvent s'agglomérer entre eux. En effet, les particules vont se déplacer dans un fluide par mouvements browniens et entrent en collisions, ce qui peut former des agglomérats de NMs ou provoquer la coagulation avec d'autres particules présentes dans l'environnement [54, 55]. Les NMs peuvent également sédimenter et plus les particules seront larges (donc agglomérées) et denses et plus la vitesse de sédimentation sera élevée [33, 55]. Cela explique pourquoi les NMs relargués dans l'air ou dans les eaux de surface s'accumulent dans les sédiments [51]. Le relargage d'ions par dissolution des NMs, par exemple certains oxydes métalliques (ZnO, AgO...), est également un phénomène important qui a lieu principalement dans les milieux liquides et qui est dépendant du potentiel hydrogène (pH) de celui-ci [1, 50, 53].

La dégradation par oxydation ou par d'autres procédés et la photo-activation des NMs sont également des processus qui ont lieu dans l'environnement [1]. Par ailleurs, dans tous les

milieux, des macromolécules vont s'adsorber aux NMs [56], ce qui entraîne la formation d'une corona [30]. Généralement, la corona contribue à neutraliser les charges présentes sur la couche externe des NMs, ce qui permet d'augmenter leur stabilité dans le milieu [57].

Les modifications que vont subir les NMs dans l'environnement vont ensuite influencer sur leur capacité à être transférés dans certains compartiments environnementaux, ou encore à entrer en contact puis être absorbés par les organismes vivants [3, 44, 55].

2.2 Cas particuliers des expositions sur le lieu de travail

De nombreuses activités sont susceptibles de libérer des NMs manufacturés directement dans les environnements de travail, comme par exemple la production de poudres de NMs, le conditionnement, l'incorporation dans des matrices avec d'autres matériaux pour fabriquer des matériaux nanostructurés, l'usinage de produits contenant des NMs, le nettoyage des installations industrielles, la dispersion à l'aide d'un spray de peintures contenant des NMs [58]. Les quantités en NMs émises, notamment dans l'air ambiant, peuvent être importantes et atteindre plusieurs dizaines ou centaines de milliers de particules par cm^3 et même des valeurs approchant le million de particules par cm^3 [58]. En concentration massique, les valeurs au plus près des zones d'émission peuvent atteindre quelques mg/m^3 [58]. En cas d'absence de protections collectives ou individuelles, les travailleurs peuvent ainsi être potentiellement exposés de manière aiguë comme chronique à des quantités de NMs beaucoup plus importantes que dans l'environnement [59]. Ceci est très préoccupant, d'autant plus que selon Roco et al. [60], 6 millions de personnes seront employées en 2020 dans le domaine des nanomatériaux.

2.3 Voies d'exposition possibles

Pendant leur cycle de vie, les NMs peuvent être transférés dans tous les compartiments environnementaux. L'Homme peut être exposé via l'air, l'eau, les sols, ou même en consommant des organismes ou des végétaux contaminés [44]. Les voies aériennes, digestives, cutanées ou même oculaires sont donc des portes d'entrée potentielles dans l'organisme [3]. Néanmoins, nous nous intéresserons par la suite uniquement à l'exposition par voie respiratoire.

2.3.1 La voie respiratoire

Compte tenu des concentrations importantes libérées dans l'air des environnements de travail, de ses caractéristiques physiologiques (surface de plus de 150 m²) et du grand volume d'air respiré par jour (10 à 20 m³), l'appareil respiratoire est la zone de contact majeure entre les NMs et l'Homme [61]. De plus, de par leur taille nanométrique, les NMs ont la capacité d'atteindre les alvéoles et de traverser la barrière alvéolo-capillaire, qui est l'une des plus fines de l'organisme (1 µm), pour ensuite passer dans le sang et/ou transiter vers d'autres organes (cf. chapitre 3).

2.3.2 La voie cutanée

La peau dont la surface est de 2 m² environ est également une voie d'entrée possible notamment pour les NMs lipophiliques et de poids moléculaire faible [3]. Cependant, en absence de solvants organiques, l'interaction avec les cellules de la barrière cutanée reste limitée car les NMs traversent difficilement la couche cornée [3]. Par exemple, il a été montré sur des volontaires sains que les NMs de TiO₂ présents dans les crèmes solaires ne traversaient pas la couche cornée. Cependant, il a été mis en évidence que dans certaines conditions, comme par exemple lorsque la peau était lésée, les NMs pouvaient traverser les couches de celle-ci [2, 3].

2.3.3 La voie digestive

L'absorption de NMs par voie digestive, même si elle reste très faible, a été montrée dans plusieurs études [2, 3]. Du fait que des produits alimentaires contiennent des NMs et parce que les NMs qui entre dans l'organisme par la voie respiratoire peuvent passer au niveau de la voie digestive par clairance muco-ciliaire, l'appareil digestif est également une voie d'exposition préoccupante.

2.3.4 La voie oculaire

L'exposition par voie oculaire est possible après par exemple application de cosmétique dans les yeux ou dépôt de NMs aérosolisés. Cependant cette voie d'exposition a globalement été peu étudiée [3].

3. Comportement des NMs inhalés au niveau de l'arbre respiratoire

3.1 Anatomie générale de l'arbre respiratoire

L'appareil respiratoire est composé de deux parties qui sont les voies aériennes supérieures et inférieures. À chaque inspiration, l'air circule par les voies supérieures qui vont de la cavité nasale jusqu'au larynx, en passant par le pharynx. L'air emprunte ensuite les voies inférieures qui se situent au niveau thoracique, passe par la trachée, les bronches et les bronchioles, pour au final atteindre les alvéoles (Figure 8).

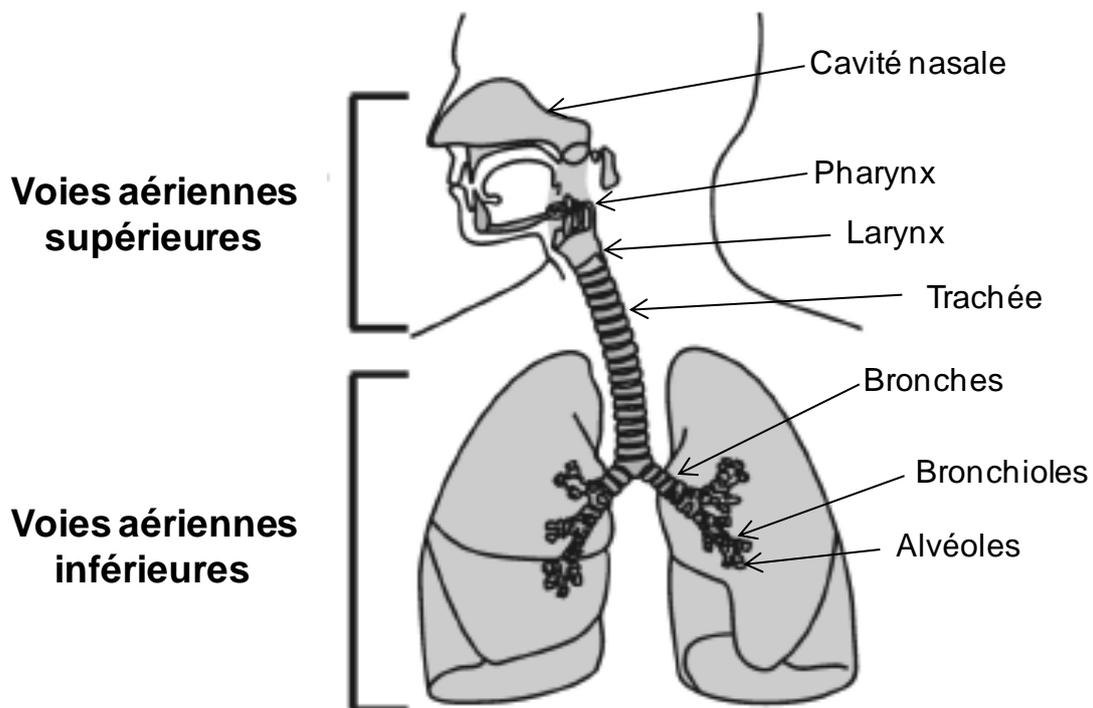


Figure 8 : Schéma de l'appareil respiratoire chez l'Homme [17].

Les voies aériennes supérieures, la trachée, les bronches et les bronchioles ont comme principales fonctions de conduire l'air jusqu'aux alvéoles et de le conditionner pour favoriser la respiration [62]. La fonction principale des alvéoles est d'échanger les gaz entre l'air et le sang. Leurs fonctions étant différentes, les épithéliums des voies conductrices et alvéolaires sont de compositions différentes [63].

3.1.1 Les voies conductrices

La muqueuse qui tapisse la lumière bronchique est composée d'un épithélium reposant sur une membrane basale et d'une *lamina propria* constituée de fibres de collagènes et d'élastine et contenant des vaisseaux capillaires sanguins et lymphatiques. Les fibres élastiques permettent une certaine flexibilité et un retour à la normale lorsque les bronches sont dilatées. Les épithéliums des voies conductrices sont composés principalement de cellules ciliées, ce qui permet la clairance muco-ciliaire pour l'épuration des substances indésirables vers l'extérieur des poumons. Ils sont également composés de cellules sécrétrices de mucus ou cellules caliciformes. Le mucus sécrété étant composé majoritairement d'eau, celui-ci facilite l'emprisonnement des impuretés de l'air et de certains gaz hydrosolubles qui vont se solubiliser à son contact. Il est par ailleurs indispensable à la clairance muco-ciliaire et permet d'humidifier l'air se dirigeant vers les alvéoles [62]. D'autres types cellulaires sont également présents au niveau des bronches: les cellules basales, qui sont situées contre la membrane basale, permettent le renouvellement cellulaire ; les cellules neuroendocrines, regroupées en corps neuro-épithéliaux, servent de chémorécepteurs et détectent les variations de teneur en O₂ et CO₂ dans l'air. Pour assurer le fonctionnement des voies conductrices, une couche musculaire lisse se trouve en dessous de la lamina propria et permet de réguler le flux aérien et la bronchomotricité. Des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des glandes séromuqueuses s'ouvrant dans la lumière bronchique sont présents entre la couche musculaire et le cartilage, ce qui assure la rigidité du tissu. L'adventice contenant des vaisseaux sanguins et des nerfs se situe au niveau de la couche externe des voies conductrices [63].

3.1.2 Les alvéoles et la barrière alvéolo-capillaire

Les voies conductrices, dont le diamètre diminue jusqu'aux alvéoles, amènent l'air aux cents millions d'alvéoles environ qui composent les poumons, afin de recharger le sang en O₂ et de le décharger en CO₂. La surface d'échange alvéolaire représente chez l'Homme environ 140 m² [64]. L'échange de gaz se fait au niveau de la barrière alvéolo-capillaire qui est composée de l'épithélium alvéolaire, de la lame basale et de l'endothélium des vaisseaux sanguins (Figure 9).

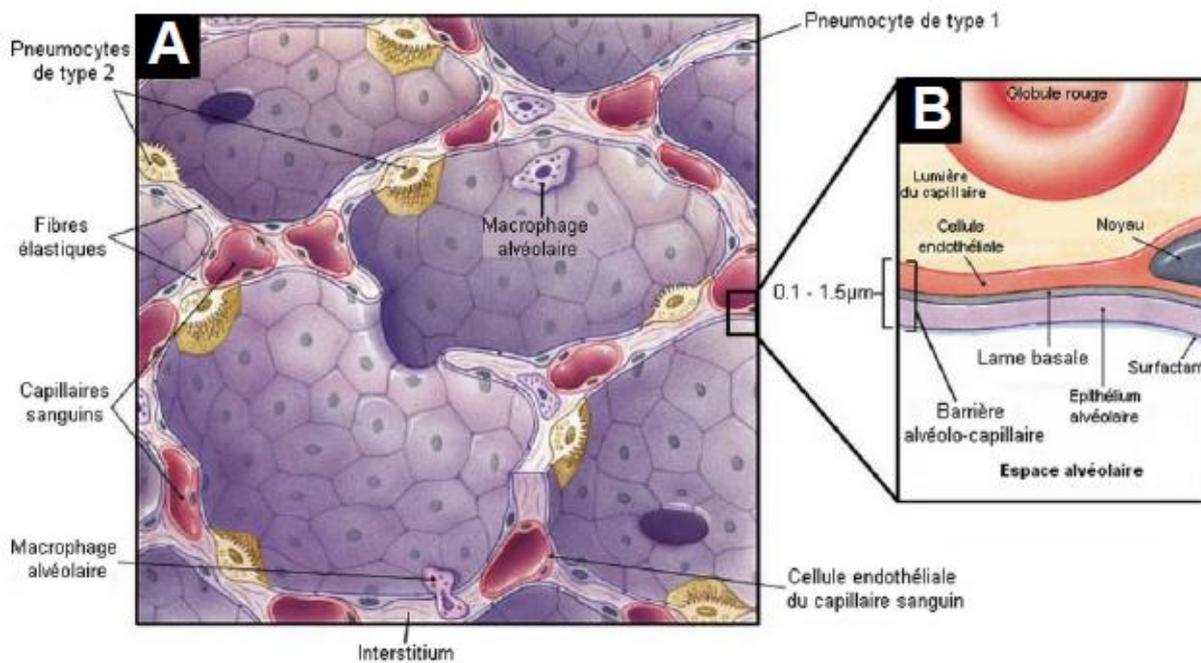


Figure 9 : Représentation schématique des alvéoles (A) et de la barrière alvéolo-capillaire (B) (Thèse Dékali. 2013).

L'épithélium alvéolaire se trouve à la lumière des alvéoles. Il est constitué de deux types cellulaires, les pneumocytes de type I et de type II [65]. Les pneumocytes de type I recouvrent plus de 90% de la surface alvéolaire. Ils sont caractérisés par un cytoplasme étroit et étendu et sont unis entre eux par des jonctions serrées. Cela permet la diffusion passive des gaz tout en rendant l'épithélium alvéolaire assez imperméable aux autres substances. Les pneumocytes de type II sont des petites cellules qui peuvent se différencier en type I. La proportion relative est de 67 Type II pour 40 type I [65], mais du fait de leur taille, ils ne représentent que 7% de la surface alvéolaire totale. La particularité de ces cellules est qu'elles sécrètent continuellement du surfactant en partie apicale grâce à la présence de corps lamellaires [66]. Le surfactant est un tensioactif riche en protéines (10%, surfactant proteins SP-A, B, C et D) et en lipides (90%, phospholipides) [67]. Il a pour rôle de diminuer la tension de surface alvéolaire. Cela permet notamment d'éviter que les alvéoles se collapsent en fin d'expiration. Au niveau de la lumière alvéolaire, des macrophages circulent au niveau de la fine couche de surfactant. Présents au niveau des alvéoles avec un ratio d'environ 1 macrophage pour 10 cellules alvéolaires [65], ils constituent une ligne de défense contre les éléments indésirables inhalés grâce à leur capacité de phagocytose. En plus de leur capacité d'épuration des substances indésirables, ils permettent un renouvellement du surfactant par internalisation puis élimination après remontée de l'ascenseur muco-ciliaire [68]. Au niveau basal, entre les

pneumocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, se trouve une membrane basale qui sert de support aux cellules. Celle-ci est composée principalement de collagène de type IV et de laminine [69]. Toujours au niveau basal, l'interstitium inter-alvéolaire, qui est un tissu conjonctif très vascularisé, sert de support aux pneumocytes et aux cellules endothéliales. Au sein de cette matrice extracellulaire se trouvent différents types cellulaires comme par exemple des fibroblastes, des neutrophiles, des lymphocytes ou des macrophages. Le dernier composant de la barrière alveolo-capillaire est l'endothélium des vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales des capillaires sanguins représentent environ 40% des cellules pulmonaires. Cependant, la surface d'échange avec les alvéoles ne représente qu'environ 20% de la surface totale alvéolaire. L'endothélium a la caractéristique d'être très fin, avec des zones dépourvues d'organites atteignant parfois 30 nm à 200 nm d'épaisseur, ce qui facilite les échanges gazeux [70].

3.2 Dépôt des NMs au niveau des poumons

Après inhalation, les particules vont se déposer au niveau des voies respiratoires (Figure 10). Les mécanismes, l'efficacité et le lieu de dépôt vont principalement dépendre du diamètre aérodynamique des particules inhalées [17]. Plus les particules sont petites, plus les forces de diffusion vont être fortes. Plus les particules sont grosses, plus les forces de sédimentation et d'impaction sont élevées. Le dépôt total dans l'appareil respiratoire est donc très élevé vers 10 nm et vers 10 μm alors qu'entre 100 nm et 1 μm , les forces de diffusion, de sédimentation et d'impaction sont faibles et le dépôt est au plus bas [22, 71]. En revanche, plus les forces de dépôt sont élevées, plus celle-ci est rapide, ce qui explique que le dépôt au niveau des alvéoles soit extrêmement faible en dessous de 10 nm et au dessus de 10 μm . Lorsque la taille des particules permet le dépôt dans les alvéoles, elle est de 30% au maximum pour les particules d'environ 40 nm, de 10% au minimum pour les particules d'environ 400 nm, et de 20% pour les particules de 2,5 μm [22]. Il a également été montré que le dépôt pulmonaire était influencé par la densité effective des particules dans l'aérosol [22], qui est dépendante de l'état d'agglomération des particules.

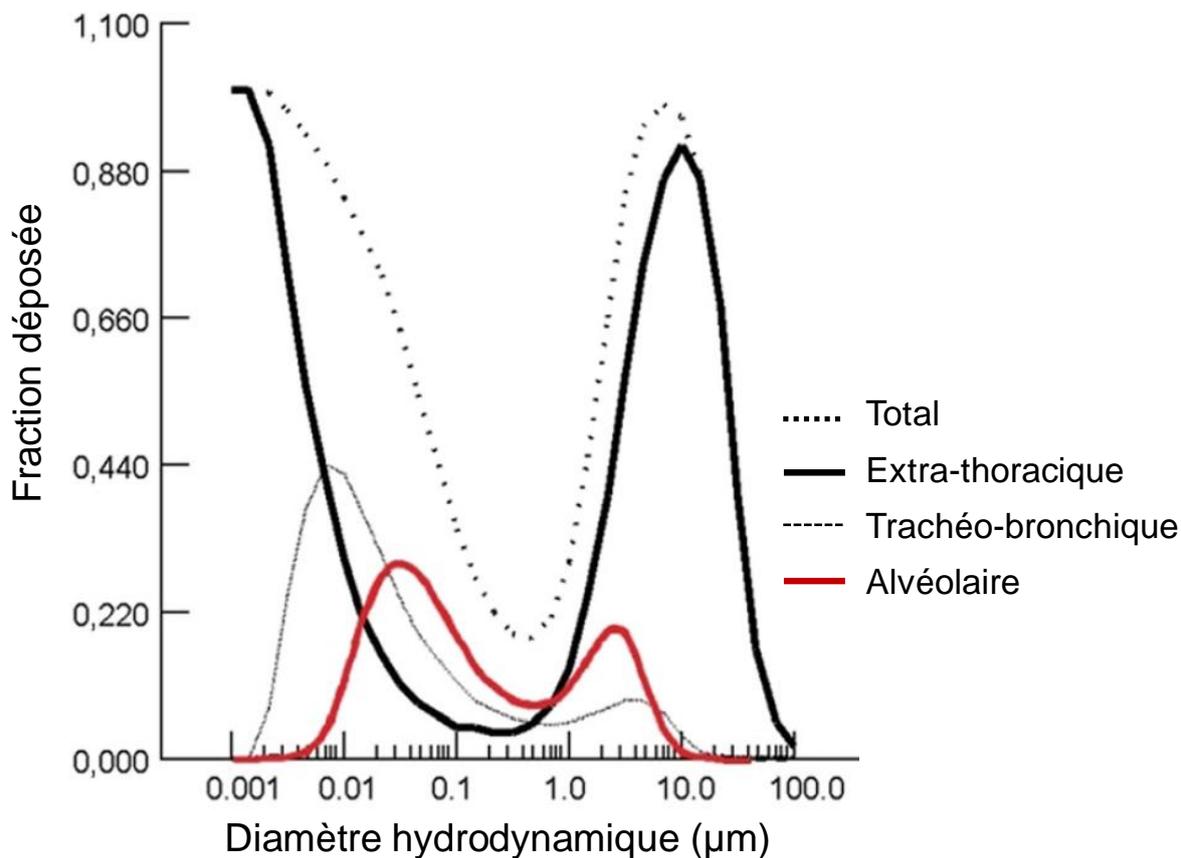


Figure 10 : Modélisation du dépôt des particules au niveau des voies aériennes (adapté de [22]).

3.3 Interactions entre NMs et cellules alvéolaires

En fonction des régions où ils vont se déposer, les NMs inhalés vont interagir directement avec les cellules présentes à la lumière des voies conductrices ou des alvéoles. Lorsque le dépôt se fait au niveau des voies conductrices, les NMs sont éliminés par clairance mucociliaire mais ils peuvent également causer des dommages directement aux cellules. Par ailleurs, de par ses caractéristiques, l'épithélium des voies conductrices est moins vulnérable que celui des alvéoles. Le risque potentiel d'effet indésirable est donc potentiellement plus élevé après dépôt des NMs au niveau des alvéoles.

3.3.1 Interactions entre NMs et surfactant

In vivo, les NMs inhalés peuvent se déposer dans les alvéoles [16]. A ce niveau, les cellules sont à l'interface air-liquide et les NMs vont tout d'abord entrer en contact avec la fine couche de surfactant, sécrétée par les pneumocytes, qui recouvre toute la surface des alvéoles [64]. Au contact du surfactant, les NMs passent ainsi d'une interface air à une interface liquide et se

retrouvent entourés par des macromolécules du surfactant [17]. En fonction des caractéristiques physico-chimiques des NMs, d'autres types d'interactions peuvent avoir lieu. Les NMs solubles, comme par exemple les oxydes de zinc, de cuivre ou d'argent, libèrent des ions au cours du temps qui vont entrer en contact avec les cellules alvéolaires [17]. Néanmoins, les particules solubles n'étant dans la plupart des cas pas immédiatement solubilisées et parfois que partiellement, une interaction directe entre les NMs sous forme particulaire et les cellules alvéolaires va également avoir lieu [2, 17]. Les NMs faiblement solubles, comme les TiO_2 et les CeO_2 , vont entrer en contact avec les cellules présentes au niveau des alvéoles presque uniquement sous forme particulaire [17], après néanmoins adsorption des macromolécules du surfactant à leur surface [30].

3.3.2 Prise en charge par les phagocytes

Au contact des NMs, les macrophages circulants dans le surfactant vont les internaliser afin de les éliminer. L'élimination se fait généralement par remontée des macrophages grâce à l'ascenseur mucocillaire [2]. Lors de la prise en charge des NMs par les macrophages, des marqueurs d'inflammation comme par exemple des cytokines et des chémokines pro-inflammatoires peuvent être libérés, ce qui va provoquer un afflux de cellules immunitaires, principalement des neutrophiles [72]. Ces cellules vont également jouer le rôle d'épurateur et accélérer l'élimination des particules déposées dans les alvéoles.

Les caractéristiques physico-chimiques des NMs ont une influence sur la capacité d'élimination des cellules de défense de l'hôte. Ainsi, il a généralement été montré que plus la taille des particules était importante plus l'élimination était rapide [2]. Par ailleurs, la forme des NMs joue également un rôle important. Les NMs de forme fibreuse comme les nanotubes de carbone sont difficilement éliminés par les phagocytes, car ils sont souvent trop longs pour être totalement internalisés [73]. D'autre part, les NMs solubles ont la capacité de libérer des ions après internalisation et plus particulièrement au niveau des lysosomes où le PH est acide [74]. Ce phénomène dit de « cheval de Troie » peut entraîner la mort des phagocytes [75] et ainsi altérer la clairance des NMs.

3.3.3 Interaction entre NMs et cellules de la barrière alvéolo-capillaire

Les NMs sous forme particulaire ou ionisée peuvent également entrer en contact avec les pneumocytes de type I ou II [18] qui recouvrent le côté apical de la barrière alvéolo-capillaire. En conséquence, certains NMs peuvent provoquer un stress au niveau cellulaire, matérialisé

notamment par la production d'espèces réactives de l'oxygène, l'activation de mécanismes de défense, comme la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire ou de marqueur antioxydants, causer des dommages sur l'ADN ou encore provoquer la mort des cellules [4, 5, 22]. Les NMs peuvent également être internalisés par les cellules de la barrière et ainsi possiblement la traverser et interagir avec les autres composantes de la barrière comme les cellules endothéliales ou les cellules de l'immunité, puis ensuite se retrouver dans le sang ou dans les vaisseaux lymphatiques [2].

3.3.4 Potentielle action au niveau systémique

En cas de passage à travers l'épithélium alvéolaire, les NMs se retrouvent dans la matrice extra pulmonaire, dans le sang ou dans les vaisseaux lymphatiques [17, 76, 77]. Par exemple, après exposition de rats ou de souris à des NMs par inhalation ou instillation intratrachéale, des NMs ont été détectés dans les ganglions lymphatiques des poumons [14, 77], dans le sang [78] dans les capillaires sanguins et le tissu conjonctif [17]. Il a également été montré dans plusieurs études chez l'animal que les NMs pouvaient atteindre d'autres organes après exposition pulmonaire. Par exemple, des NMs ont été retrouvés dans le foie et la rate [79], dans les reins et dans le cerveau [80]. Au niveau de ces organes, il a été montré *in vivo* que certains NMs pouvaient avoir des effets toxiques au niveau de la rate [81], ou encore du foie [82, 83].

4. Inhalation de NMs et potentiels effets sanitaires chez l'Homme

4.1 NMs et effets sur la santé humaine

Quelques études ont été réalisées chez les travailleurs et ont permis de mettre en évidence des effets sur certains biomarqueurs après inhalation de NMs d'origines manufacturées. Chez des travailleurs exposés à des NPs de TiO₂, Wu et al. [84] ont observé des effets inflammatoires pulmonaires, caractérisés par une augmentation de la fraction en monoxyde d'azote exhalé. Pelclova et al. ont mis en évidence une augmentation en marqueurs de stress oxydatif dans des condensats d'air exhalés chez des travailleurs exposés à des NPs de TiO₂ et d'oxyde de fer [85, 86]. De telles augmentations dans les condensats d'air exhalés ont également été montrées chez des travailleurs exposés à des nanotubes de carbone [87]. Liou et al. [88] ont observé une diminution en enzymes anti-oxydantes et une augmentation de l'expression de certains marqueurs cardio-vasculaires chez les travailleurs exposés à des NMs. Liao et al. [89] ont mis en évidence une association significative entre manipulation de NMs par les travailleurs et augmentation en enzymes antioxydantes, en marqueurs cardiovasculaires et une modification de la capacité pulmonaire. Dans une autre étude, ils ont également noté des effets symptomatiques, notamment une augmentation des éternuements et une aggravation des dermatites allergiques [90].

En résumé, des effets aigus ont été observés après exposition humaine à des NMs. Cependant, très peu d'études impliquant des NMs manufacturés ont été réalisées chez l'homme et les potentiels effets sur le long terme n'ont pas été étudiés. C'est pourquoi il est difficile d'établir un lien clair entre exposition aux NPs et effets indésirables pour l'homme.

4.2 Particules Fines et effets sur la santé humaine

En revanche, des associations claires entre exposition par voie respiratoire à des particules fines et ultrafines présentes dans l'atmosphère et des effets sanitaires indésirables ont été mises en évidence dans plusieurs études [10]. Par exemple, Laden et al. [8] ont observé une augmentation de la mortalité dans six villes américaines lorsque l'exposition aux particules fines augmente. Ils ont également montré des effets accrus pour les particules de taille 2,5 µm par rapport à celles de taille comprises entre 2,5 et 10 µm. Cela pourrait être attribuable à un dépôt plus important des particules inférieures à 2,5 µm au niveau des voies respiratoires

inférieures. Schulz et al. [9] ont montré qu'il existait un lien entre une augmentation de l'exposition aux particules ultrafines et des effets cardio-vasculaires. Peters et al. [7] ont montré qu'il existait une association entre une élévation de la concentration massique en particules de tailles inférieures à 500 nm et une diminution des fonctions respiratoires chez les asthmatiques [7]. Ces résultats suggèrent donc que les NPs manufacturées pourraient entraîner des effets indésirables du même type chez les populations exposées.

4.3 Les études de toxicologie : une nécessité pour évaluer les effets sanitaires chez l'Homme après inhalation de NMs

Se basant sur les résultats des différentes études épidémiologiques qui ont mis en évidence des effets après exposition à des particules fines et ultrafines d'origine environnementale, il paraît indispensable d'évaluer les potentiels effets toxiques des NMs d'origine manufacturée pour l'Homme. D'autant plus que le cas de l'amiante, qui a été la cause de nombreux décès par cancer de la plèvre chez les travailleurs et les populations exposées, fait jurisprudence dans les pays développés et il est aujourd'hui éthiquement inacceptable d'exposer délibérément ou même par inadvertance des populations à des substances qui pourraient entraîner de potentiels effets sanitaires graves.

Les études de toxicologie permettent d'évaluer les effets indésirables de substances comme les NMs, même en absence de données d'épidémiologie. Les effets aigus (court terme) comme chroniques (long terme) peuvent être évalués en utilisant des modèles animaux, cellulaires ou même des micro-organismes. Il est possible d'étudier de nombreux marqueurs d'effets biologiques, comme la mort cellulaire, l'inflammation, la génération d'espèces réactive de l'oxygène, la génotoxicité, mais également d'évaluer l'apparition de pathologies, de tumeurs, de dommages tissulaires ou organiques ou encore le dérèglement de certaines fonctions physiologiques, ce qui permet de déterminer les mécanismes d'action des substances. Les résultats de ces études de toxicologie peuvent également être extrapolés en valeur toxicologique de référence (VTR), ce qui permet d'avoir une idée du potentiel toxique de la substance [91]. Pour l'exposition par inhalation, les VTR peuvent être exprimées en concentration minimale dans l'air ambiant pouvant provoquant l'apparition d'un dérèglement biologique ou d'une pathologie. Les VTR correspondent en général aux « No ou Lowest observed adverse effect levels » (NOAEL ou LOAEL) déterminés dans les études de toxicologie, auxquels ont été appliqués des facteurs d'incertitudes plus ou moins importants, en fonction de la proximité du modèle utilisé par rapport à l'Homme. Dans certains cas,

généralement pour des effets mutagènes, des effets dits « sans seuils » sont possibles. Dans ce cas, les VTR sont exprimées en excès de risque unitaire, correspondant à la probabilité d'un individu exposé à une substance d'être atteint d'un effet comme par exemple d'un cancer.

Dans le cas des substances chimiques classiques, la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Autorisation, of Chemicals) oblige les industriels à tester la toxicité de leurs produits en fonction de leur usage et de la quantité produite. Généralement, des études sur animaux sont réalisées dans ce but, avec comme critère d'effet retenu pour des effets aigus la mort ou l'absence de mort chez l'animal (OCDE 403) et pour des effets chroniques l'apparition de tumeurs (OCDE 452). Des études ciblées sur un point critique précis, par exemple le caractère mutagène des substances, peuvent également être mise en place, notamment en utilisant des tests *in vitro* comme le test d'Ames (OCDE 471). Ces études ne permettent généralement pas d'évaluer avec précision les effets indésirables provoqués par l'exposition à la substance, mais elles permettent tout de même de classer les substances en fonction des effets toxiques graves observés.

Aucune réglementation n'oblige aujourd'hui les industriels à tester spécifiquement la toxicité des NMs qu'ils produisent, et il n'existe à l'heure d'aujourd'hui aucun consensus strict quant à la manière d'évaluer leurs effets toxiques. Il est néanmoins convenu que les modèles *in vivo* et *in vitro* peuvent être utilisés dans le but d'évaluer la toxicité des NMs après inhalation.

5. Les modèles *in vivo* et *in vitro* pour évaluer la toxicité pulmonaire des NMs

Les NMs inhalés peuvent se déposer tout au long de l'arbre respiratoire et interagir avec l'organisme, ce qui peut entraîner des effets indésirables, comme montré avec les particules fines et ultrafines. Pour évaluer la toxicité des NMs chez l'homme, il est nécessaire d'utiliser des modèles permettant de prédire de manière fiable les potentiels effets. Dans ce but, les modèles *in vivo* et *in vitro* sont très largement utilisés. Plus le modèle est proche de l'homme, plus la prédiction est potentiellement fiable [24]. Les modèles *in vivo*, du fait d'une complexité similaire à l'homme reste les modèles les plus pertinents pour prédire de potentiels effets chez l'Homme [92]. Cependant, poussé par la nécessité de réduire le nombre d'animaux utilisé en expérimentation (principe des 3R : Reduction, Replacement, Refinement), des modèles alternatifs à l'expérimentation animale comme les modèles *in vitro* se sont considérablement développés depuis une vingtaine d'années [4, 12, 25]. Les principaux avantages et inconvénients des modèles *in vivo* et *in vitro* sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Principaux avantages et inconvénients des modèles *in vivo* et *in vitro*.

| Modèles | Avantages | Inconvénients |
|-----------------|--|---|
| <i>In vivo</i> | Complexité similaire à l'Humain Études long terme possible Tous les effets toxiques modélisables Étude de biodisponibilité possible Possible d'étudier les effets sur plusieurs organes cibles | Très coûteux Éthiquement contestable Criblage à faible débit Chronophage |
| <i>In vitro</i> | Faible coût Mise en place aisée Criblage à haut débit possible Technique rapide Utilisation aisée pour les études mécanistiques | Modèle simpliste, de complexité faible par rapport à l'Humain Exposition long terme très difficile |

5.1 Les modèles *in vivo*

Les modèles *in vivo* permettent de modéliser entièrement la réponse de l'organisme après l'exposition pulmonaire à des NMs. En effet, il est possible d'évaluer le dépôt, la rétention, le passage à travers les barrières, la distribution, l'excrétion et les effets toxiques des NMs dans tous l'organisme. De plus, les effets toxiques à court terme (effets aigus) comme à long terme

(effets chroniques) peuvent être évalués. Pour ces raisons, les modèles animaux restent aujourd'hui indispensables pour tester la potentielle toxicité des NMs après inhalation. Plusieurs espèces animales et différentes méthodes d'exposition peuvent être utilisées pour évaluer leur toxicité.

5.1.1 Les modèles animaux utilisés

Pour des raisons éthiques et financières, les gros animaux comme les singes ou les chiens sont très rarement utilisés en toxicologie pulmonaire, même si anatomiquement comme physiologiquement ils possèdent un système respiratoire proche de l'homme. Les rongeurs, qui sont beaucoup plus faciles à élever, sont plus utilisés bien que possédant un système respiratoire plus éloigné de l'humain [11] (Tableau 6). Parmi les rongeurs, les rats et les souris sont les animaux les plus utilisés pour évaluer les effets toxiques au niveau respiratoire.

Tableau 6 : Paramètres physiologiques respiratoires chez l'homme et l'animal (adapté de [93]).

| Espèce | Masse corporelle (kg) | Volume pulmonaire (mL) | Aire de surface de chaque région (m ²) | |
|---------------|-----------------------|------------------------|--|-------------------------------------|
| | | | Épithélium alvéolaire | Endothélium capillaires alvéolaires |
| Homme | 70 | 5000 | 102 | 72 |
| Rat | 0,3 | 10 | 0,4 | 0,4 |
| Souris | 0,02 | 0,7 | 0,05 | 0,04 |
| Hamster | 0,1 | 4,5 | 0,20 | 0,2 |
| Cochon d'inde | 0,3 | 13 | 0,7 | 0,7 |
| Chien | 16 | 1300 | 52 | 57 |

Il existe des différences anatomiques en taille et en organisation entre les voies respiratoires du rat [94] ou de la souris et de l'Homme, qui peuvent entraîner des réponses différentes vis-à-vis des NMs [93]. Par exemple, les bronches terminales, les alvéoles, la barrière alvéolo-capillaire sont plus petites et plus étroites chez le rat et la souris que chez l'Homme. Cela peut entraîner des différences dans le dépôt, la vitesse d'élimination des NMs dans les poumons et le passage à travers la barrière alvéolaire [11]. Par ailleurs, ces différences sont encore plus prononcées chez la souris que chez le rat [11], c'est pourquoi le rat est l'espèce préconisée pour les études d'inhalation [95].

5.1.2 Les méthodes d'exposition utilisées

L'exposition d'animaux à des NMs peut se faire par inhalation ou par dépôt de suspensions ou d'aérosols directement dans les poumons. L'inhalation est le simulateur d'exposition le plus physiologique, cependant, la méthode est difficile et coûteuse à mettre en place. De plus, le volume respiratoire varie selon les individus, ce qui peut entraîner une variabilité dans les doses déposées dans les poumons. Au contraire, il est possible de déposer des suspensions ou des aérosols de NMs en bolus directement dans les poumons. Ces méthodes permettent de délivrer des doses homogènes de NMs à chaque individu. De plus, il est possible d'avoir accès à de telles méthodes sans posséder de systèmes d'exposition complexes, ce qui les rend beaucoup plus accessibles. Néanmoins, déposer des NMs en bolus dans les poumons est très éloigné de ce qui se passe *in vivo* chez l'Homme lorsqu'il y a exposition par inhalation. Ces méthodes sont donc potentiellement moins fiables.

5.1.2.1 L'exposition par inhalation

Les animaux peuvent inhaler des aérosols de NMs en étant exposés par le corps-entier, le nez ou la tête seulement. Pour cela, il est nécessaire de disposer de systèmes d'exposition complexes, de générer des aérosols de NMs reproductibles et de caractériser les aérosols générés (les techniques de génération et de caractérisation des aérosols de NMs sont présentées dans le paragraphe 5.2.2.2). Connaître les caractéristiques physico-chimiques des aérosols générés est indispensable pour prédire le dépôt des NMs dans les poumons. Cela permet notamment de savoir si la technique de génération utilisée est adaptée. Des modèles mathématiques, comme le Multiple Path Particle Dosimetry model (MPPD) ont été développés pour estimer la dépôt pulmonaire en fonction des caractéristiques physico-chimiques des NMs dans l'aérosol (Taille, densité...) [96].

L'inhalation corps entier

L'exposition corps entier se fait dans des chambres spécialement conçues (Figure 11). L'avantage de cette méthode est qu'elle est peu invasive pour les animaux. Ceux-ci n'ont pas besoin d'être anesthésiés et ne sont pas en contention. Il est donc possible d'effectuer des expositions aiguës comme chroniques, sans créer un stress important qui pourrait perturber les résultats expérimentaux [97]. L'inconvénient majeur de ce principe d'exposition est que les animaux ne sont pas exposés uniquement par voie respiratoire. Au cours de l'exposition, des NMs peuvent se déposer sur le pelage des animaux et ceux-ci vont ingérer des NMs par voie

orale en se léchant [97]. De plus, si les aérosols de NMs ne sont pas bien distribués dans la chambre, il est possible que les animaux ne reçoivent pas la même dose de NMs.

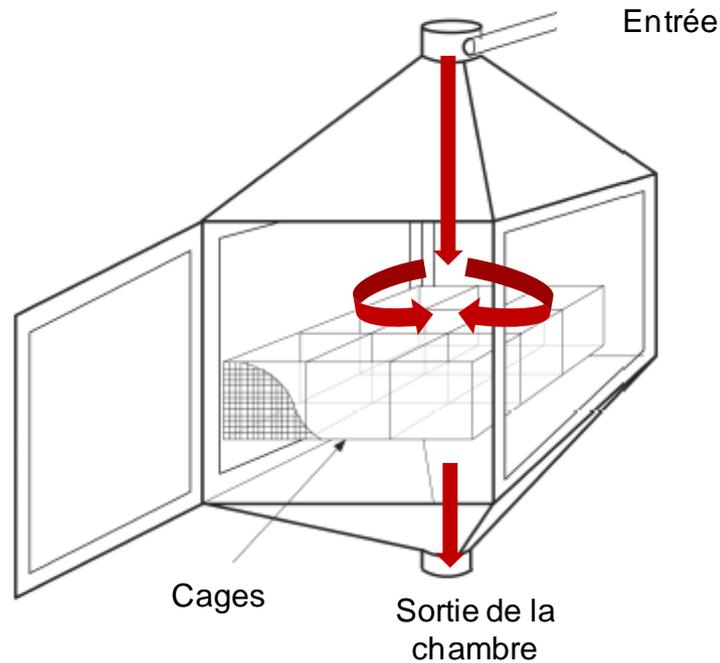


Figure 11 : Exemple d'une chambre d'exposition corps entier (adapté de [97]).

L'inhalation par le nez ou la tête seulement

Les systèmes d'inhalation nez ou tête uniquement (Figure 12) ont été conçus pour minimiser l'exposition par d'autres voies que la voie respiratoire. L'animal va être exposé au niveau du museau, qui est la seule partie en contact de l'aérosol, à des NMs pendant toute la durée de l'exposition. Cependant, cette méthode est très contraignante pour les animaux, car ceux-ci sont maintenus dans des tubes de contention durant l'exposition, ce qui peut engendrer un stress chez l'animal. Il paraît donc plus difficile d'utiliser cette méthode pour des expositions au long terme [97]. Néanmoins, les doses administrées aux animaux sont souvent plus homogènes du fait d'un flux d'aérosol plus laminaire.

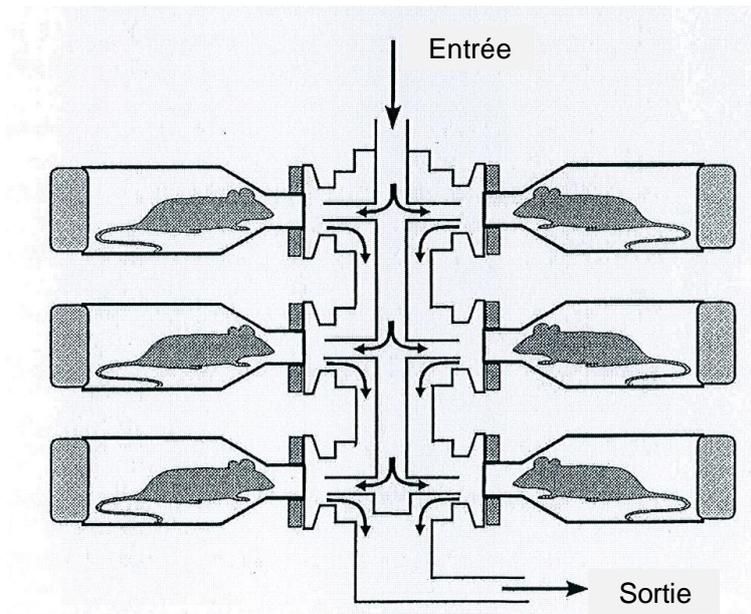


Figure 12 : Schéma d'une tour d'inhalation par le nez seulement.

5.1.2.2 *L'exposition par dépôt de suspensions ou d'aérosols directement dans les poumons*

Différentes méthodes ont été développées pour déposer une dose connue de NMs à partir de suspensions ou d'aérosols directement dans les poumons des animaux. Ce sont toutes des méthodes invasives où un bolus est déposé dans les poumons. Elles sont donc plutôt utilisées pour évaluer la toxicité aiguë ou subaiguë des NMs.

L'instillation intratrachéale

L'instillation peut être utilisée pour déposer une dose précise de NMs assez en profondeur dans les poumons. Cependant, la distribution des NMs dans les alvéoles n'est pas uniforme [98]. De plus, cette technique est invasive car elle nécessite d'anesthésier au préalable les animaux, d'insérer un cathéter au niveau de la trachée, puis d'injecter une suspension de NMs dans les poumons [97].

L'aspiration intratrachéale

Après insertion d'un cathéter ou d'une canule dans la trachée des animaux anesthésiés, il est également possible de pratiquer des aspirations intratrachéales. Dans ce cas, une hyperventilation est créée au préalable chez l'animal en le connectant par le cathéter à un respirateur qui permet d'augmenter la fréquence respiratoire. Le rat est ensuite déconnecté du respirateur puis un volume de suspension de NMs est placé dans le cathéter ou la canule. Quand la respiration reprend, l'animal inspire la suspension de NMs directement dans les

poumons [97], sans qu'il y ait besoin d'injecter la suspension à l'aide d'une seringue. Il est également possible de connecter le cathéter à un générateur d'aérosol comme un microspray, ce qui permet d'injecter directement un aérosol dans les poumons [99].

L'aspiration oropharyngée

Après anesthésie, les animaux peuvent être également exposés par aspiration oro-pharyngée. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de connecter l'animal à un cathéter. Un volume de suspension de NMs est placé à la base de la langue de l'animal après l'avoir étendue. En respirant, l'animal aspire ensuite lui-même la suspension dans les poumons [97].

5.1.3 Conclusion sur les méthodes d'exposition *in vivo*

L'inhalation reste la méthode de référence pour exposer des animaux à des NMs par voie respiratoire, car elle est plus physiologique. L'inhalation nez ou tête uniquement permet un meilleur contrôle des doses inhalées mais cette méthode reste plus inconfortable et stressante pour l'animal que l'exposition corps entier. L'exposition corps entier semble donc être plus adaptée pour des expositions chroniques répétées sur plusieurs mois. Les méthodes permettant de déposer des NMs directement dans les poumons après anesthésie de l'animal sont très utiles pour tester les effets au niveau des poumons profonds. Cependant ces méthodes ne sont pas adaptées pour des expositions répétées, et le débit de dose est beaucoup plus important qu'après inhalation du fait que la dose soit délivrée en bolus unique. Cela peut potentiellement causer des réponses toxicologiques plus importantes (Cf. § 6.2.1.1 et 6.2.2.1). Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes d'exposition utilisées pour exposer des animaux à des NMs par voie respiratoire sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes utilisées pour exposer des animaux à des NMs.

| Méthodes d'exposition | | Applications | Avantages | Inconvénients |
|--|---|---|---|--|
| Inhalation | Corps entier | Études de biodistribution Exposition long terme et court terme Exposition unique ou répétée | Exposition physiologique Méthode faiblement invasive | Nécessite une quantité importante de NM Exposition par voie orale possible après déposition des NM sur le pelage |
| | Nez ou tête uniquement | Études de biodistribution Exposition long terme et court terme Exposition unique ou répétée | Exposition physiologique Ne nécessite pas d'anesthésie | Nécessite une quantité importante de NM Inconfort pour l'animal |
| Déposition de suspensions ou d'aérosols directement dans les poumons | Instillation intratrachéale | Études de biodistribution Exposition court terme surtout Exposition unique principalement | Dose déposée directement dans les poumons Nécessite une quantité de NM peu importante | Exposition non physiologique Méthode invasive, nécessitant une anesthésie préalable Peut engendrer des dommages tissulaires Passage possible dans le tube digestif si geste mal exécuté |
| | Aspiration ou inhalation intratrachéale | Études de biodistribution Exposition court terme surtout Exposition unique principalement | Dose déposée directement dans les poumons Nécessite une quantité de NM peu importante | Exposition non physiologique Méthode invasive, nécessitant une anesthésie préalable |
| | Aspiration oropharyngée | Études de biodistribution Exposition court terme surtout Exposition unique principalement | Dose déposée directement dans les poumons Intubation pas nécessaire Nécessite une quantité de NM peu importante | Exposition non physiologique Anesthésie nécessaire |

5.2 Les modèles *in vitro*

Aujourd'hui, les modèles *in vitro* ont largement fait leurs preuves pour faire du screening haut débit ou pour étudier des mécanismes d'action. Ils peuvent également être utilisés dans le but d'évaluer directement la toxicité aiguë des NMs au niveau d'un organe ou d'un tissu cible, d'autant plus que des progrès considérables ont été faits ces dernières années pour développer des modèles cellulaires et des méthodes d'exposition plus proches de la physiologie [11, 25, 41, 62].

5.2.1 Les modèles cellulaires utilisés

Lorsque des NMs sont inhalés *in vivo*, ceux-ci peuvent se déposer dans les poumons et ainsi interagir directement avec les cellules pulmonaires, notamment avec les cellules épithéliales ou les macrophages alvéolaires. Afin d'évaluer la toxicité des NMs *in vitro*, des modèles cellulaires pulmonaires sont disponibles dans le but de modéliser les effets constatés *in vivo* chez l'Homme et pratiquement tous les types de cellules composant l'arbre respiratoire sont représentés [36]. Il est ainsi possible de sélectionner un modèle adapté à la substance à tester pour mettre en évidence de potentiels effets indésirables [62]. Globalement, on peut distinguer quatre types de modèles *in vitro* différents, les monocultures, les co-cultures, les cultures à l'interface air/liquide, et les cultures 3-D.

5.2.1.1 Les monocultures de cellules

Des monocultures, c.-à-d. des modèles constitués d'un unique type cellulaire, sont très fréquemment utilisées (Figure 13). Parmi les monocultures existantes, il est possible de choisir entre des cultures primaires et des lignées cellulaires [62].

Les cellules primaires sont des cellules normales qui peuvent être prélevées directement à partir d'un organisme vivant ou mort. Ces cellules ont la propriété de conserver les mêmes caractéristiques qu'*in vivo*. Cependant, elles finissent par les perdre au cours des divisions, ce qui fait que la durée de vie du modèle est limitée. Il est possible d'utiliser des cultures primaires humaines pour étudier la toxicité des NMs. Néanmoins, elles sont très peu utilisées du fait d'une faible disponibilité et d'une variabilité interindividuelle élevée. Des cultures primaires de rongeurs peuvent également être utilisées, mais celles-ci possèdent un phénotype différent de l'humain [100].

Les lignées cellulaires sont composées de cellules immortalisées et sont beaucoup plus utilisées. Elles sont issues de cellules cancéreuses prélevées chez un patient ou de cellules

normales qui ont été transformées par génie génétique. Les lignées cellulaires ne possèdent généralement pas toutes les caractéristiques des cellules *in vivo*, mais elles ont l'avantage de se multiplier à l'infini tout en conservant leurs caractéristiques de départ. Pour ces raisons, elles sont facilement disponibles et utilisables, peu coûteuses, et elles permettent une bonne reproductibilité des résultats [62].

Dans un grand nombre d'études, des cellules épithéliales pulmonaires ont été cultivées en monoculture afin d'évaluer la toxicité des NMs [36, 62]. Des macrophages peuvent également être cultivés en monoculture afin d'évaluer la toxicité des NMs qui se déposent au niveau des alvéoles [36]. Les monocultures sont assez facilement utilisables, cependant, le modèle ne permet pas de prendre en compte les interactions entre les différents types cellulaires qui ont lieu *in vivo* lors de l'exposition à des NMs. C'est pourquoi des modèles plus complexes ont été développés [34, 36, 62, 101].

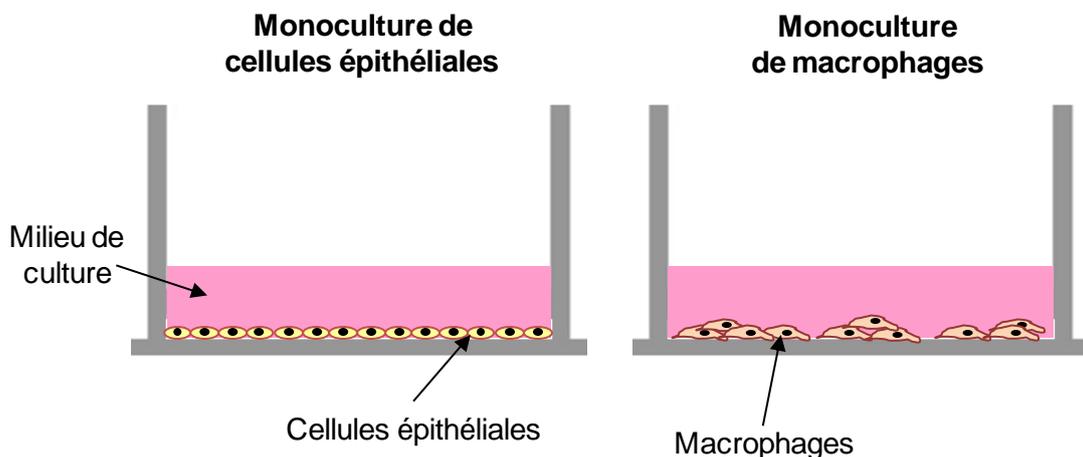


Figure 13 : Monocultures de cellules épithéliales ou de macrophages sur plaque.

5.2.1.2 Les co-cultures de cellules

Afin de reproduire au mieux l'organisation cellulaire pulmonaire et permettre les interactions entre différents types cellulaires, des modèles plus complexes et plus réalistes ont été développés [11, 24]. Des co-cultures entre différents types cellulaires constitutifs des voies pulmonaires, notamment entre des cellules épithéliales et des cellules immunitaires, ont été mises en place [36, 62] (Figure 14). Par exemple, la lignée A549, qui est une des lignées de cellules épithéliales alvéolaires de type II les plus utilisées, a été cultivée à de multiples reprises en bi-culture avec des macrophages de la lignée THP-1 [36, 62]. Cette association permet de mimer l'organisation cellulaire à la partie apicale des alvéoles, avec même la présence de surfactant grâce à une sécrétion active de la part des cellules A549 [34, 102]. Par ailleurs, en utilisant des inserts, qui sont composés d'une membrane microporeuse permettant

les échanges entre la partie apicale et la partie basale, il est possible de reproduire l'organisation des barrières pulmonaires, et plus particulièrement de la barrière alvéolo-capillaire. Des co-cultures associant des cellules épithéliales, des macrophages, des cellules endothéliales [103] et même parfois des mastocytes [34] ont par exemple été développées (Figure 14).

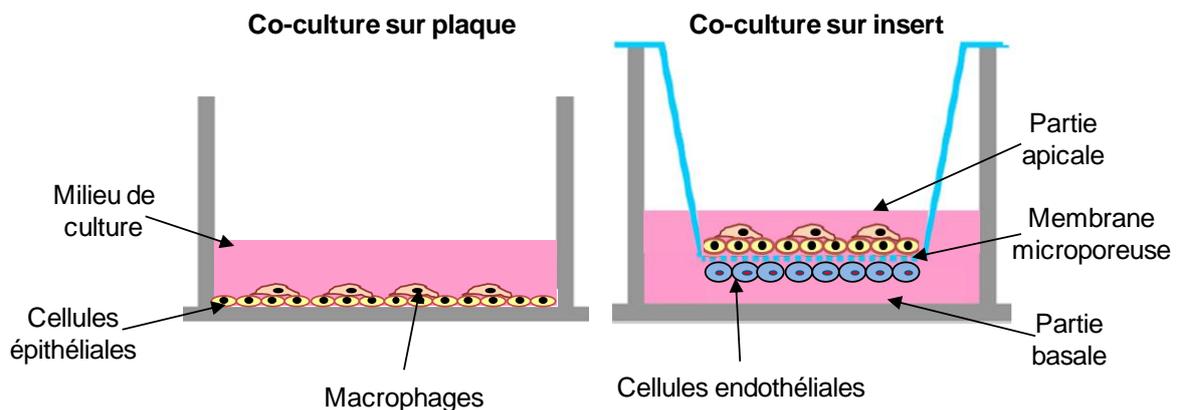


Figure 14 : Exemples de co-cultures de cellules sur des plaques ou des inserts.

5.2.1.3 La culture à l'interface air-liquide (ALI)

In vivo, il est admis que les cellules pulmonaires se trouvent à l'interface air-liquide (ALI), bien qu'une couche de mucus (au niveau bronchique) ou de surfactant (dans les alvéoles) soit présente à la surface apicale des cellules épithéliales [64]. Pour mimer cette organisation au niveau *in vitro*, il est possible de cultiver des cellules pulmonaires à l'ALI en utilisant des inserts (Figure 15). En effet, la membrane microporeuse des inserts permet l'échange de milieu entre les parties basales et apicales. Une fois que les cellules se trouvent à confluence en partie apicale, il est possible d'enlever le milieu qui se trouve en partie apicale puis de conserver les cellules à l'ALI avec du milieu de culture uniquement en partie basale. Grâce à cette technique, les cellules peuvent être directement exposées à l'ALI à des contaminants présents dans l'air, comme par exemple à des NMs, similairement à ce qui se passe *in vivo* (C.f paragraphe 5.2.2.2).

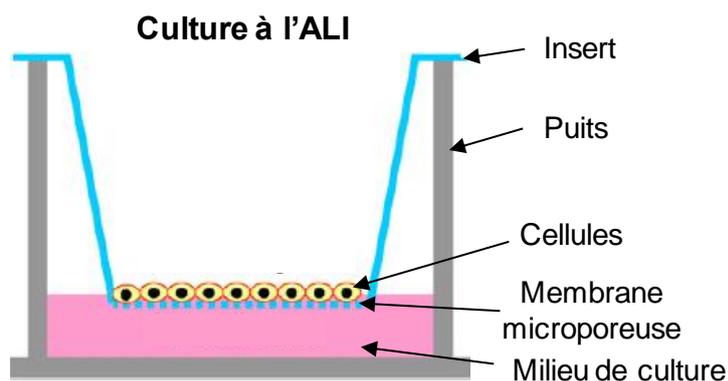


Figure 15 : Représentation schématique de la culture à l'ALI sur des inserts.

5.2.1.4 Les modèles tissulaires (ou 3-D)

Après culture à l'ALI sur des inserts, il est par ailleurs possible d'obtenir un tissu différencié de la même manière qu'*in vivo* en utilisant des cellules primaires provenant d'un donneur. Par exemple, des modèles d'épithéliums bronchique ou nasal ont été développés par différenciation de cellules primaires pendant 2 à 3 semaines à l'ALI [62] (Figure 16). Des modèles tissulaires prêts à l'emploi peuvent également être obtenus auprès de sociétés comme MatTek® (www.mattek.com) ou Epithelix® (www.epithelix.com). Grâce à un renouvellement continu des cellules, il est possible de maintenir fonctionnels ces modèles 3-D pendant 6 mois sans altération du tissu. De ce fait, ils peuvent être exposés de manière répétée dans le temps à des substances présentes dans l'air. Cela a déjà été expérimenté avec des contaminants gazeux [104] ou des particules [105] jusqu'à 4 semaines et aussi avec des CNT mais seulement sur une durée de 3 jours [106]. Des modèles associant des cellules cultivées en 3-D avec d'autres types cellulaires (fibroblastes, macrophages) sont également disponibles (www.mattek.com), par exemple pour évaluer le potentiel fibrotique de certaines particules [107, 108]. Néanmoins il est important de noter qu'aucun modèle épithélial alvéolaire 3-D n'est à ce jour commercialisé. Ceci est notamment dû au fait que ce type de modèle est très difficile à maîtriser car les pneumocytes de type II se différencient rapidement *in vitro* en type I.

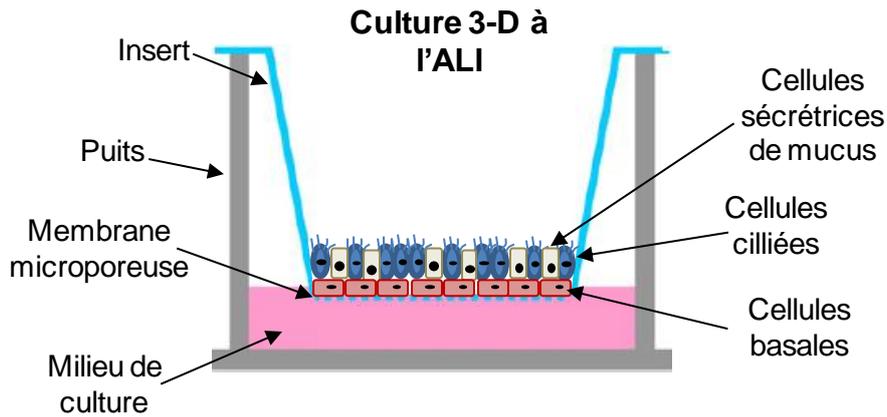


Figure 16 : Culture de cellules primaires bronchiques en 3-D à l'ALI (adapté de [62]).

5.2.1.5 Conclusions sur les modèles *in vitro* pulmonaires

Un grand nombre de modèles sont disponibles et permettent de tester *in vitro* la toxicité des NMs (Tableau 8). Le modèle idéal n'existe pas et chacun à ses avantages et ses défauts. Néanmoins, les avancées en matière de modèles *in vitro* permettent aujourd'hui d'utiliser des modèles de plus en plus représentatifs de l'organisation cellulaire *in vivo*.

Le modèle le plus approprié est celui qui permet de mimer au mieux l'organisation cellulaire, les interactions existant *in vivo* entre les différents types cellulaires et les interactions entre les cellules et les NMs. En effet, se rapprocher des conditions *in vivo* augmente les chances que le modèle réponde similairement par rapport aux cellules *in vivo* lors de l'exposition à une substance indésirable [62]. Ainsi, même si les modèles les plus avancés sont généralement coûteux et plus difficile à manipuler, il semble important de promouvoir l'utilisation et le développement de modèles *in vitro* de plus en plus complexes.

Tableau 8 : Principaux modèles d'épithélium pulmonaires utilisés ([109], adapté de [62]).

| Situation au niveau de la barrière pulmonaire | Type de culture | Nom du modèle cellulaire | Provenance | Avantages | Inconvénients |
|---|-----------------|---|---|---|---|
| Épithélium nasal, bronchique, | Monoculture | Calu-3 | Cellules isolées d'un Adénocarcinome bronchique | Lignée (immortalisée); formation de jonctions serrées; sécrétion de mucus | Variabilité entre les laboratoires pour la formation de jonctions serrées |
| | | BEAS-2B | Cellules transformées d'épithélium bronchique | Lignée (immortalisée); sécrétion de cytokines; expression d'antioxydants; différenciation | Absence de sécrétion de mucus, de cellules ciliées et de jonction serrées |
| | | 16HBE14o- | Cellules transformées d'épithélium bronchique | Lignée (immortalisée); différenciation, organisation en multi-couche, formation de cellules ciliées et de jonction serrées; sécrétion de cytokines | Absence de sécrétion de mucus |
| | | NHBE, hAECB | Cellules primaires d'épithélium bronchique | Cellules non tumorales, non transformées; organisation en multi-couche; différenciation; formation de cellules ciliées et de jonctions serrées; sécrétion de mucus; expression de cytokines | Non immortelles (durée de vie limitée) ; Perte de certaines fonctions avec l'augmentation des passages; leur utilisation nécessite beaucoup de travail |
| | | hAECN | Cellules primaires d'épithélium nasal | Cellules non tumorales, non transformées; organisation en multi-couche; différenciation; formation de cellules ciliées et de jonctions serrées; sécrétion de mucus; expression de cytokines | Non immortelles (durée de vie limitée) ; Perte de certaines fonctions avec l'augmentation des passages; leur utilisation nécessite beaucoup de travail |
| Épithélium alvéolaire | Monoculture | A549 | Cellules isolées d'un Adénocarcinome | Lignée (immortalisée); phénotype de cellules épithéliales alvéolaires de type II; synthèse de surfactant | Pas de formation de jonctions serrées ; synthèse de surfactant |
| | | THP-1 | Cellules isolées d'un patient atteint de leucémie aiguë | Lignée monocytique humaine; les cellules peuvent être différenciées en macrophages | Utilisation d'une substance chimique pour différencier les monocytes en macrophages; |
| | | AE I (alveolar type I) and AE II (alveolar type II) | Cellules primaires d'épithélium alvéolaire | Cellules primaires humaines Phénotype bien différencié, Présence de jonctions serrées fortes | Processus d'isolation des cellules difficile; perte du phénotype de type II après 2-3 jours de culture; phénotype de type I ne peut être directement isolé. Type I produit par transformation de cellules de type II après 4-7 jours de culture |

Suite du tableau 8.

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|---|
| Autres modèles d'épithélium pulmonaire | Co-culture | Cellules épithéliales pulmonaires associées avec un autre type cellulaire composant la barrière pulmonaires (macrophages, cellules dendritiques, fibroblastes, cellules endothéliales ...) | Co-culture de lignées, ou co-culture de cellules primaires | Modèle physiologique plus représentatif de la barrière pulmonaire; coopération existante entre les différents types cellulaires. | Utilisation nécessite plus de travail; Variabilité plus importante ; Culture sur inserts parfois nécessaire; Peut s'avérer couteux. |
| | Culture en interface Air/Liquide (ALI) | Possible pour la plupart des modèles de barrière épithéliale pulmonaire | Mono-culture, co-culture, culture 3D, de lignées ou de cellules primaires | Augmentation de la différenciation des cellules, de la sécrétion de mucus ou de surfactant, de la fonction de barrière | Culture sur inserts nécessaire; couteux |
| | Modèles 3-D | MatTek EpiAirway et Epithelix MucilAir | Epithéliums reconstitué à partir de cellules primaires trachéo-bronchiques ou épithéliales nasales | Epithélium reconstitué; cellules différenciées en cellules sécrétrices de mucus et cellules ciliés; formation d'une multi-couche; formation de jonctions serrées ; Tissu viable plusieurs mois | Couteux, faible reproductibilité |

5.2.2 Les méthodes utilisées pour exposer des cellules pulmonaires à des NMs

5.2.2.1 Le modèle submergé : la méthode classique

Généralement *in vitro*, les cellules sont exposées en condition submergée à des suspensions de NMs (Figure 17). Cette technique est simple, peu coûteuse, rapide à mettre en œuvre et ne nécessite pas de systèmes complexes et spécifiques pour l'exposition aux NMs. Ainsi, elle peut être mise en place assez facilement dans un laboratoire classique de biologie cellulaire, à condition d'avoir accès à des techniques permettant de disperser et de caractériser les NMs en suspension. Brièvement, cela consiste à cultiver les cellules sur des plaques de culture, à préparer des suspensions de NMs en s'assurant de leur bonne dispersion, puis à déposer les suspensions sur les cellules après dilution dans du milieu de culture. Cette méthode classique est très largement utilisée dans le but de déterminer des mécanismes de toxicité [23] ou pour faire du screening haut débit [15]. Néanmoins, utiliser de telles conditions expérimentales ne permet pas de mimer au mieux les interactions se produisant *in vivo* dans les poumons entre

les différents types cellulaires ou entre les cellules et les particules. Dans certains cas, l'interprétation des résultats peut ainsi s'avérer compliquée [13, 14, 24-26].

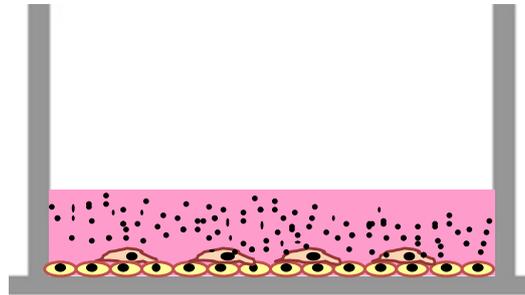


Figure 17 : Exposition de cellules en submergé à des NMs en suspensions dans du milieu de culture.

Influence de la corona en conditions submergées

En conditions submergées, les interactions entre les particules et les cellules sont dépendantes de la composition du milieu [27, 28]. En effet, certains composants du milieu interagissent avec la surface des NMs, ce qui provoque la formation d'une corona autour des NMs, spécifique des composants présents dans le milieu (Figure 18). Généralement, une première corona se forme par enrobage de la particule par des protéines se trouvant en abondance dans le milieu (en rouge). Les protéines ayant une forte affinité avec les particules vont ensuite prendre la place des protéines adsorbées en premier à la surface des particules (en bleu). Certaines protéines ayant une faible affinité avec les particules peuvent s'adsorber à la surface des protéines qui ont été au contact d'une particule (en vert et jaune). D'autres protéines ne vont avoir ni affinité pour la particule, ni pour les autres protéines présentes dans le milieu (en noir)[30].

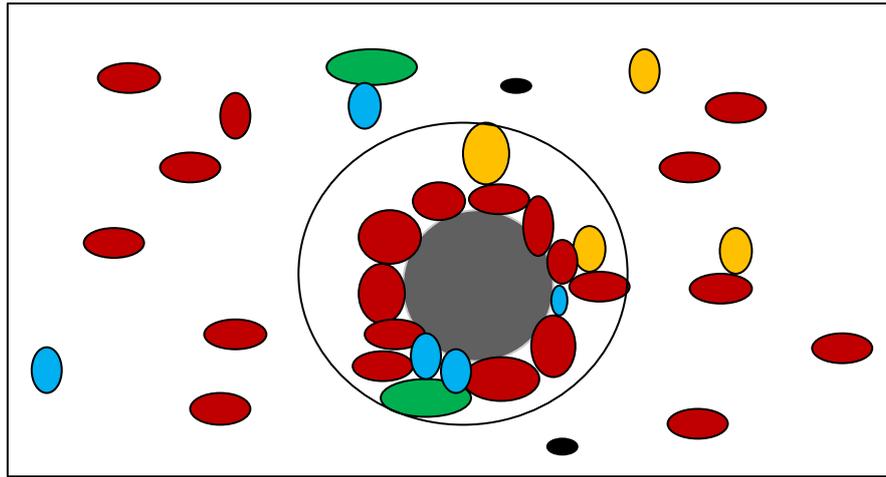


Figure 18 : Formation d'une corona de protéines autour d'une nanoparticule (en gris), au contact des protéines et des macromolécules présentes dans le milieu (en rouge, bleu, vert, jaune et noir) (adapté de [30]).

La corona modifie les caractéristiques physico-chimiques à la surface des NMs, ce qui peut altérer leur comportement dans le milieu [30]. Notamment, la charge de surface et l'état d'agglomération des NMs peuvent être modifiés [31]. Ces changements à la surface des NMs peuvent également entraîner une modification des interactions entre les particules et les cellules [27, 28]. Par exemple, il a été montré que certains NMs étaient plus toxiques lorsqu'elles étaient en suspension dans un milieu ne contenant pas de protéines [27]. En effet, les NMs vont s'entourer d'une corona au contact des biomolécules constituant la membrane, suggérant ainsi un mécanisme d'effet spécifique en absence de protéines. En revanche, en présence de protéines dans le milieu, la corona formée va diminuer l'interaction directe entre les NMs et les cellules, ce qui peut engendrer une toxicité moins prononcée [30]. Il n'est néanmoins possible que les cellules puissent être stressées par l'absence de protéines, dont le rôle est de nourrir les cellules afin de garantir une croissance normale, entraînant une sensibilité accrue vis-à-vis du contaminant et donc une toxicité plus prononcée. Il a également été montré que la composition de la corona avait une influence sur l'entrée des NMs dans les cellules [110]. Ainsi, le milieu avec lequel les particules vont entrer en contact a une grande influence sur les interactions qui ont lieu entre les particules et les cellules, notamment de par la formation d'une corona. Afin de mimer au mieux ce qui se passe *in vivo*, il semble important de pouvoir créer une corona similaire à celle obtenue *in vivo*, après passage des NMs dans le surfactant alvéolaire. Pour cela, il est par exemple possible d'utiliser des surfactants pulmonaires d'origine porcine pour créer une corona spécifique autour des NMs [111].

Dépôt des NMs sur les cellules en submergé

Caractériser le dépôt des NMs sur les cellules est indispensable pour interpréter au mieux les effets observés, car les particules agissent via des interactions de surface avec les constituants biologiques, notamment lorsqu'elles sont peu solubles. Un point limitant du modèle submergé est que la dose délivrée aux cellules varie en fonction du comportement des NMs en suspension, ce qui rend la dosimétrie complexe. La dose dépend notamment de leur capacité de diffusion (force principale pour les NMs < 10 nm) et de sédimentation (force principale pour les NMs > 100 nm) [31-33]. De ce fait, lorsque les NMs sont agglomérés en suspension, leur dépôt est généralement régi par un processus de sédimentation (loi de Stokes).

La sédimentation dépend des propriétés des NMs en suspension et des caractéristiques du dispersant utilisé. Les caractéristiques principales des NMs, qui influent sur la sédimentation, sont le diamètre hydrodynamique et la densité des particules en suspension. Le diamètre hydrodynamique des agglomérats peut être mesuré expérimentalement, par exemple en effectuant des mesures avec un appareil comme le Zeta-sizer ou en effectuant des observations en microscopie électronique. La densité des agglomérats peut être mesurée en suivant la méthode de centrifugation développée par Deloid et al. [112]. Les caractéristiques principales du milieu qui influent sur la sédimentation sont la densité, la viscosité, la concentration en NMs de la suspension, mais également la hauteur de milieu.

En renseignant ces différents paramètres liés aux propriétés des NMs ou du milieu, il est néanmoins possible de modéliser le dépôt au cours du temps en utilisant des modèles mathématiques comme le modèle « in vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry (ISDD) » [33]. Cela permet d'évaluer avec assez de précision la dose de NMs entrant réellement en contact des cellules, tout en estimant le temps nécessaire pour délivrer la dose. Il est également possible d'évaluer le dépôt en NMs directement par dosage. Cependant, le dépôt réel a rarement été évalué *in vitro* en submergé, ce qui peut rendre l'interprétation de certains résultats expérimentaux compliquée [113].

5.2.2.2 Exposition de cellules à l'interface air-liquide (ALI) à des aérosols de NMs

Pour s'affranchir des limites du modèle submergé, éloigné des conditions d'exposition réelles par inhalation de l'homme aux NMs, des méthodes d'exposition dites « à l'interface air-liquide » (ALI) ont été développées [35]. Ces méthodes permettent un contact direct entre les cellules et le contaminant à tester, sans passer par une interface liquide qui pourrait modifier l'interaction entre les NMs et les cellules (Figure 19).

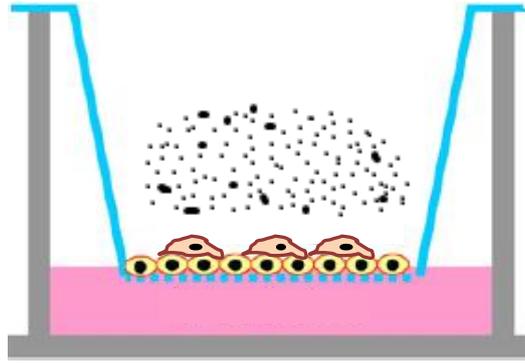


Figure 19 : Contact direct entre les NMs et les cellules par exposition à l'ALI à des aérosols.

Principe de l'exposition à l'ALI

L'un des éléments fondamentaux pour exposer des cellules directement à un contaminant sous forme gazeuse ou en suspension dans l'air est de maintenir les cellules dans leurs conditions physiologiques durant l'exposition. Dans ce but, des premiers systèmes dits à intermittences ont été développés, reposant sur un principe d'alternance entre submersion des cellules par du milieu de culture et exposition directe à la phase gazeuse [35]. Des plateaux oscillants ou des bouteilles rotatives ont par exemple été utilisés. Cependant, ces systèmes ont comme principal inconvénient de ne pas garantir une exposition directe des cellules. En effet, en plus de ne pas être exposées de manière continue, les cellules restent recouvertes par une couche de milieu de culture même quand les conditions du système font qu'elles ne sont plus submergées par du milieu [35, 114].

Afin de garantir un contact direct avec la phase gazeuse, des méthodes d'exposition utilisant des cellules cultivées à l'ALI sur des inserts ont été développées (Figure 15 et 19). L'exposition des cellules à l'ALI sur les inserts peut se faire de manière statique. Dans ce cas, les cellules sont exposées dans un espace clos au sein duquel la phase gazeuse à tester va être ou est déjà introduite. L'exposition peut également se faire de manière dynamique. Ce type d'exposition nécessite un système permettant de créer un flux continu en phase gazeuse à tester. Cela permet d'exposer les cellules de manière plus homogène et mieux reproductible, grâce à un renouvellement continu de l'atmosphère au contact des cellules [35, 114, 115].

Systèmes d'exposition de cellules à l'ALI aux aérosols de NMs

Des systèmes d'exposition ont été développés spécifiquement dans le but d'exposer des cellules directement à des NMs se trouvant en suspension dans l'air. Leur fonctionnement nécessite la prise en considération de plusieurs éléments fondamentaux qui sont : la génération d'une atmosphère d'une concentration connue en contaminant, le dépôt de NMs

directement sur la surface des cellules (par diffusion ou sédimentation), le maintien des cellules dans leurs conditions physiologiques durant l'exposition [25, 35]. Pour souscrire à ces différents critères, les systèmes utilisés sont généralement composés de quatre éléments essentiels : un générateur d'aérosol de NMs, une chambre d'exposition où les cellules sont maintenues à l'ALI dans leurs conditions physiologiques, un dispositif permettant d'amener les aérosols au contact des cellules et un dispositif permettant de caractériser les aérosols et le dépôt.

Générateurs d'aérosols de NMs

Afin de réaliser des études de toxicité, différents points sont à considérer afin de sélectionner un générateur adapté. Il faut prendre en compte : 1) que la capacité de génération varie en fonction des caractéristiques physico-chimiques des NMs utilisés ; 2) que des concentrations importantes doivent être générées afin d'atteindre un dépôt satisfaisant sur les cellules ; 3) que la technique de génération doit minimiser autant que possible l'agglomération des particules dans l'aérosol ; 4) qu'il est préférable que l'aérosol arrivant au contact des cellules soit fortement chargé en humidité (au moins 85%), pour maintenir les cellules dans des bonnes conditions pendant l'exposition [25] ; 5) que l'aérosol généré doit être reproductible et stable pendant toute la durée de l'exposition [25].

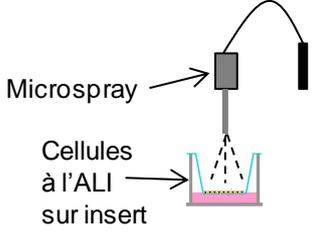
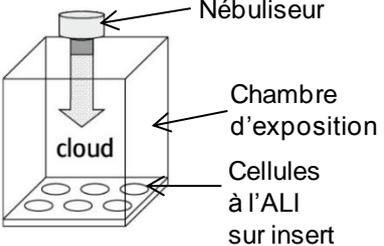
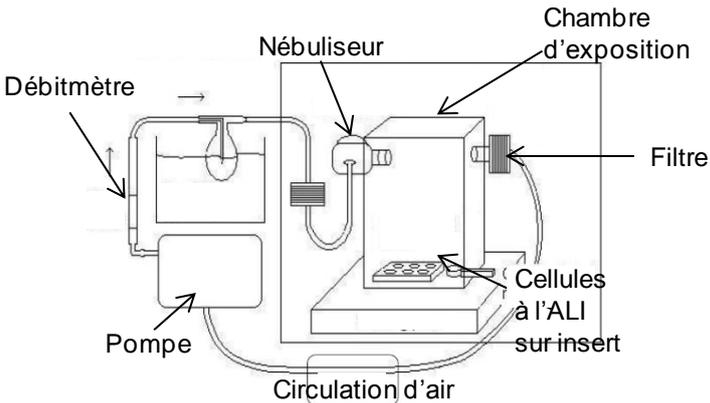
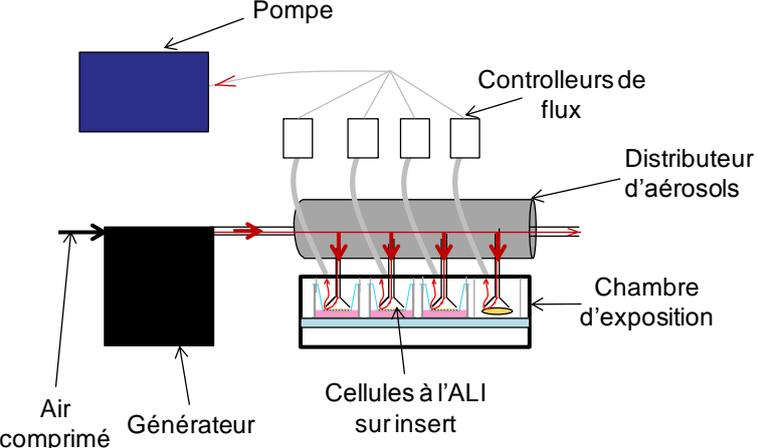
De nombreux types de générateurs ont été développés et peuvent être utilisés pour générer des aérosols de NMs. L'aérosolisation peut se faire directement à partir de poudres sèches, par exemple en utilisant des systèmes venturi [116], une énergie sonore [116, 117], des brosses rotatives [118, 119] ou encore des systèmes de type vortex [120]. L'aérosolisation peut également se faire par voie humide. Les sprays et les nébuliseurs sont parmi les générateurs à voie humide les plus utilisés [116]. Générer à partir de poudres sèches à l'avantage de mieux conserver les caractéristiques physico-chimiques des poudres de NMs au sein de l'aérosol. Cependant, il est généralement établi que la stabilité et la reproductibilité des aérosols générés par voie sèche est souvent plus difficile à maîtriser [116]. De plus, il est souvent nécessaire d'humidifier l'aérosol généré par voie sèche afin de maintenir les cellules dans leurs conditions physiologiques et prévenir d'éventuels dommages pendant l'exposition, ce qui peut entraîner une modification de l'aérosol. Lorsque les aérosols sont générés à partir d'une suspension, il est important de vérifier son homogénéité et sa stabilité et si le liquide de dispersion utilisé n'est pas toxique pour les cellules. Ce sont des éléments nécessaires pour la génération d'aérosols reproductibles et ne produisant pas de faux positifs.

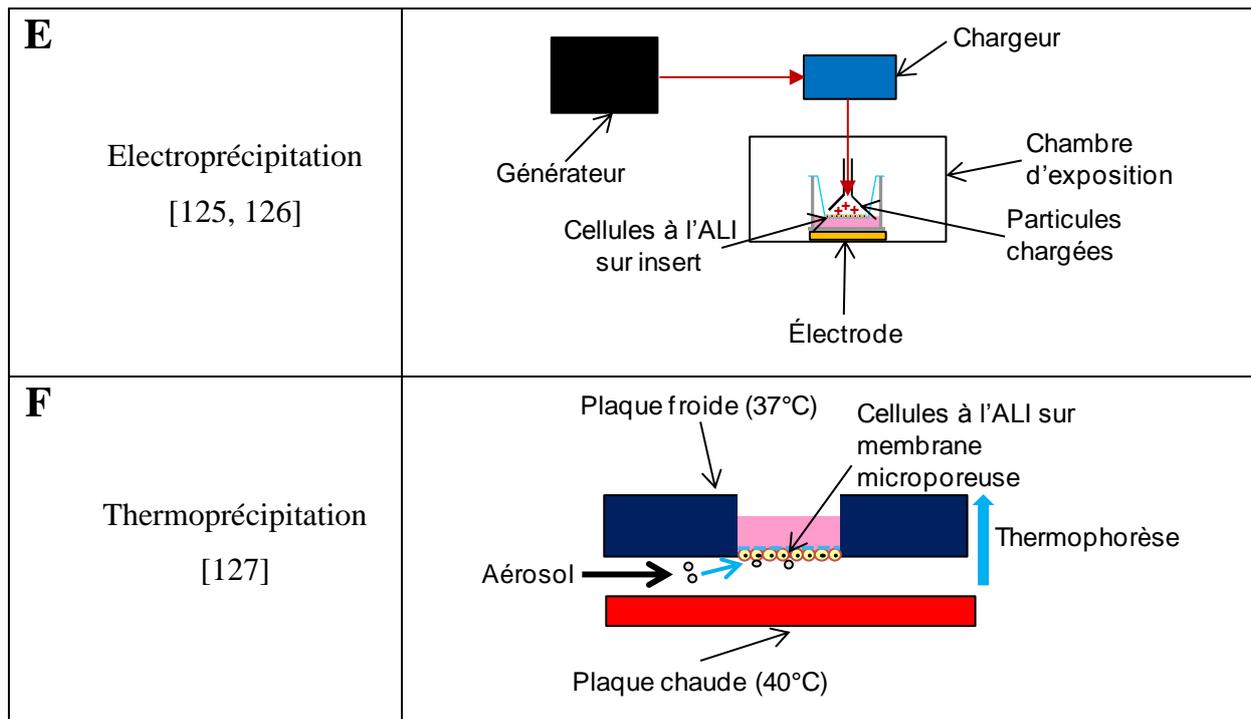
Exemples de systèmes permettant le dépôt de NMs sur des cellules à l'ALI

Parmi les systèmes mis en place pour permettre le dépôt de NMs sur des cellules à l'ALI, le plus simple consiste à exposer de manière statique en générant des aérosols directement sur des cellules cultivées sur des inserts placés dans leur plaque compagnon, par exemple à l'aide d'un microspray [121] (Tableau 9, A). Des systèmes statiques plus avancés comme les « cloud », composés d'un générateur intégré à une chambre d'exposition, ont également été développés (Tableau 9, B). Dans ces systèmes, les cellules sont maintenues dans leurs conditions physiologiques, tandis qu'un aérosol est généré par nébulisation d'un faible volume de suspension en nanoparticules au dessus des cellules. Les NMs aérosolisés se déposent ensuite sur les cellules par sédimentation. Dans ces deux cas, l'exposition est généralement de courte durée, les doses délivrées aux cellules peuvent être importantes et la génération fonctionne sans nécessiter d'air comprimé. Le système « Air-Liquid Interface Cell Exposure » (ALICE) est un système cloud en un peu plus complexe (Tableau 9, C). Il est composé d'une chambre d'exposition contrôlée en température et en humidité connectée à un nébuliseur situé sur le côté de la chambre. Une circulation d'air en boucle fermée à un débit de 5 L/min, grâce à une pompe à air et un débitmètre, permet de transporter le nuage de NMs généré et de le faire tomber au centre de la chambre, ce qui garantit une distribution spatiale uniforme de l'aérosol dans la chambre [122].

Des systèmes dynamiques utilisant des débits de dose plus réduits ont été développés par des sociétés comme Cultex[®] ou Vitrocell[®] (Tableau 9, D). Dans ces systèmes, des chambres d'exposition (température contrôlée et atmosphère humide) sont reliées d'un côté à un distributeur d'aérosols, lui même relié à un générateur qui produit des aérosols de NMs en continue (voie sèche ou voie humide), et d'un autre côté à une pompe à vide, ce qui permet d'aspirer l'atmosphère à tester vers les cellules [123, 124]. Des régulateurs de débit présents entre la pompe à vide et les chambres permettent de contrôler les débits. Un débit inférieur à 8 mL/min, une atmosphère humidifiée et une température contrôlée, garantissent l'absence de perte de viabilité cellulaire pour au moins 2h d'exposition à un flux d'air synthétique [115]. La réduction du débit de dose dans ces systèmes, même si cela permet une exposition plus réaliste, peut être cependant un facteur limitant la dose maximale déposée. Ceci est d'autant plus vrai que les rendements de dépôt peuvent être assez faibles dans ces systèmes (de l'ordre de 1% pour certains NMs et dans certaines conditions). Afin d'augmenter les rendements de dépôt, des systèmes permettant de forcer le dépôt des particules grâce à des forces électrostatiques après les avoir chargées [25, 125, 126] (Tableau 9, E) ou à un gradient de température [127] (Tableau 9, F) ont été développés.

Tableau 9: Exemples de systèmes utilisés pour exposer des cellules à l'ALI à des aérosols de NMs.

| | |
|---|--|
| <p>A</p> <p>Microspray [121]</p> |  |
| <p>B</p> <p>Cloud (www.vitrocell.com)</p> |  |
| <p>C</p> <p>ALICE [122]</p> |  |
| <p>D</p> <p>Vitrocell® ou Cultex® [123, 124]</p> |  |



Méthodes permettant de caractériser les aérosols de NMs

Caractériser les aérosols générés est un pré-requis indispensable afin d'évaluer à quoi sont réellement exposées les cellules. Effectuer de telles mesures est par ailleurs nécessaire afin de calculer la capacité de dépôt des NMs dans les systèmes utilisés.

La concentration massique de l'aérosol en masse par unité de volume d'air est une donnée importante pour la mesure des expositions aux NMs, d'autant plus que c'est la métrique utilisée en norme des aérosols et en hygiène industrielle [128]. En la mesurant, il est ainsi possible d'établir un lien entre concentration d'exposition et effets indésirables constatés. Cependant, pour l'exposition de cellules à l'ALI, le lien est indirect puisque les NMs présents dans l'aérosol ne vont pas tous se déposer sur les cellules. La concentration massique peut être mesurée par différentes techniques. La moins coûteuse reste la gravimétrie. Cela consiste à prélever une partie de l'aérosol durant un temps donné sur un filtre à l'aide d'une pompe réglée à un débit connu [129]. La masse déposée sur le filtre peut être ensuite mesurée à l'aide d'une balance, après séchage des filtres pendant 24h dans un dessiccateur, en retranchant la valeur pesée après exposition de celle du filtre à blanc (masse du filtre séché après dépôt – masse du filtre séché avant exposition). Il est ensuite possible d'en déduire la concentration massique de l'aérosol (masse de NMs pesée/volume d'air échantillonné). Des systèmes de mesure plus complexes, permettant la mesure en temps réel des aérosols, peuvent également être utilisés. Le « Tapered Element Oscillating Microbalance » (TEOM) est composé d'une microbalance. Les particules aspirées au moyen d'une pompe de prélèvement sont déposées

sur un filtre. L'augmentation de la masse du filtre produit une décroissance de la fréquence naturelle de vibration. Cette variation de fréquence est enregistrée en continu et est convertie en variation de masse par un microprocesseur [129, 130]. Le « Laser induced breakdown spectroscopy » (LIBS) peut également être utilisé [131]. La technique consiste à envoyer un laser de haute énergie sur l'aérosol, de sorte à créer un plasma. Dans le plasma, la température et la densité électronique sont suffisamment élevées pour dissocier, vaporiser et ioniser les particules de l'échantillon. La lumière émise par le plasma est ensuite analysée à l'aide d'un spectromètre, ce qui permet d'obtenir le spectre d'émission des particules, donnant ainsi des informations quant à la qualité et la quantité des particules présentes dans l'aérosol. Des impacteurs en cascade permettent aussi de déterminer la concentration massique de l'aérosol [129]. Leur principe repose sur les propriétés d'inertie des aérosols. Les particules ayant une taille supérieure au diamètre de coupure ne vont pas suivre les lignes de courant de l'air et vont entrer en collision avec des plateaux positionnés à 90° dans la ligne de courant. Les particules les plus grosses vont s'impacter contre les premiers plateaux, alors que celles de diamètre plus petit et de vitesse plus élevée vont continuer leur trajectoire avant de s'impacter au niveau des plateaux situés dans les étages suivants.

Parmi les impacteurs existants, le « Electrical Low Pressure Impactor » (ELPI) a l'avantage en plus de donner des informations quant à la distribution en volume, en masse, mais également en nombre de particules dans l'air. En effet, les particules sont chargées en entrée de l'impacteur et un électromètre enregistre les charges induites sur chacun des étages lors de l'impaction des particules. Cela permet de déterminer le diamètre aérodynamique et d'obtenir la granulométrie des particules de 15 nm à 10 µm. [129, 130]

La granulométrie, donc la distribution en taille des particules de l'aérosol, est un paramètre qui doit être mesuré afin de vérifier l'état d'agglomération des NMs en suspension dans l'air. Elle peut être mesurée par exemple en utilisant des compteurs optiques. Ceux-ci fonctionnent grâce à un faisceau laser. Brièvement, les particules en suspension vont passer une par une à travers le faisceau et la quantité de lumière diffusée va être mesurée par un détecteur. Des algorithmes vont ensuite être utilisés pour calculer la taille des particules [129]. Néanmoins, de tels systèmes ne peuvent être utilisés que pour mesurer des NMs agglomérés, puisque la gamme de dimension couverte par ces dispositifs est comprise entre 0,1 et plusieurs dizaines de µm. Il est également possible d'évaluer la distribution en taille des particules présentes dans l'aérosol en mesurant leur charge électrostatique et leur diamètre de mobilité électrique, par exemple à l'aide d'un Differential Mobility Analyzer (DMA). Pour cela, les particules sont tout d'abord chargées, de façon à leur conférer une mobilité électrique qui va être

dépendante de leur taille. Les particules sont ensuite séparées en fonction de leurs propriétés de mobilité électrique, puis analysées, ce qui permet de déterminer leur répartition granulométrique [129]. De plus, il est possible de mesurer la concentration des particules sélectionnées en les saturant par condensation de vapeur de butanol, ce qui les fait grossir, puis en les détectant avec un compteur optique. Ces systèmes sont appelés Compteur de Noyaux de Condensation (CNC). Leur domaine de dimensions est compris entre 0,01 et 1 μm . Des appareils appelés Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) sont constitués d'un DMA et d'un CNC et permettent d'obtenir la distribution en nombre et en volume des particules de l'aérosol mesurant entre 10 et 1100 nm [129].

En conclusion, aucune méthode ne permet à elle seule d'évaluer toutes les caractéristiques physico-chimiques d'un aérosol de NM. Plusieurs méthodes sont généralement couplées afin de caractériser de manière précise les aérosols générés. Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes décrites dans ce paragraphe sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Exemples de méthodes utilisées pour caractériser des aérosols de NMs.

| Méthode utilisée | Principe | Paramètre mesuré | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|---|--|
| Gravimétrie | Prélèvement d'une partie de l'aérosol durant un temps donné sur un filtre, à l'aide d'une pompe. La masse déposée sur le filtre peut ensuite être pesée. | Concentration massique totale | Faible coût, facile à mettre en place | Pas de mesure en temps réel, Masses prélevées doivent être importantes, Prenant en temps |
| Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM) | Particules aspirées au moyen d'une pompe de prélèvement et déposées sur un filtre. L'augmentation de la masse du filtre, produit une décroissance de la fréquence naturelle de vibration. Cette variation de fréquence est enregistrée en continu et est convertie en variation de masse par un microprocesseur. | Concentration massique totale | Mesure en continu | Couteux, appareil encombrant |
| Laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) | Laser de haute énergie envoyé sur l'aérosol pour créer un plasma qui va dissocier, vaporiser et ioniser les particules de l'échantillon. La lumière émise par le plasma est ensuite analysée à l'aide d'un spectromètre, ce qui permet d'obtenir le spectre d'émission des particules. | Identification et concentration massique de plusieurs espèces présentes dans l'aérosol | Mesure en continue, Possible de mesurer différentes espèces dans un aérosol complexe | Couteux, Matériel fragile et complexe à utiliser, limite de quantification élevée, Étalonnage nécessaire |
| Electrical Low Pressure Impactor (ELPI) | Les particules sont chargées en entrée de l'impacteur. Les particules ayant une taille supérieure au diamètre de coupure vont entrer en collision avec des plateaux positionnés à 90° dans la ligne de courant. Les particules les plus grosses vont s'impacter contre les premiers plateaux, alors que celles de diamètre plus petit et de vitesse plus élevée, vont continuer leur trajectoire, avant de s'impacter au niveau des plateaux situés dans les étages suivant. Un électromètre enregistre les charges induites sur chacun des étages. | Concentration massique totale et distribution en taille des particules entre 15 nm et 10 µm | Mesure en continu, Facile d'utilisation, Concentration massique et Granulométrie sur une seule mesure | Couteux, débit de prélèvement très élevé |
| Compteur optique | Les particules en suspension vont passer une par une à travers un faisceau laser et la quantité de lumière diffusée va être mesurée par un détecteur. Des algorithmes vont ensuite être utilisés pour calculer la taille des particules. | Distribution en taille des particules micrométrique (entre 100 nm et quelques dizaines de µm) | Mesure en continu, Bonne outil qualitatif, Possible d'évaluer la concentration massique en calculant la densité des particules dans l'aérosol | Permet de mesurer les NP agglomérées seulement. |
| Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) = Compteur de Noyaux de Condensation (CNC) + Differential Mobility Analyser (DMA) | Les particules sont chargées, de façon à leur conférer une mobilité électrique qui est dépendante de leur taille. Elles sont ensuite séparées en fonction de leurs propriétés de mobilité électrique, puis analysées, ce qui permet de déterminer leur répartition granulométrique. Les particules sélectionnées sont saturée par condensation de vapeur de butanol, ce qui les fait grossir, puis elles sont détectées avec un compteur optique, ce qui permet de mesurer leur concentration. | Distribution en taille des particules nanométriques (entre 10 et 1100 nm) | Mesure en continu, Possible d'évaluer la concentration massique en calculant la densité des particules dans l'aérosol | Ne mesure pas les agglomérats de taille micrométrique |

Méthodes permettant de caractériser le dépôt NMs dans les systèmes

Caractériser le dépôt des NMs sur les cellules après exposition est indispensable pour interpréter au mieux les effets toxiques observés. En effet, il est reconnu que les particules agissent via des interactions de surface avec les constituants biologiques, notamment lorsqu'elles sont peu solubles.

La masse déposée peut être évaluée par différentes techniques. Par exemple, il est possible de mesurer en temps réel la masse déposée dans les systèmes en utilisant des microbalances en cristal de quartz (QCM). En se déposant sur la surface des QCM, les NMs vont induire un signal électrique qui va ensuite être enregistré. Néanmoins, la surface de la QCM étant physiquement différente de celle du tapis cellulaire, il est préférable de s'assurer au préalable que les NMs utilisés vont se déposer similairement sur les deux surfaces. De plus, la sensibilité de la QCM n'est pas suffisante pour quantifier des masses déposées inférieures à 10 ng/cm². La masse déposée sur les cellules après exposition peut être quantifiée par spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) [123]. Brièvement, la membrane des inserts est découpée puis digérée à l'aide de solutions acides. La suspension est ensuite neutralisée puis analysée par ICP-MS en ciblant l'espèce chimique constitutive du NM. La spectrométrie d'absorption atomique peut aussi être utilisée pour déterminer la masse déposée [132], à condition que l'énergie d'absorption des NMs utilisés soit comprise entre 180 et 1000 nm. Il est également possible de quantifier l'intensité de fluorescence à l'aide d'un fluoromètre lorsque les NMs sont fluorescents, et ainsi d'estimer le dépôt [121, 123].

La taille, la répartition et la quantité en particules déposées sur la surface peut également être évaluée. Pour cela, la microscopie électronique est généralement utilisée [133]. Il est par exemple possible d'utiliser des grilles de cuivre qui vont être placées à la surface des inserts. Après exposition, les NMs déposés sur la surface des grilles sont ensuite analysés en microscopie électronique à transmission (MET). La taille et la répartition des NMs déposés sur les cellules peuvent également être évaluées en microscopie électronique à balayage.

Rendements de dépôt dans les différents systèmes utilisés

Une fois les doses déposées et les aérosols caractérisés, il est possible de calculer les rendements de dépôt dans les différents systèmes, ce qui est représentatif de leur efficacité. Pour cela, il suffit de calculer les doses maximales de NMs pouvant théoriquement se déposer sur les cellules. Par exemple, pour une concentration massique mesurée dans l'aérosol (en µg/m³, ou nombre/m³) et sachant le volume d'aérosol passant dans la chambre d'exposition (en m³), la dose théorique maximale correspondant à 100% de dépôt dans le système peut être

calculée en μg ou en nombre. Il suffit ensuite de faire le rapport des doses déposées réellement mesurées sur les doses maximales calculées.

Dans la littérature, différents rendements de dépôt ont été calculés, ceux-ci variant en fonction des systèmes d'exposition, des NMs et des méthodes de caractérisation utilisées.

Frohlich et al. [121] ont évalué le dépôt de NMs de polystyrène (taille primaire de 20 nm et 200 nm) et de CNTs sur les cellules en utilisant deux systèmes différents. L'exposition a été effectuée directement sur les cellules à l'aide d'un microspray, ou en utilisant un système Vitrocell[®]. Avec le microspray, des rendements de dépôt de l'ordre de 25% environ ont été calculés pour tous les NMs testés. En revanche, des rendements de dépôt beaucoup plus faibles ont été calculés avec le système Vitrocell[®]. Ils sont de l'ordre de 0,3% pour les NMs de polystyrène et d'environ 5% pour les CNTs. En évaluant le dépôt de plusieurs NMs de SiO₂ sur des grilles MET après exposition dans un système Vitrocell[®], Comouth et al. [133] ont calculé un rendement de dépôt compris entre 0,17 et 4% en fonction de la taille des NMs utilisés, assumant que le dépôt sur les cellules était similaire à celui observé sur les grilles MET. Après analyse du dépôt de NMs carbonés (diamètre median de mobilité de 95 nm dans l'aérosol) sur des grilles MET, Bitterle et al. [134] ont calculé un rendement d'environ 2% dans le système Vitrocell[®]. Dans une autre étude [124] où le système Vitrocell[®] a été utilisé, le dépôt de NMs de ZnO a été évalué à l'aide de grilles MET, cependant, le rendement de dépôt n'a pas été calculé. En utilisant des chambres d'exposition de la compagnie Cultex[®], Elihn et al. [132] ont mesuré la masse de deux NMs de Cu (diamètre géométrique moyen de l'aérosol de 80 et 180 nm) par spectrométrie d'absorption atomique et ont calculé des rendements de dépôt de 0,05% et 1,1%. Après exposition à des aérosols de NMs fluorescents d'ammonium (diamètre médian de l'aérosol de 60 nm) dans un système Vitrocell[®], Kim et al. [123] ont calculé un rendement de dépôt beaucoup plus élevé, de l'ordre de 70%, après avoir mesuré l'intensité de fluorescence des NMs déposés avec un fluoromètre. Dans cette étude, le dépôt de NMs de cuivre a également été évalué par ICP-MS, cependant aucun rendement de dépôt n'a été calculé. Cette augmentation de dépôt est peut être due à la présence d'un tube de distribution spécifique qui n'est pas présent dans les systèmes Vitrocell[®] utilisés dans les autres études présentées précédemment et qui permettrait d'augmenter le dépôt sur les cellules. Cependant, il est au final difficile de comparer directement les dépôts dans ces différents systèmes Vitrocell[®] ou Cultex[®], car les NMs et les générateurs utilisés sont différents.

Le système ALICE a également été utilisé dans plusieurs études. En utilisant des NMs de ZnO (diamètre primaire de 24-71 nm), Lenz et al. [122] ont notamment calculé que 7,2% des

NMs pouvaient se déposer sur la surface des cellules présentes sur une plaque 6 puits, ce qui correspond à un ratio de dépôt de 1,2% par puits. Ce ratio a notamment été calculé après mesure de la masse déposée sur des QCM. Des rendements de dépôt similaires ont été calculés après exposition de cellules à des CNT en utilisant l'ALICE [135].

Globalement, les rendements de dépôt dans les différents systèmes sont assez faibles. Cela nécessite donc de générer des aérosols très concentrés en NMs afin d'obtenir des doses déposées de l'ordre de quelques $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ qui sont en général suffisantes pour observer des effets toxiques. Pour augmenter les rendements de dépôt, il est possible d'utiliser des systèmes forçant le dépôt des NMs par électroprécipitation de particules chargées. Des dépôts de 15 à 30% [126] et de 15% [125] ont été calculés et Comouth et al. [133] ont montré que le dépôt pouvait être multiplié par 22, faisant passer les rendements de 0,5 à 11% en utilisant l'électroprécipitation. Le dépôt des particules peut également être forcé par thermoprécipitation, ce qui peut entraîner des rendements de dépôt de l'ordre de 20% [127].

5.2.2.3 Conclusions sur les méthodes d'exposition *in vitro* aux NMs

Les cellules des voies respiratoires peuvent être cultivées *in vitro* avec une interface air-liquide, ce qui permet de se rapprocher de l'organisation des cellules dans les poumons *in vivo*. L'exposition à l'ALI représente donc une alternative plus physiologique afin d'évaluer la potentielle toxicité de NMs inhalables. Cependant, exposer des cellules de cette manière nécessite l'utilisation de systèmes complexes et coûteux, une expertise en science des aérosols, et la mise en place d'installations pour minimiser les risques liés à l'utilisation d'aérosols de NMs. Cela restreint l'accès à cette méthodologie. De plus, les rendements de dépôt dans les différents systèmes utilisés sont assez faibles. Ainsi, pour atteindre des doses déposées suffisantes pour observer des effets toxiques (de l'ordre de quelques $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), il est nécessaire de générer des aérosols très concentrés en NMs, donc d'utiliser des masses importantes de poudres de NMs avec un taux de perte important. Au contraire, la méthode submergée, même si elle est moins représentative de ce qui se passe *in vivo*, est peu coûteuse, facilement mise en place et ne nécessite pas de grande quantité de matière à tester. De plus, les doses maximales testées peuvent être bien plus importantes qu'en ALI, même si les doses testées en ALI (quelques $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), sont en général d'ores et déjà bien supérieures aux doses d'exposition chez l'Homme [25]. Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes *in vitro* utilisées pour exposer des cellules à des aérosols de NMs sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Avantages et inconvénients des méthodes utilisés pour exposer des cellules à des aérosols de NMs.

| Méthode d'exposition | Avantages | Inconvénients |
|----------------------|---|--|
| Submergé | Peu couteux Facile à mettre en place Nécessite peu de quantité de matière pour les tests Possible de faire du criblage haut débit | Interaction des NP avec le milieu avant d'interagir avec les cellules Éloigné des conditions physiologiques |
| ALI | Proche des conditions physiologiques Contact direct entre NP et cellules sans passer par une interface liquide Adaptation des cellules à la culture à l'ALI | Coûteux Nécessite des systèmes d'exposition complexes Nécessite une expertise en science des aérosols Nécessite une quantité de matière importante pour les tests Technique consommatrice en temps |

5.3 Conclusion sur les méthodes *in vivo* et *in vitro* utilisables pour évaluer la toxicité des NMs par voie respiratoire

Les modèles *in vivo* et *in vitro* sont des outils très importants afin d'évaluer les potentiels effets indésirables chez l'Homme, notamment en absence de données épidémiologiques. Grâce à leur utilisation, il semble possible de restreindre l'usage de certains NMs potentiellement toxiques ou encore de promouvoir le développement de NMs « safer by design » conçues pour limiter les potentiels effets toxiques.

D'un point de vue méthodologique, un grand nombre de modèles *in vivo* comme *in vitro* et de méthodes d'exposition différentes sont disponibles pour étudier les réponses toxiques au niveau pulmonaire. Chaque modèle a ses avantages et ses inconvénients (Tableaux 5, 7, 8, 11) et une réflexion approfondie est nécessaire afin de sélectionner le modèle adapté à ce que l'on veut mettre en évidence. Il est par ailleurs possible de confirmer les résultats obtenus ou de pallier aux inconvénients de certains modèles en combinant plusieurs. Par exemple, des expérimentations *in vitro* peuvent être réalisées sur des modèles cellulaires de tissus ou d'organes différents afin d'étudier des effets toxiques multi-localisés. Il est également

possible de combiner l'utilisation du *in vivo* et du *in vitro* pour faire le screening de plusieurs NMs ou encore étudier plus en détails des mécanismes d'action.

Néanmoins, il semble indispensable, pour des raisons éthiques notamment, de promouvoir l'utilisation des modèles *in vitro* en tant qu'alternative à l'expérimentation animale. Dans cette optique, le développement croissant de nouveaux modèles cellulaires et de systèmes d'exposition plus physiologiques laisse à présager que le *in vitro* devrait occuper à l'avenir une place encore plus importante en toxicologie des NMs.

6. Toxicité des NMs au niveau pulmonaire et utilisation de méthodes *in vitro* plus complexes

6.1 Mécanisme général de toxicité

Les effets toxiques des NMs au niveau pulmonaire ont été évalués *in vivo* et *in vitro* dans un grand nombre d'études [76, 136]. Généralement, il a été montré que certains NMs pouvaient à court terme générer un stress oxydatif lorsqu'ils entraient en contact avec des cellules. Cela peut provoquer une réaction inflammatoire rapide (en moins de 24h) dans le but d'éliminer les NMs. En cas de dommages, un processus se met en place afin de réparer les tissus. En cas de réparation anormale, une fibrose pulmonaire peut à plus long terme s'installer et l'apparition de cancers est une possibilité [76]. (Figure 20).

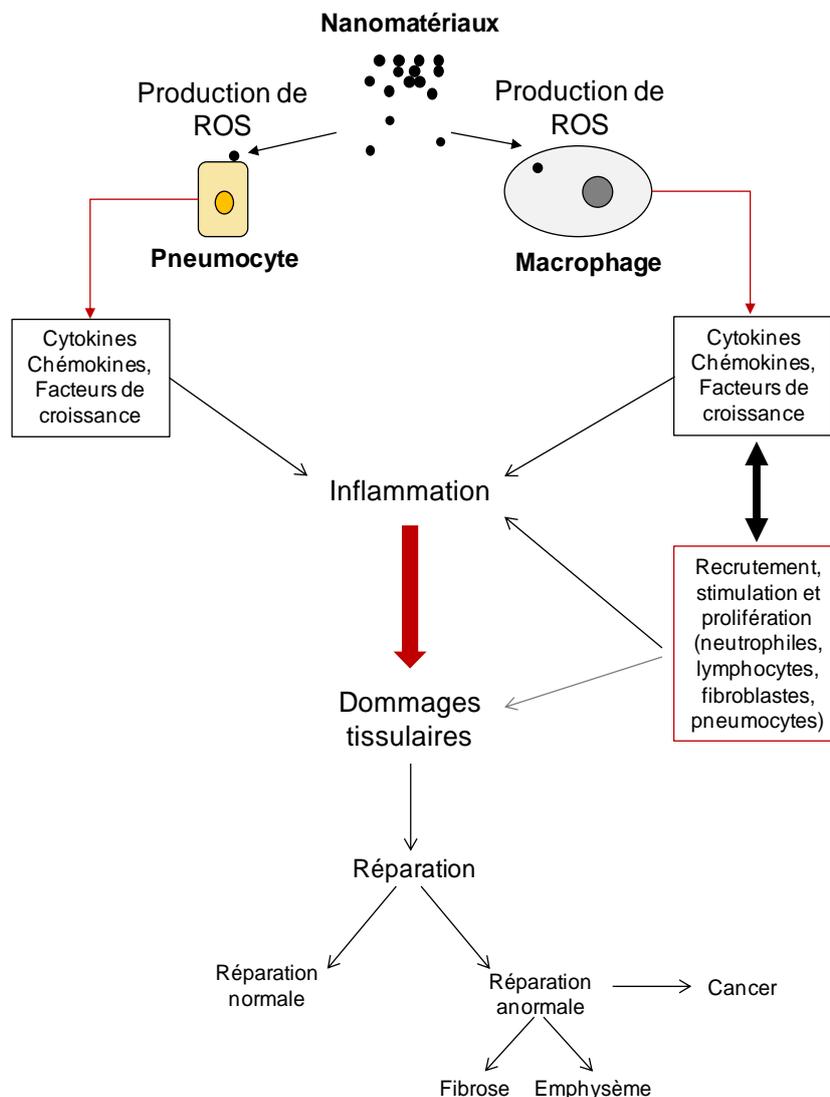


Figure 20 : Interactions NMs-cellules alvéolaires et effets biologiques possibles.

6.1.1 Une toxicité accrue des NMs de par leur taille nanométrique

Des mécanismes d'effets similaires ont été observés avec des particules de taille micrométrique. Il a néanmoins été montré dans plusieurs études que les NMs semblaient plus toxiques par rapport à des particules plus larges, du fait d'une surface active plus importante (Tableau 12) [2, 76, 136]. De plus, de par leur taille nanométrique, les NMs sont plus lentement éliminés par les macrophages que les particules plus grosses. Cela entraîne un contact prolongé au niveau des alvéoles [2, 137]. Il a également été mis en évidence que les NMs, du fait de leur petite taille, pouvaient traverser les barrières de l'organisme plus facilement et par des mécanismes différents par rapport à des particules plus grosses [76, 137-140]. Les NMs peuvent ainsi atteindre d'autres organes que les poumons plus aisément que les microparticules. Par ailleurs, les NMs qui sont solubles peuvent libérer plus facilement des ions que des particules solubles plus larges, du fait d'une surface de contact plus importante avec le milieu de dilution [141]. Il a par ailleurs été montré que les ions libérés par ce type de NMs étaient généralement plus toxiques que l'espèce sous sa forme solide [74, 142, 143].

Tableau 12 : Comparaison des effets des NMs par rapport à des particules plus larges (adapté de [76]).

| | | Nanomatériaux (< 100 nm) | Particules plus larges (> 500 nm) |
|--|-----------------|---|--|
| Caractéristiques | | Grande surface active | Surface active plus faible |
| Épuration par les macrophages | | + | +++ |
| Translocation vers des organes secondaires | | Oui | Seulement en cas de surcharge pulmonaire |
| Entrée dans les cellules : | cytoplasme | Oui, par phagocytose, pinocytose, caveolines, clathrines, diffusion | Par phagocytose |
| | mitochondrie | Oui | Non |
| | noyau | Oui (< 40 nm) | Non |
| Effets pulmonaires | Inflammation | ++ | + |
| | Stress oxydatif | ++ | + |
| | Génotoxicité | ++ | + |

6.1.2 Des effets dépendants des propriétés des NMs

Les NMs représentent un challenge particulier en toxicologie, c'est pourquoi une nouvelle discipline, la nanotoxicologie, a été introduite pour mieux encadrer l'évaluation des dangers de ceux-ci [144]. En effet, du fait de leurs caractéristiques, les NMs peuvent ne pas entrer en contact de la même manière avec les tissus biologiques que des substances chimiques classiques ou que des particules de plus grosse taille (Cf. § 3.2 et 3.3). Cela rend l'évaluation de leur toxicité plus complexe. Par ailleurs, la définition des NMs étant très large (Cf. § 1.1), les caractéristiques des NMs peuvent être complètement hétérogènes et les interactions avec les matrices biologiques peuvent se faire de manières différentes [22].

Certains NMs sont insolubles et se présentent uniquement sous leur forme solide, alors que d'autres se solubilisent et libèrent des ions. Les NMs insolubles vont induire une toxicité majoritairement après contact direct avec les matrices biologiques. Pour ces NMs, il a été montré que les effets observés étaient très dépendants de leur activité de surface, qui varie en fonction de leur taille primaire [139]. Plus la taille primaire est faible, plus l'activité de surface est grande et plus les réponses toxiques sont observées à des doses faibles. Prendre en compte cette activité de surface permettrait ainsi de mieux expliquer les différences d'effets observées entre des NMs chimiquement similaires, mais de tailles différentes [141, 145]. En revanche, dans le cas des NMs solubles, la toxicité est induite par le contact direct entre la particule et le tissu biologique, mais également par la présence d'ions toxiques [24, 142]. En terme de toxicité, pour des NMs de tailles similaires, il a été montré que les NMs solubles étaient potentiellement plus toxiques que celles insolubles du fait de la présence d'ions [142]. Néanmoins, la capacité de certains NMs à libérer des ions n'est pas le seul paramètre expliquant les différences d'effets observées entre plusieurs NMs de même taille.

Les réponses toxiques sont également dépendantes de l'identité chimique des NMs. Par exemple, certaines silices non solubles ont montré une toxicité accrue par rapport à d'autres NMs faiblement solubles comme certains TiO_2 [139]. Des NMs identiques mais enrobés avec des revêtements hydrophiles ou hydrophobes lors de leur fabrication ont généré des réponses toxiques différentes par rapport à des particules non enrobées. Notamment, Demokritou et al. [146] ont observé que des NMs de CeO_2 recouverts de silice amorphe n'étaient pas toxiques *in vivo*, contrairement à ceux dépourvus de revêtement. Il a par ailleurs été montré dans plusieurs études que la toxicité des NMs était plus dépendante des propriétés du revêtement que celles du corps du NM [136, 137, 147]. Ceci est notamment dû au fait que les cellules vont entrer en contact directement avec le revêtement et pas forcément avec l'espèce

constituant le corps du NM [137]. Il a également été mis en évidence que les effets toxiques pouvaient être différents en fonction de la structure cristalline des NMs [137]. Par exemple, il a été montré que la forme anatase du TiO_2 semblait plus toxique que la forme rutile [137, 148].

La forme et plus précisément le rapport longueur/diamètre a également un impact important sur les réponses toxiques observées. Ce paramètre est d'autant plus important à prendre en compte que les particules nanométriques en forme de fibres peuvent se déposer dans les alvéoles, quel que soit leur longueur. En effet, la longueur n'influant pas sur le diamètre aérodynamique des nanofibres, le dépôt dans les alvéoles va uniquement dépendre de leur diamètre, qui lui est de taille nanométrique. Il a ainsi été démontré que la longueur des nanofibres était un élément fondamental dans l'induction des effets toxiques [141]. En effet, du fait de leur longueur, celles-ci sont potentiellement plus toxiques du fait d'une faible élimination par les phagocytes. Ce phénomène appelé phagocytose frustrée entraîne un temps d'exposition prolongé au niveau alvéolaire et la libération de composés toxiques [141]. Néanmoins, il semblerait que les phagocytes soient capables d'éliminer correctement les nanofibres présentes dans les alvéoles jusqu'à une taille d'environ $14 \mu\text{m}$ [149].

6.2 Toxicité des nanoparticules (NPs) métalliques faiblement solubles au niveau pulmonaire : exemples du TiO_2 et du CeO_2

Les NPs font partie d'une catégorie particulière de NMs, caractérisée par trois dimensions dans l'espace inférieure à 100 nm. Les NPs métalliques faiblement solubles sont parmi les NMs les plus utilisés (cf. § 1.2) et leur la toxicité est principalement attribuable à un contact direct avec les cellules. Pour ce type de NPs, des effets toxiques ont été observés *in vivo* comme *in vitro*, similairement à ce qui a été décrit précédemment (Figure 20), mais généralement à des concentrations élevées par rapport à des scénarios d'exposition réalistes [25].

6.2.1 Toxicité des NPs de TiO_2

6.2.1.1 Toxicité *in vivo* des NPs de TiO_2

Des études *in vivo* chez le rat et la souris ont montré que les NPs de TiO_2 pouvaient provoquer des effets indésirables à de fortes doses généralement supérieures à $0,5 \text{ mg/kg}$, que cela soit après inhalation ou après instillation. Notamment, une réponse inflammatoire rapide [137,

150, 151] caractérisée par une augmentation significative du nombre de phagocytes (neutrophiles et macrophages) dans les liquides des lavages broncho-alvéolaires ainsi que par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires [137, 150], un stress oxydatif et une cytotoxicité ont été mis en évidence dans plusieurs études. En cas d'exposition aiguë, l'inflammation est généralement réversible au bout de quelques jours [150, 151]. Néanmoins, il a été rapporté que les effets pouvaient être prolongés en cas de surcharge pulmonaire, du fait notamment d'une clairance ralentie [152].

Il a par ailleurs été montré que la méthode d'exposition utilisée était un paramètre important à considérer. Dans leur étude, Baish et al. [150] ont comparé les réponses toxiques chez le rat après exposition aiguë ou répétée de NPs de TiO₂ par inhalation et par instillation. Pour des doses similaires déposées dans les poumons, ils ont observé que les NPs de TiO₂ étaient éliminées plus rapidement après inhalation d'aérosols à la concentration de 33 mg/m³, par rapport à l'instillation de doses de 1 mg/kg. Ils ont également observé plus d'effets (inflammation, cytotoxicité) après l'instillation. Les auteurs ont mis en évidence que les différences de réponses pro-inflammatoires observées entre l'inhalation et l'instillation pouvaient être expliquées par des différences de débit de dose. En effet, la dose a été administrée instantanément après instillation, alors qu'elle l'a été en 4h après inhalation. Néanmoins, il reste possible que des quantités de NPs sensiblement moins importantes aient atteint les alvéoles après inhalation, ce qui pourrait expliquer les différences de clairance ainsi que les différences d'effets observées dans leur étude.

À plus long terme, des dommages tissulaires peuvent apparaître (fibrose par exemple), du fait d'une clairance lente des NPs [118, 153]. En effet, la présence de dommages tissulaires est encore plus importante pour des expositions chroniques ou sub-chroniques, du fait d'une inflammation persistante [153]. Il a par ailleurs été montré que la clairance et les effets toxiques des NPs pouvaient être différents en fonction du modèle animal utilisé. Par exemple une étude d'inhalation sub-chronique (13 semaines) a montré que la clairance était fortement impactée chez le rat et la souris, plus particulièrement à la plus forte concentration dans l'aérosol (10 mg/m³), mais pas chez le hamster [118]. De plus les auteurs ont observé dans cette étude des effets inflammatoires plus prononcés chez le rat que chez la souris, avec pour conséquence des dommages tissulaires plus importants.

Après exposition chronique à de fortes doses, des effets génotoxiques et cancérigènes ont été mis en évidence [137, 153]. Le TiO₂ a d'ailleurs été classé en 2006 par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) comme étant un cancérigène possible pour l'Homme (groupe 2B) du fait de preuves suffisantes provenant d'études chroniques chez l'animal [154,

155]. Cependant, l'absence d'effets génotoxiques et cancérigènes a été observée dans plusieurs études [137, 153], ce qui fait que la potentielle cancérogénicité des NPs de TiO₂ n'est pas clairement définie.

6.2.1.2 Toxicité *in vitro* des NPs de TiO₂

In vitro, il a été montré que les NPs de TiO₂ pouvaient induire une réaction pro-inflammatoire, un stress oxydatif, une cytotoxicité et une génotoxicité sur des cellules pulmonaires après exposition aiguë à des suspensions, mais généralement à de fortes doses [137, 153, 156, 157]. Cependant, contrairement à *in vivo*, il est très difficile de définir des doses minimales d'effet *in vitro*. En effet, pour une NP de TiO₂ donnée, la nature et les niveaux d'activation des effets observés sont fortement dépendants des modèles cellulaires, des méthodes de dispersion et des milieux de culture utilisés.

Par exemple, après exposition de cellules alvéolaires épithéliales (lignée A549) ou de macrophages (lignée RAW264.7) à des NPs de TiO₂ (concentrations de 200 µg/mL environ), Panas et al. [156] ont montré un stress oxydatif et une réponse pro-inflammatoire accrue lorsque le milieu de culture ne contenait pas de sérum. Des différences ont également été observées entre les deux types cellulaires, puisqu'une cytotoxicité a été observée en absence de sérum uniquement sur les macrophages. Prasad et al. [158] ont observé que les effets toxiques étaient dépendants du milieu de culture utilisé pour suspendre les NPs. Ils ont constaté plus d'effets génotoxiques après exposition de cellules bronchiques (lignée BEAS-2B) à des concentrations allant de 20 à 100 µg/mL lorsque les NPs étaient suspendues dans un milieu de culture riche par rapport à un milieu appauvri en protéines. Par ailleurs, des différences d'effets ont été observées après expositions de monocultures par rapport à des co-cultures. Des réponses pro-inflammatoires significatives ont été mesurées après exposition de cellules épithéliales alvéolaires et de macrophages en co-cultures à des concentrations en NPs de TiO₂ de 2,5 et 39 µg/cm² mais pas sur des monocultures de cellules épithéliales seules [159]. Des observations similaires ont été effectuées en utilisant d'autres NPs faiblement solubles comme le SiO₂ [159-161].

Par ailleurs, dans la plupart des études, les doses réellement déposées sur les cellules n'ont pas été systématiquement évaluées, alors même que les NPs faiblement solubles sont toxiques par contact direct avec les cellules. De plus, la présence d'interférences entre les tests *in vitro* et les NPs peut également contribuer à l'apparition de faux positifs ou négatifs [162, 163], d'autant plus que ces potentielles interférences n'ont pas été systématiquement évaluées. Cela complique l'interprétation des résultats issus de la littérature.

6.2.2 Toxicité des NPs de CeO₂

Globalement, les NPs de CeO₂ ont été moins étudiées que celles de TiO₂, notamment du fait d'une utilisation plus modérée et plus récente. Néanmoins, des effets similaires ont été observés [164].

6.2.2.1 Toxicité *in vivo* des NPs de CeO₂

Comme pour le TiO₂, des effets pro-inflammatoires associés à des effets cytotoxiques et oxydatifs ont été mis en évidence chez le rat, jusqu'à plusieurs jours après une exposition unique par inhalation ou par instillation. Par exemple, de tels effets ont été notés à partir de doses nominales de 0,15-0,5 mg/kg après l'instillation [165] et à une concentration dans l'aérosol de 641 mg/m³ après 4h d'inhalation [166]. Dans les deux études citées précédemment, les effets ont été observés à 24h mais également jusqu'à 28 j après l'exposition. Dunnick et al. [167] ont mis en évidence des effets cytotoxiques à 1 et 7 jours après instillation dans les poumons de doses supérieures à 0,5 mg/kg chez le rat. Des effets anti-oxydants ont été observés, mais uniquement 84 jours après l'instillation. Des effets pro-inflammatoires (augmentation des neutrophiles mais sans augmentation des cytokines) ont été mesurés après 7 jours mais pas après 1 jour et pratiquement pas après 84 jours.

Des effets ont également été montrés après exposition répétée. Aalapati et al. [168] ont mis en évidence chez la souris des effets inflammatoires et cytotoxiques après 7, 14 et 28 jours d'exposition (6h/jour) à des aérosols de 2 mg/m³ et après des temps de récupération de 1, 14 et 28 jours. Des effets oxydatifs ont aussi été montrés, mais uniquement à partir de 14 jours d'exposition. Après inhalation répétée chez le rat pendant 5 jours [169] et 28 jours (6h/jour) [169, 170], des effets pro-inflammatoires et cytotoxiques ont également été observés juste après la dernière exposition, à des doses déposées dans les poumons supérieures à 2,5 mg/kg. Après 5 jours d'exposition par inhalation, quelques effets significatifs ont également été observés à la plus faible concentration (0,5 mg/m³) correspondant à des doses déposées de 0,2 mg/kg, alors qu'aucun effet n'a été détecté à cette concentration après 28 jours d'exposition [169]. À moyen terme, c.-à-d. environ 30 jours après exposition, des effets inflammatoires persistants [169-171] pouvant entraîner des fibroses [171] ont également été observés.

En revanche, les potentiels effets des NPs de CeO₂ au long terme ont été très peu étudiés. Une étude d'exposition répétée par inhalation pendant 2 ans est en cours de réalisation dans un laboratoire de recherche du groupe Allemand BASF et des premiers résultats ont été publiés dans un travail de thèse pour les temps 13 et 52 semaines [172]. Au bout de 13 et 52 semaines

d'exposition répétée, des effets pro-inflammatoires et cytotoxiques ont été mis en évidence à des concentrations d'exposition de 1 et 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Les doses pulmonaires correspondantes à 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ étaient de 1,39 mg/rat après 13 semaines et de 2,69 mg/rat après 52 semaines. Des réponses pro-inflammatoires significatives ont également été mises en évidence après exposition à une plus faible concentration de 0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ mais seulement après 52 semaines d'exposition répétée. L'observation d'effets uniquement au bout de 52 semaines pourrait être attribuable au fait que la masse déposée dans les poumons est plus importante à 52 qu'à 13 semaines, néanmoins, les doses déposées à la plus faible concentration n'ont pas été répertoriées dans le manuscrit.

Par ailleurs, les données d'inflammation (neutrophiles dans les lavages broncho alvéolaires) obtenues après 13 et 52 semaines d'exposition ont été mises en perspectives avec des données obtenues après 4 semaines d'exposition répétée [172]. Pour des doses déposées dans les poumons similaires, les auteurs ont noté des effets plus importants à 4 semaines. Ceci pourrait montrer qu'une adaptation des systèmes de défense de l'hôte vis-à-vis des NPs serait mise en place lorsque l'exposition est répétée. Néanmoins, cette différence d'effet semble plutôt due à l'utilisation d'un débit de dose plus important à 4 semaines. En effet, les auteurs ont montré qu'utiliser les débits de dose plutôt que les masses déposées dans les poumons permettait de mieux expliquer les réponses pro-inflammatoires observées [169, 172].

En ce qui concerne le potentiel cancérigène des NPs de CeO_2 après inhalation, aucune étude *in vivo* au long terme n'a été publiée et de tels effets n'ont à l'heure d'aujourd'hui pas été montrés.

6.2.2.2 Toxicité *in vitro* des NPs de CeO_2

Des effets cytotoxiques, oxydatifs, pro-inflammatoires et génotoxiques ont été observés *in vitro* pour le CeO_2 [164]. Cependant, comme décrit précédemment pour le TiO_2 , il n'est pas possible de définir des doses minimales claires pour ces effets, du fait d'une hétérogénéité importante concernant les matériels et méthodes utilisés dans les différentes études.

Par exemple, Kroll et al. [173] ont observé des effets oxydatifs après exposition de cellules A549 et de macrophages (lignée RAW264.7) à la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en suspension, mais sans cytotoxicité associée. Mittal et Pandey [174] ont mis en évidence des effets cytotoxiques, oxydatifs et génotoxiques après exposition de cellules A549 à partir de concentration en suspension de 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ils ont par ailleurs montré un stress oxydatif plus important à 3h et 6h qu'à 24h. Des effets oxydatifs et cytotoxiques ont également été montrés dans d'autres études [164, 175]. Dans une étude comparative entre modèles *vivo* et *vitro* avec

des NPs faiblement solubles (CeO₂, TiO₂, SiO₂), des effets pro-inflammatoires ont été observés *in vitro* sur des macrophages alvéolaires à des doses supérieures à 12,5 µg/cm² pour le CeO₂ et le TiO₂ et à des doses supérieures à 6,25 µg/cm² pour le SiO₂. Xia et al. [142] ont comparé les effets toxiques après exposition de cellules RAW264.7 et BEAS-2B pendant 16h à des concentrations en NPs de CeO₂, TiO₂ et ZnO de 25 µg/mL. Ils ont observés des effets toxiques importants (cytotoxiques, pro-inflammatoires, oxydatifs) après exposition avec le ZnO qui est une particule soluble, cependant, ils n'ont pas mesuré de différences significatives pour le CeO₂ et le TiO₂.

6.2.3 Résumé des effets toxiques des NPs de TiO₂ et de CeO₂

D'après la littérature, les nanoparticules de TiO₂ et de CeO₂ apparaissent comme étant potentiellement toxiques après exposition pulmonaire court terme et long terme. *In vivo*, même si des différences existent en fonction des caractéristiques physico-chimiques des NPs testées, l'activation des premières réponses biologiques a été mise en évidence à des doses assez importantes mais inférieures au taux de surcharge pulmonaire [14, 152, 176]. La surcharge pulmonaire apparaît lorsque le volume occupé par les NPs déposées dans les poumons correspond au minimum à 6% du volume total des macrophages alvéolaires [177-179]. Le fait d'observer les premiers effets à des doses inférieures au taux de surcharge pulmonaire, mais à des concentrations assez importantes, semble toutefois indiquer une toxicité modérée de ces NPs au niveau pulmonaire. D'autre part, au vu de l'ensemble des résultats, les NPs de TiO₂ et de CeO₂ semblent présenter une toxicité similaire, avec notamment des niveaux d'activation des effets indésirables proches.

6.3 Mise en perspective des effets toxiques *in vitro* par rapport à *in vivo* après exposition pulmonaire à des NPs

Des effets toxiques de même nature ont été observés sur des modèles *in vivo* et *in vitro* après exposition aiguë à des NPs faiblement solubles comme le TiO₂ et le CeO₂. Les expérimentations sur modèles cellulaires semblent donc représenter une alternative crédible à l'expérimentation animale d'un point de vue qualitatif. Néanmoins, il n'existe à l'heure d'aujourd'hui aucun consensus quant à la méthodologie à suivre pour évaluer de la manière la plus juste possible les réponses constatées *in vivo* à l'aide de méthodes *in vitro*. Faute de cela, l'expérimentation animale reste de loin la méthode de référence pour évaluer les potentiels

effets toxiques des NPs. En revanche, afin de mieux estimer les limites des modèles *in vitro* et les progrès à faire en matière de développement, et ainsi de trouver des modèles *in vitro* qui permettraient de prédire les effets observés *in vivo* après exposition aiguë par voie respiratoire, des études comparatives ont été réalisées.

6.3.1 Considérations méthodologiques pour comparer le *in vitro* au *in vivo*

Comparer les effets *in vitro* et *in vivo* n'est pas chose aisée car les effets toxiques sont très dépendants des conditions expérimentales utilisées. Afin d'effectuer des comparaisons fiables, il semble donc tout d'abord nécessaire de sélectionner des modèles cellulaires, des méthodes et des conditions d'exposition permettant de représenter *in vitro* ce qui se passe *in vivo* (voir chapitre précédent). En évaluant des effets biologiques et en utilisant des référentiels de dose similaires aux deux méthodologies, il est ensuite possible d'établir des corrélations de manière qualitative comme quantitative entre le *in vitro* et le *in vivo*.

Pour effectuer des comparaisons quantitatives, il est indispensable de caractériser au mieux la dose réellement déposée *in vivo* au niveau pulmonaire ou *in vitro* sur les cellules. *In vivo*, il est assez aisé de mesurer la dose totale déposée dans les poumons, par exemple par dosage direct en ICP-MS. En revanche, il est plus compliqué de mesurer le dépôt dans chaque région pulmonaire. Des méthodes ont néanmoins été développées comme le modèle mathématique MPPD. Ce modèle permet d'estimer le dépôt pulmonaire des NPs dans chaque région ou sous-régions pulmonaires en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et des caractéristiques du modèle animal utilisé [96]. *In vitro*, il est possible de mesurer la dose déposée, par exemple par dosage ICP-MS. Il est également possible d'estimer les doses déposées en submergé en utilisant des modèles mathématiques comme le modèle ISDD (Cf. § 5.2.2.1).

Habituellement, les doses déposées sont exprimées *in vivo* en masse par unité de masse ou en masse par animal ou par poumons et *in vitro* en masse par unité de volume (en submergé). Néanmoins, ces référentiels de dose ne sont pas compatibles *in vivo* et *in vitro*. En revanche, il est possible de comparer les effets entre les différents modèles et méthodes d'exposition existants en normalisant les doses en masse ou en nombre de particules par rapport à la surface tissulaire (Figure 21). Pour exprimer les doses en masse par unité de surface, les masses déposées sur les cellules *in vitro* peuvent être normalisées par rapport à la surface totale du tapis cellulaire. *In vivo*, en cas de dépôt dans les alvéoles, les masses déposées peuvent être normalisées par rapport à la surface totale alvéolaire. Cette normalisation semble

pertinente pour les NPs faiblement solubles car celles-ci sont principalement toxiques de par leur activité de surface. Il a également été montré que les doses pouvaient être normalisées par rapport au nombre de cellules *in vivo* ou *in vitro* [180]. Par ailleurs, les doses peuvent être exprimées en aire de surface après normalisation avec l'aire de surface massique totale des particules (la BET). En effet, il a été montré *in vivo* qu'exprimer les doses de cette manière permettait d'expliquer les différences de réponses pro-inflammatoires existantes entre des NPs faiblement solubles de tailles différentes [181, 182]. Actuellement, il n'existe pas de consensus stricte quant à la meilleure métrique de dose à utiliser. Néanmoins, il reste possible d'utiliser plusieurs métriques afin d'évaluer au mieux les effets observés.

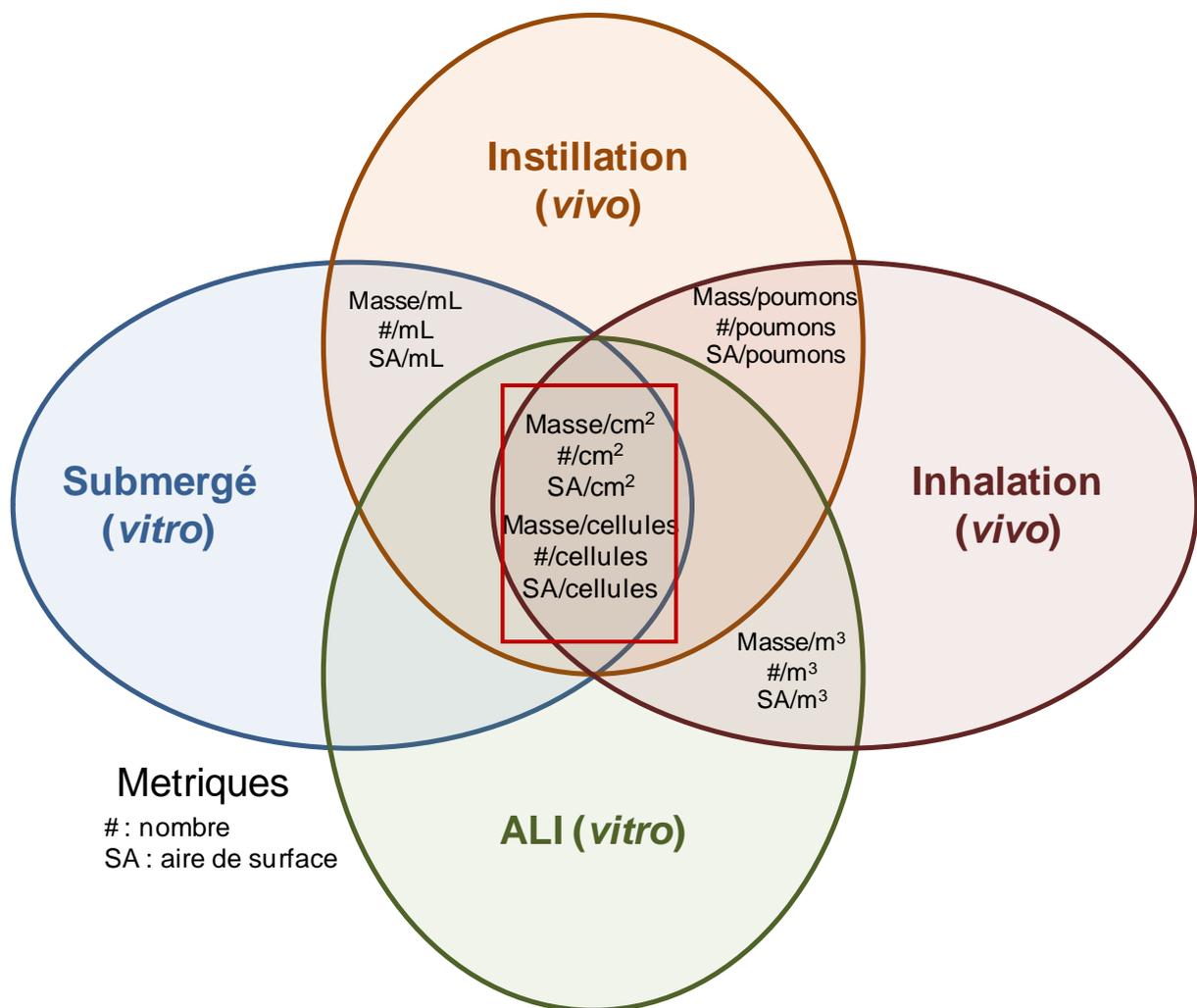


Figure 21 : Métriques de doses communes entre le *in vivo* et le *in vitro*.

6.3.2 Études de corrélations *vivo/vitro*

Il est possible de comparer les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* de manière qualitative, en évaluant si les mêmes types d'effets peuvent être observés et si les NPs peuvent être classées similairement *in vivo* et *in vitro*. Sayes et al. [183] ont comparé les effets cytotoxiques et la réponse inflammatoire après exposition *in vivo* de rats (instillation intratrachéale) et *in vitro* (en submergé) de cellules épithéliales et de macrophages avec des particules de silice et d'oxyde de zinc de tailles nano- et micrométriques. Les auteurs ont conclu qu'il n'existait pas de corrélation claire entre le *in vitro* et le *in vivo*. Néanmoins Rushton et al. [184] ont ré-analysé les résultats publiés par Sayes et al. et ont établi de bonnes corrélation entre les réponses *vivo* et *vitro*, en normalisant les réponses par rapport à l'aire de surface active des NPs. Ils ont en effet classé similairement les NPs testées *in vivo* comme *in vitro*, en fonction des réponses toxiques observées.

Utiliser des métriques de dose similaires semble toutefois indispensable pour comparer le *in vivo* et le *in vitro*. En effet, après sélection de référentiels de doses comparables, il est possible d'effectuer des corrélations quantitatives. Dans une étude plus récente [185], la toxicité pulmonaire de plusieurs NPs de TiO₂ et de CeO₂ a été évaluée *in vivo* sur des souris (par aspiration oropharyngée) et *in vitro* sur des coupes de poumons et sur des macrophages alvéolaires (en submergé). Des effets pro-inflammatoires à des doses nominales similaires autour de 2 µg/cm² ont été observés pour certaines NPs *in vivo* et *in vitro*, en utilisant comme référentiel de dose la masse par unité de surface, mais pas en exprimant la dose en masse par unité de volume. Ceci souligne l'importance de la dose métrique utilisée pour effectuer les comparaisons. Cependant, dans cette étude les doses indiquées sont des doses nominales (donc théoriques) et les masses réellement déposées dans les poumons *in vivo* et *in vitro* sur les cellules n'ont pas été évaluées, ce qui crée des incertitudes quant aux comparaisons effectuées.

Les comparaisons ont été faites de manière plus approfondie dans d'autres études. Notamment, Teeguarden et al. [180] ont exposé *in vivo* des souris et *in vitro* des cellules épithéliales et des macrophages à des NPs d'oxyde de fer. Dans leur étude, les doses *in vivo* et *in vitro* ont été exprimées en masse de NPs déposées par unité de surface et également en masse de NPs par nombre de cellules. Après 4h d'exposition, ils ont observé des effets pro-inflammatoires à des doses inférieures *in vivo* (0,009-0,13 µg/cm²) par rapport à *in vitro* (1-2 µg/cm²) sur les cellules épithéliales lorsque les doses étaient exprimées en µg/cm². Pour les macrophages, en exprimant les doses en masse de NPs par nombre de macrophages, les

auteurs ont en revanche observé une meilleure correspondance d'effet avec des réponses inflammatoires significatives à des doses similaires *in vivo* (1-100 pg/macrophages) et *in vitro* (8-35 pg/macrophages). Donaldson et al. [186] ont quant à eux observé dans leur étude une bonne corrélation entre inflammation *in vivo* chez le rat (augmentation du nombre de neutrophiles) et *in vitro* sur des cellules A549 (augmentation de l'expression en cytokine IL-8) en normalisant les doses déposées de NPs faiblement solubles (exprimées en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), par rapport à l'aire de surface spécifique des particules (BET en $\text{cm}^2/\mu\text{g}$). *In vivo* comme *in vitro*, ils ont observé des inductions de réponses inflammatoires à partir de $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$.

En résumé, il a été montré *in vitro* comme *in vivo* que le référentiel de dose utilisé était un paramètre essentiel pour comparer les résultats *in vivo* et *in vitro*. Généralement, il a été montré qu'il existait une meilleure corrélation lorsque les résultats étaient exprimés en dose de NPs par unité de surface ou par cellules. Des études ont également montré des réponses similaires *in vivo* et *in vitro* après normalisation des doses par rapport à l'aire de surface active des NPs. Néanmoins, dans les études présentées précédemment, les corrélations ont été établies en utilisant des référentiels de doses et des modèles *in vitro* différents. De ce fait, il semble difficile d'établir un consensus clair quant aux méthodes et aux référentiels de dose les plus adaptés pour évaluer la toxicité des NPs *in vitro*. Des investigations supplémentaires pourraient apporter des informations importantes afin de répondre à cette question. De plus, la méthode d'exposition *in vitro* utilisée dans ces études, le submergé, est très éloignée de la physiologie *in vivo*, ce qui laisse supposer que de meilleures corrélations pourraient être obtenues en utilisant des méthodes d'exposition plus physiologiques.

6.4 Toxicité aiguë des NPs au niveau pulmonaire après exposition de cellules à l'ALI à des aérosols

Les méthodes de culture et d'exposition dites à l'ALI représentent une alternative plus physiologique que des expositions *in vitro* en submergé, dans le but d'estimer les potentiels effets toxiques des NPs chez l'Homme (voir chapitre 5.2.2). Le principal avantage est le contact direct entre des NPs et les cellules avec une interface air, similairement à ce qui se passe *in vivo* au niveau des alvéoles. Ces méthodes d'exposition sont encore peu utilisées, mais elles pourraient permettre de diminuer le fossé existant entre le *in vitro* et le *in vivo*.

6.4.1 Évaluation des effets toxiques des NPs faiblement solubles à l'ALI

La toxicité aigüe des NPs peu solubles a été évaluée après exposition de cellules pulmonaires à l'ALI à des aérosols. Notamment, dans deux études liées entre elles [187, 188], des effets cytotoxiques ont été montrés après exposition de cellules A549 à des aérosols de TiO₂ et de CeO₂ en utilisant le système "Radial flow" de CULTEX[®]. Les auteurs ont observé une forte diminution de la viabilité cellulaire à 24h de 50, 60, 70 %, pour des doses déposées sur les cellules de 25, 50 et 100 µg/cm² respectivement. Ils ont également observé une diminution de la viabilité cellulaire à 24h de 20, 40, 60 %, pour des doses de CeO₂ déposées sur les cellules respectivement similaires. En utilisant un système muni d'électrodes permettant d'augmenter la dose déposée sur les cellules, Panas et al. [189] ont observé des effets cytotoxiques et pro-inflammatoires après exposition de cellules A549 à des aérosols de NPs de SiO₂, à des doses supérieures à 50 µg/cm².

En résumé, des effets toxiques ont été observés après exposition de monocultures de cellules pulmonaires à des aérosols de NPs faiblement solubles. Les effets indésirables ont été observés à des doses importantes comprises entre 25 et 100 µg/cm². Néanmoins, la potentielle toxicité des NPs faiblement solubles a été évaluée dans très peu d'études et les effets n'ont pas été évalués sur des modèles pulmonaires plus complexes comme des co-cultures. Des études supplémentaires impliquant des NPs faiblement solubles pourraient permettre d'en savoir plus sur la toxicité de ces NPs après exposition à l'ALI.

6.4.2 Comparaisons des effets toxiques des NPs à l'ALI et en submergé

Si l'on considère également les NPs solubles, les effets toxiques ont été évalués après exposition de cellules pulmonaires à l'ALI dans un nombre plus important d'études. Dans certaines études, les résultats de toxicité ont été mis en perspective avec ceux obtenus après l'exposition à des suspensions de NPs, avec comme objectif d'évaluer si la méthode ALI générerait des résultats similaires ou différents par rapport à des expositions classiques en submergé.

6.4.2.1 Importance de la dose métrique pour les comparaisons entre les deux méthodologies

Pour comparer les effets indésirables à l'ALI par rapport au submergé, il est nécessaire d'utiliser des métriques de dose similaires. Exprimer les doses en masse par unité de surface permet de comparer aisément les deux méthodes. En effet, les NPs n'étant pas en suspension

après exposition à l'ALI, il n'est pas possible d'exprimer les doses en masse par unité de volume comme il est possible de le faire en submergé. De plus, exprimer les doses en masse par unité de surface permet de prendre en compte le fait que les NPs faiblement solubles interagissent avec les cellules majoritairement après dépôt sur celles-ci. Exprimer les doses en nombre de NPs déposées par unité de surface permet donc de comparer les deux méthodes d'exposition. Cependant cette métrique est plus rarement utilisée du fait de la difficulté de mesurer de manière précise le nombre de particules déposées sur les cellules, car les NPs se présentent généralement plus sous forme d'agglomérats ou d'agrégats de différentes tailles que sous forme de particules isolées.

6.4.2.2 Études de comparaison entre ALI et submergé

Des comparaisons entre les deux méthodologies ont été effectuées dans très peu d'études. Après exposition de cellules A549 à des NPs de silice peu solubles, Panas et al. [189] ont mesuré des effets indésirables à des doses de 50 ou 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ à l'ALI et de 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en submergé, concluant ainsi que les NPs de SiO_2 étaient moins toxiques à l'ALI qu'en submergé.

Des comparaisons directes entre l'ALI et le submergé ont également été effectuées après exposition de cellules pulmonaires à des NPs solubles. Vingt quatre heures après exposition de co-cultures de pneumocytes et de cellules immunitaires à des NPs d'Ag coatés, Herzog et al. [190] ont observé des effets significatifs en submergé à des doses déposées allant de 1,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (pour des effets pro-inflammatoires) à 5,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (pour des effets cytotoxiques) alors qu'aucun effet significatif n'a été observé à l'ALI, même à la dose maximum de 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Néanmoins, dans plusieurs autres études les auteurs ont fait des conclusions différentes quant à la comparaison des effets après exposition à l'ALI par rapport au submergé. Lenz et al. [191] ont notamment observé une augmentation de l'expression génique en marqueurs pro-inflammatoires à des doses plus faibles à l'ALI par rapport à en submergé (0,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ contre 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) après exposition de cellules A549 à des NPs de ZnO. Néanmoins, dans cette étude les effets ont été mesurés tout de suite après ou 2h après exposition, mais les auteurs n'ont pas évalué les effets après 24h d'exposition. En utilisant des NPs de ZnO, Xie et al. [124] ont mesuré des effets cytotoxiques et oxydatifs à 6h et à 24h sur des cellules alvéolaires épithéliales de souris (C10) à des doses similaires à l'ALI par rapport à en submergé (à environ 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Ainsi des conclusions différentes sont proposées par les auteurs dans ces différentes études. Les NPs utilisées ne sont pas les mêmes, ce qui peut expliquer les différences de résultats. Par

exemple, les NPs solubles peuvent libérer des ions en suspension [142] et une augmentation de la teneur en ions au cours du temps dans la suspension pourrait expliquer que dans certains cas les effets sont observés à des doses supérieures à l'ALI par rapport à en submergé.

De plus, les méthodes utilisées pour exposer les cellules aux aérosols ou aux suspensions, les modèles cellulaires utilisés et les méthodologies utilisées pour caractériser le dépôt sur les cellules ne sont pas identiques, ce qui peut également expliquer les divergences de résultats. Xie et al. [124] ont notamment utilisé la même méthode pour préparer les suspensions de NPs utilisées pour générer des aérosols par nébulisation ou pour exposer les cellules en submergé. Similairement à en condition submergée, ils ont ajouté du sérum de veau fœtal dans la suspension utilisée pour générer les aérosols, ce qui peut induire la formation d'une corona spécifique également à l'ALI et expliquer l'absence de différence d'effet toxique entre l'ALI et le submergé dans leur étude. Panas et al. [189] ont ajouté 100 µL de PBS en partie apicale des cellules pendant l'exposition à l'ALI, ce qui pourrait entraîner une diminution du contact direct entre les NPs et les cellules et une diminution de la toxicité à l'ALI. Par ailleurs, dans la plupart des études comparant l'ALI et le submergé, les temps utilisés pour délivrer les doses de NPs sont différents ce qui peut créer des incertitudes quant aux résultats de comparaisons. En conclusion, il n'est pas possible d'établir une tendance générale lorsque l'on compare les effets toxiques à l'ALI par rapport au submergé. Trop peu d'études ont été réalisées sur le sujet, les matériels et méthodes utilisés dans les différentes études ne sont pas similaires et il existe des incertitudes quant aux données de comparaisons générées. Des études supplémentaires semblent donc nécessaires afin d'évaluer si exposer des cellules à l'ALI pourrait générer des réponses toxicologiques plus proches du *in vivo*.

7. Conclusions et objectifs du travail

Les méthodes *in vitro* représentent une alternative aux expérimentations *in vivo* pour évaluer les effets toxiques des NMs après exposition par voie respiratoire. Néanmoins, les différences existantes entre les deux méthodologies sont importantes, c'est pourquoi l'expérimentation animale reste aujourd'hui la méthode de référence pour évaluer la potentielle toxicité d'un NM.

De nouvelles méthodes *in vitro* plus physiologiques ont été développées et leur utilisation pourrait contribuer à diminuer l'écart existant par rapport au *in vivo*. Cependant, très peu de travaux ont été réalisés à ce sujet et des études semblent nécessaires pour répondre à cette problématique.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer la capacité de plusieurs modèles *in vitro*, de complexité différente, à prédire les effets toxiques observés *in vivo* chez le rat après exposition aiguë pulmonaire à des NPs métalliques faiblement solubles de TiO₂ et de CeO₂.

Pour cela, des expérimentations *in vitro* ont tout d'abord été effectuées afin d'évaluer si exposer des cellules en monocultures ou en co-cultures à l'interface l'ALI à des aérosols de NPs générerait des résultats différents comparé à des expositions classiques en submergé à des suspensions. Des expérimentations *in vivo* ont ensuite été réalisées afin de comparer les réponses toxiques *in vitro* avec celles obtenues *in vivo*.

MATERIELS ET METHODES

Dans un premier temps, des expérimentations *in vitro* ont été réalisées. Des cellules épithéliales alvéolaires en monocultures ou en co-cultures avec des macrophages ont été exposées à l'ALI à des aérosols ou en submergé à des suspensions de NPs de TiO₂ et de CeO₂. Après 24h d'exposition, la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif ont été évalués. Les réponses biologiques à l'ALI et en submergé ont ensuite été comparées afin d'évaluer si il existait des différences d'effets entre les deux méthodes testées. Dans un deuxième temps, des expérimentations *in vivo* ont été effectuées en utilisant les mêmes NPs qu'*in vitro*, afin comparer les réponses de toxicité *in vitro* avec celles obtenus *in vivo* après 24h d'exposition. Pour s'assurer de la fiabilité des comparaisons effectuées dans ce travail, les suspensions et les aérosols utilisés dans les expérimentations ont été caractérisés et les doses de NPs au contact des tissus biologiques ont été évaluées. Le tableau 13 récapitule les matériels et méthodes utilisés pour réaliser les expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

Tableau 13 : Récapitulatif des matériels et méthodes utilisés *in vitro* et *in vivo*.

| | |
|---|---|
| Nanoparticules | TiO ₂ NM105, NM101 et NM100, CeO ₂ NM212 |
| Expérimentations <i>in vitro</i> | |
| Modèles cellulaires | A549 ; A549 + THP-1 |
| Méthodes d'exposition | ALI ; submergé |
| Doses déposées testées | 0 ; 0,1 ; 1 ; 3 µg/cm ² (ALI) 0 ; 1 ; 3 ; 10 µg/cm ² (submergé sur insert) 0 ; 1 ; 3 ; 10 ; 20 µg/cm ² (submergé sur plaque) |
| Durée d'exposition | 24h ALI : dose déposée en 3h + 21h à l'incubateur Submergé sur insert: dose déposée en 3h + 21h à l'incubateur Submergé sur plaque: dose déposée en 24h |
| Caractérisation des aérosols et des suspensions | Aérosols : SMPS + COP Suspensions : Dynamic Light Scattering (DLS) |
| Dosimétrie | ALI : ICP-MS Submergé : Modélisation ISDD |
| Marqueurs biologiques évalués | Cytotoxicité, inflammation, stress oxydatif |

| Expérimentations <i>in vivo</i> | |
|--|--|
| Animaux | Rats WISTAR mâles |
| Méthode d'exposition | Aspiration intratrachéale unique après hyperventilation |
| Doses nominales | 500, 50, 5 µg/animal |
| Durée d'exposition | 24h |
| Marqueurs biologiques évalués | Sur les lavages broncho alvéolaires: Cytotoxicité, Inflammation, Stress oxydatif |
| Caractérisation des suspensions | Dynamic Light Scattering (DLS) |
| Dosimétrie | ICP-MS |

1. Nanoparticules utilisées

1.1 Caractéristiques physico-chimiques des NPs

Les NPs utilisées dans l'étude (TiO₂ : NM105, NM101, NM100 ; CeO₂ : NM212) sont toutes des oxydes métalliques non solubles. Elles possèdent des caractéristiques physico-chimiques différentes et sont identifiées par leur numéro OCDE. Ce sont des matériaux bien caractérisés d'un point de vue physico-chimique, notamment par le Joint research council (JRC) ([45, 192]).

Les trois TiO₂ (NM105, NM101, NM100) ont été choisis car ils diffèrent les uns des autres de par leur taille, leur forme cristalline, et leur revêtement de surface [45]. Le TiO₂ NM105 (AEROXIDE® TiO₂ P25) a été fourni par Evonik industries. Il est composé à 80% d'anatase et à 20% de rutile, son diamètre primaire est de 21 nm, et il ne possède pas de revêtement de surface spécifique. Le TiO₂ NM101 et le NM100 ont été fournis par le JRC. Le NM101 est composé à 100% d'anatase, son diamètre primaire est de 8 nm et il possède un revêtement de surface hydrophobe [45]. Le NM100 est composé à 100% d'anatase, son diamètre primaire est de 100 nm environ et il ne possède pas de revêtement de surface. L'oxyde de cerium (NM212) a également été obtenu auprès du JRC. Il a une taille primaire de 28,4±10,4 nm et il ne possède pas de revêtement de surface [192].

Les caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux utilisés ainsi que des images provenant d'observations effectuées au microscope électronique à transmission (MET) sont présentées dans le tableau 14 et la figure 22, respectivement.

Tableau 14 : Caractéristiques physico-chimiques des NPs utilisées.

| | composition | Forme cristalline | taille | Revêtement de surface | Surface spécifique (BET en cm ² /g) | Densité primaire |
|-------|------------------|----------------------------|--------|--|--|------------------|
| NM105 | TiO ₂ | 80% anatase/ 20% rutile | 21 nm | non | 46.1 | 4,2 |
| NM101 | TiO ₂ | anatase | 6 nm | Hydrophobe (acide palmitique et stéarique, silane) | 316 | 3,9 |
| NM100 | TiO ₂ | anatase | 100 nm | non | 10 | 3,9 |
| NM212 | CeO ₂ | cubic cerionite | 28 nm | non | 27 | 7,2 |

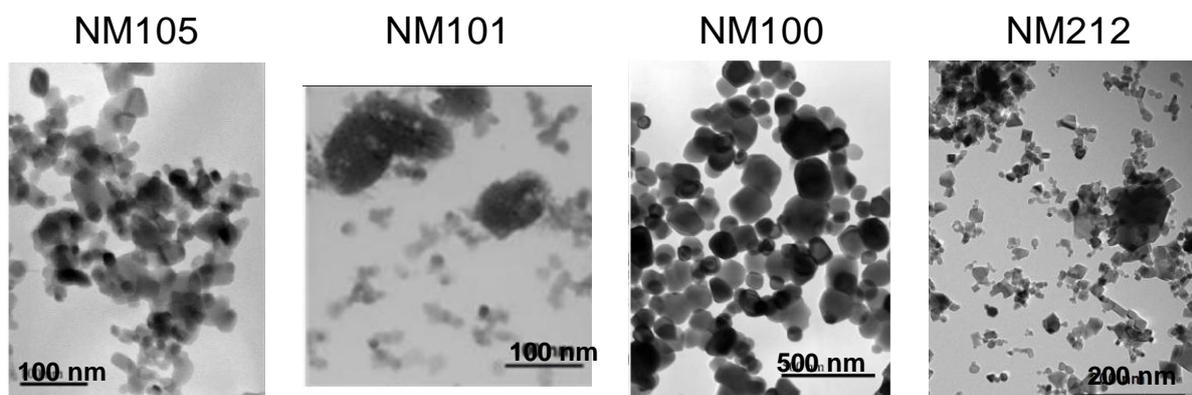


Figure 22 : Observation des NPs au microscope électronique à transmission (MET). Images du JRC [45, 192].

1.2 Préparation et caractérisation des suspensions mères pour les expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

Afin d'obtenir des suspensions homogènes, les NPs ont préalablement été suspendues dans de l'eau Milli-Q. La pauvreté en ions de l'eau Milli-Q favorise la dispersion. La dispersion a été effectuée grâce à des ultrasons. Différents appareils générant des ultrasons, communément appelé sonicateurs, ont été choisis en fonction des caractéristiques physico-chimiques des NPs et de la méthode d'exposition utilisée.

Les NPs de TiO₂ et de CeO₂ se dispersant aisément dans l'eau milli-Q, la dispersion a été réalisée à l'aide de dispositifs de sonication indirectes à énergie faible, ce qui permet d'éviter toute contamination chimique par des particules qui pourrait être émise par un dispositif muni

d'une sonde. Les suspensions de TiO₂ et CeO₂ dédiées aux expositions à des aérosols ont été dispersées à l'aide d'un bain à ultrason (Bioblock, Leo-80). Un dispositif muni d'un cup-horn (QSONICA, Q700) (Figure 23) a été utilisé afin de disperser les suspensions préparées pour les expositions avec des suspensions.

Les suspensions mères de NPs préparées dans l'eau Milli-Q à la concentration de 2,56 mg/mL ont été caractérisées par « dynamic light scattering » (DLS) (Malvern, Zetasizer Nano S). La méthode consiste à envoyer un laser à différentes intensités. L'intensité du signal renvoyé par l'échantillon va être dépendante du mouvement brownien des particules ou des molécules en suspension. L'analyse des fluctuations d'intensité permet d'obtenir la vitesse du mouvement brownien et ainsi de déduire la taille des particules par la relation de Stokes-Einstein.

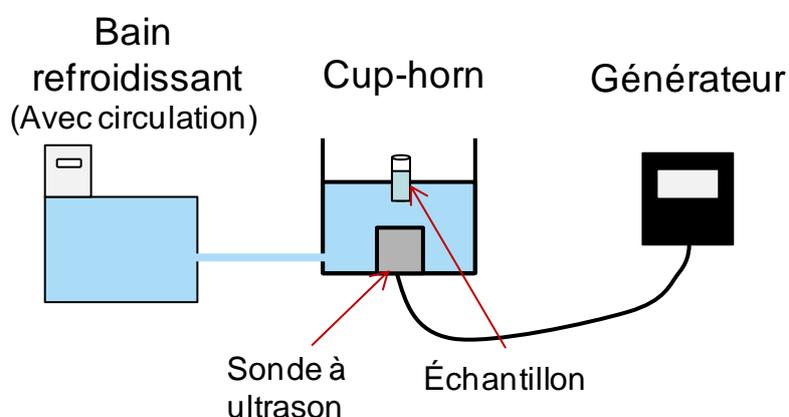


Figure 23 : Représentation graphique du dispositif de sonication « cup horn » utilisé pour disperser les suspensions de NPs.

2. Expérimentations *in vitro*

Afin de déterminer si se rapprocher des conditions réelles d'exposition permettait de mimer au mieux les effets toxiques observés *in vivo* après exposition aiguë, nous avons tout d'abord évalué s'il existait des différences d'effets en fonction des méthodes *in vitro* utilisées. Pour cela nous avons eu recours à différents modèles cellulaires, des mono-cultures et des co-cultures, et nous avons utilisé différentes méthodes d'exposition. Les cellules ont été exposées à l'ALI à des aérosols de NPs et en submergé à des suspensions de NPs. Nous avons également testé l'influence du débit de dose en submergé sur les effets toxiques observés (Figure 24).

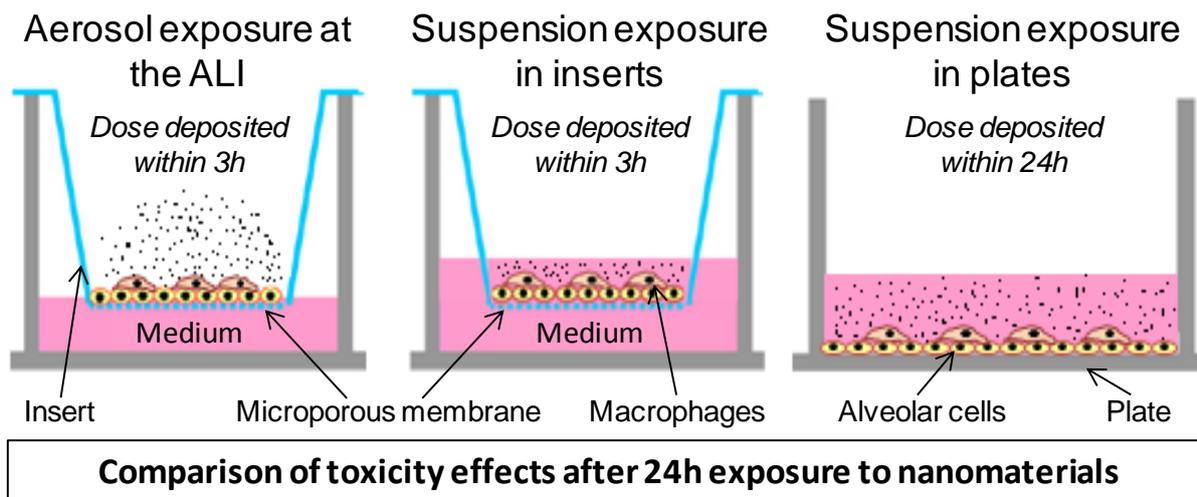


Figure 24 : Méthodologies utilisées *in vitro* pour exposer des cellules pulmonaires à des NPs de TiO₂ et de CeO₂.

2.1 Modèles cellulaires utilisés

La lignée cellulaire humaine A549 présente un phénotype de cellules épithéliales alvéolaires de type II. Cette lignée a la capacité d'adhérer à un support de culture. La lignée cellulaire humaine THP-1 est composée de monocytes, qui ont la capacité de se différencier en macrophages fonctionnels après stimulation chimique. Sous forme monocyttaire, les cellules THP-1 restent en suspension dans le milieu de culture et n'adhèrent pas au support de culture utilisé. En revanche, une fois différenciées en macrophages, les THP-1 deviennent adhérentes. Les deux lignées cellulaires ont été obtenues, par l'intermédiaire du projet européen NANoREG, respectivement auprès du BAuA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Allemagne) et du GAIKER (Espagne). Les deux lignées cellulaires ont été cultivées dans du « Roswell Park Memorial Institute medium » 1640 (RPMI) (Gibco, 61870) supplémenté avec 10% de Serum de veau fœtal (SVF) (Gibco, 15070) et 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco, 15070) en atmosphère humide dans un incubateur réglé à 37°C et avec 5% de CO₂ (Sanyo-18AIC).

Pour les expérimentations, les cellules A549 et THP-1 ont été préalablementensemencées dans des flasques de 75 cm² de surface (Falcon, 353136), avec 7,10⁵ et 3,10⁶ cellules/flaque respectivement. A 90% de confluence, les cellules A549 ont été désolidarisées de leur support de culture avec de la trypsine à 0,05% (Gibco, 25300), puis ont étéensemencées avec 0,5 mL d'une suspension à 1,10⁵ cellules/mL dans des plaques 24 puits, ou avec 1 mL d'une suspension à 8,10⁴ cellules/mL sur des inserts 6 puits (4,67 cm² de diamètre, 0,4 µm de taille

de pore) (Costar, 3450). Pour préparer les co-cultures, les cellules THP-1 ont été différenciées en macrophages dans les flasques de culture, par ajout de 300 ng/mL de Phorbol Myristate Acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, P1585) pendant 24h.

2.2 Exposition de cellules à l'interface air-liquide aux aérosols de NPs

2.2.1 Protocole de culture pour les expositions à l'ALI

Pour exposer les mono-cultures à l'ALI, les cellules A549 ont été cultivées sur des inserts pendant 96h jusqu'à confluence. Ensuite, le milieu en partie apicale des cellules a été enlevé (20h avant exposition), afin d'adapter les cellules à l'ALI pendant environ un jour. Pour exposer les co-cultures, des cellules THP-1 ont été différenciées en macrophages par ajout de PMA pendant 24h. Le jour d'avant l'exposition, les THP-1 différenciées ont été trypsinées (Gibco, 25200), puisensemencées sur les cellules A549 à un ratio de une THP-1 pour dix A549. Pour calculer le nombre de cellules THP-1 nécessaires pour atteindre le ratio de 1/10e, le nombre de cellules A549 présentes sur les inserts au moment de l'exposition a été évalué par comptage après trypsination. Quatre heures après ensemencement des THP-1 sur les cellules A549 (soit environ 20h avant l'exposition), le milieu de culture en partie apicale des cellules a été retiré, pour adapter la co-culture à l'interface air-liquide. Ainsi, 5j après ensemencement des cellules A549, les mono- et les co-cultures ont été exposées pendant 3h à l'ALI, soit à de l'air, soit à des aérosols de NPs. Après exposition, les cellules ont été placées dans des nouvelles plaques compagnons (Costar, 3516) avec du milieu de culture frais en partie basale, puis ont été gardées à l'ALI à l'incubateur pendant 21h. Le protocole de culture mis en place pour exposer les mono et les co-cultures à l'ALI à des aérosols de NPs est présenté sur la figure 25.

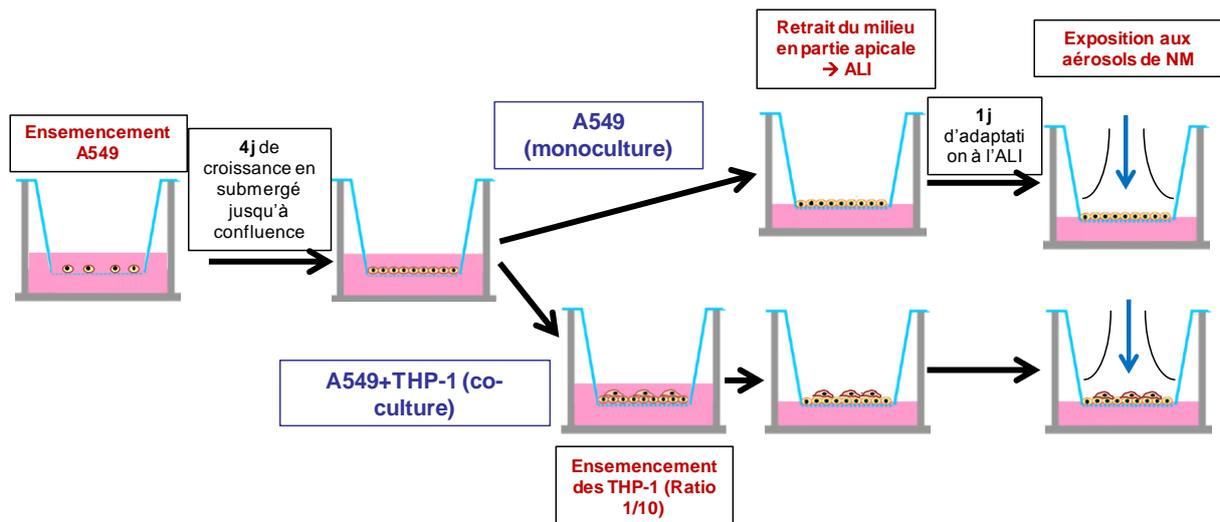


Figure 25 : Protocole de culture pour exposer les cellules à l'ALI à des aérosols de NPs.

2.2.2 Système d'exposition

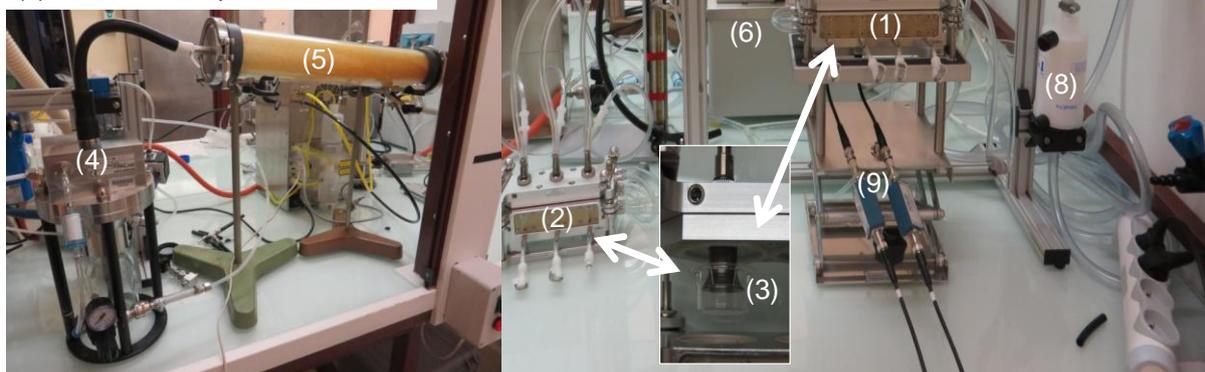
Un système d'exposition a été mis en place en utilisant des modules de la compagnie Vitrocell® (Figure 26). Le système est composé de deux modules, (Vibrocell, 6/4 and 6/3 CF Stainless cultivation base module) dont l'usage permet d'exposer à l'ALI des cellules cultivées sur des inserts. Dans l'un des deux modules, les cellules ont été exposées aux aérosols de NPs. Dans l'autre, le module témoin, les cellules ont été exposées à de l'air filtré. Le module d'exposition aux aérosols de NPs contient 4 puits. Dans trois puits les cellules sont exposées à l'ALI à des aérosols de NPs. Le puits restant est équipé d'une microbalance de quartz (QCM) (Vibrocell®), ce qui permet d'évaluer la dépôt en temps réel des NPs sur la surface des cellules. Le module d'exposition témoin contient 3 puits dans lesquels les cellules sont exposées à l'ALI à de l'air filtré. Dans les modules, du milieu de culture supplémenté avec 25 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (Gibco, 156030-056) est ajouté dans les puits en partie basale de chaque insert, ce qui permet de maintenir les cellules dans des conditions nutritives normales pendant l'exposition. Un circuit annexe de circulation d'eau connecté à un bain marie est présent dans chaque module pour maintenir les cellules à 37 °C lors de l'exposition.

Afin d'exposer des cellules à des aérosols de NPs, des suspensions de 200 mL à 1, 5 et 10 g/L ont été préparées dans de l'eau Milli-Q, puis dispersées durant 10 min au bain à ultrason. Tout de suite après sonication, les suspensions ont été aérosolisées à un débit de 5 L/min à l'aide d'un nébuliseur (Palas AGK 2000) approvisionné avec de l'air filtré (Figure 26). L'aérosol ainsi généré contient 100% d'humidité, c'est pourquoi un sécheur composé de silica gel

(Roth, P077) est utilisé afin de réduire l'humidité à 90% et ainsi empêcher la condensation d'eau dans le système. L'aérosol passe ensuite à travers un système de distribution composé d'un tube en inox de 7 cm de diamètre dans lequel sont positionnés quatre tubes biseautés qui servent à orienter les NMs présent dans les aérosols vers les modules. Une pompe à vide (KnF, N840FT-18) est par ailleurs utilisée afin d'aspirer l'aérosol vers les modules, à un débit réglé à 5 mL/min/puits grâce à des contrôleurs de flux, ce qui garantit l'absence de perte de viabilité cellulaire qui pourrait être causée par un débit trop important. Le surplus d'aérosols est prélevé pour analyse au niveau d'un flow splitter (Figure 26) placé après le tube de distribution en inox, et/ou éliminé après filtration.

Afin d'exposer les cellules témoins à de l'air filtré, un bulleur est utilisé afin de chargé l'air à 90% d'humidité. L'air est libéré à un débit de 5 L/min, puis est aspiré dans les modules à un débit de 5 mL/min/puits grâce à la pompe à vide et des contrôleurs de flux.

- (1) Module d'exposition NPs
- (2) Module d'exposition Air (témoins)
- (3) Trompette et inserts
- (4) Nébuliseur
- (5) Sécheur
- (6) Bain marie
- (7) Contrôleurs de flux
- (8) Filtre pour les particules
- (9) Microbalance quartz



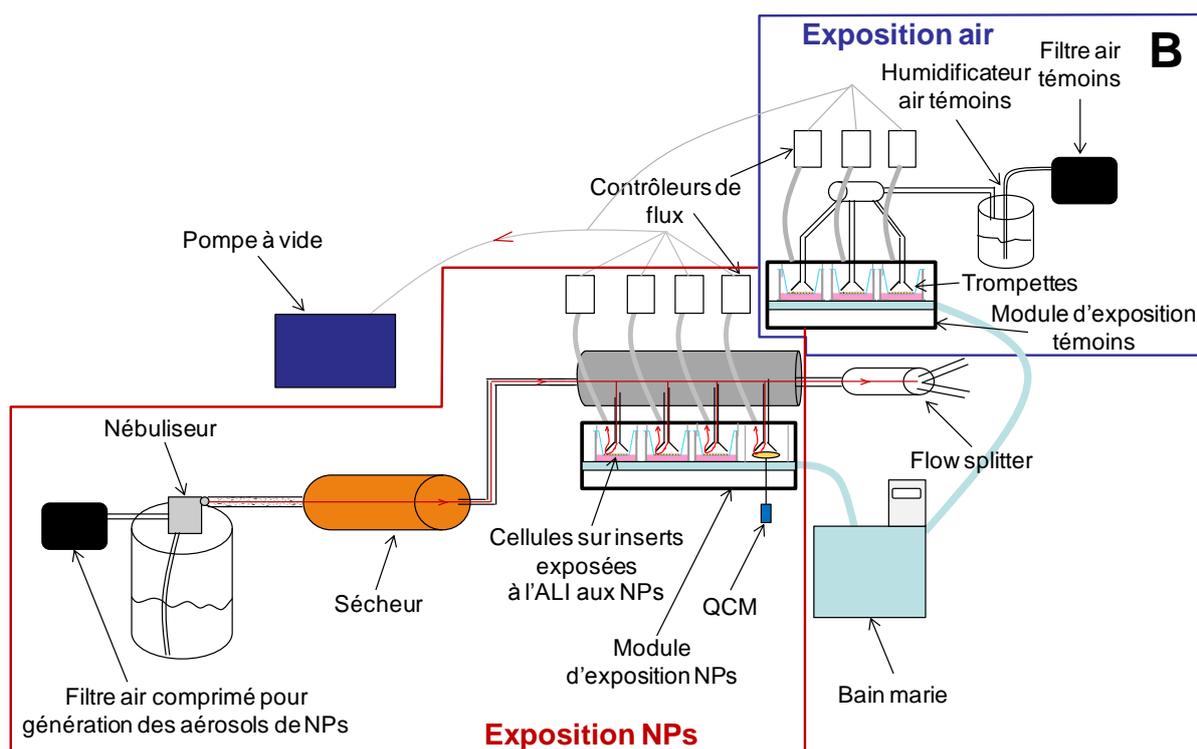


Figure 26 : Photo (A) et schéma détaillé (B) du système d'exposition de cellules à l'ALI aux aérosols de NPs ou à l'air.

2.2.3 Caractérisation des aérosols générés

2.2.3.1 Mesure de la concentration massique par gravimétrie

La concentration massique des aérosols a été évaluée par gravimétrie (Figure 27). Cela a consisté à prélever une partie de l'aérosol durant 10 min/échantillonnage sur un filtre de 37 mm de diamètre (Whatman, 1851-037), placé sur un grille dans un porte filtre, à l'aide d'une pompe (Casella, Apex personal air sampler) réglée à 4 L/min. Des prélèvements par gravimétrie ont été effectués pour chaque NP et pour chaque concentration générée dans l'aérosol (à partir de suspensions de 1, 5 et 10 g/L). La masse du filtre a été mesurée à l'aide d'une balance, après séchage des filtres pendant 24h dans un dessiccateur contenant du silica gel, et la masse de NP déposée a été obtenue en retranchant à la valeur mesurée celle du filtre à blanc (masse du filtre séché après dépôt – masse du filtre séché avant dépôt). La concentration massique a ensuite été calculée en faisant le rapport de la masse déposée sur le volume d'air prélevé.

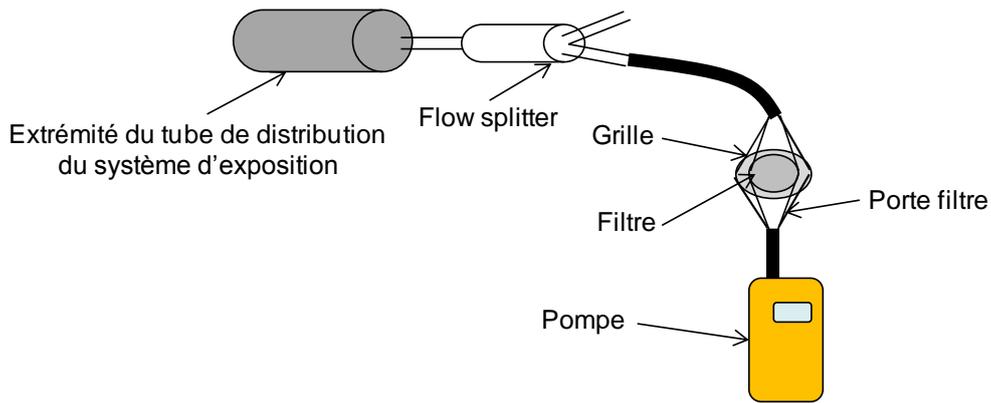


Figure 27 : Montage utilisé pour les prélèvements gravimétriques des aérosols.

2.2.3.2 Évaluation de la distribution en nombre ou en volume et en taille

La distribution en nombre ou en volume en fonction de la taille des particules a été mesurée dans tous les aérosols générés. Pour cela, un « scanning mobility particle size spectrometer » (SMPS) (Figure 28) composé d'un « Condensation Particle Counter » (CPC) (Grimm, 5.416), d'un « Differential Mobility Analyser » (DMA) (Grimm, L-DMA 5400) et équipé d'un neutraliseur à rayons-X (TSI, 3087) a été utilisé afin de mesurer les particules de tailles nanométriques (entre 10 et 1100 nm). Un compteur optique (COP) (Grimm, 1.109) a été utilisé afin de mesurer les particules de tailles micrométriques (entre 1,1 et 30 μm).

Principe du SMPS : les particules sont tout d'abord neutralisées à l'aide de Rayons-X pour imposer une loi de charge à l'aérosol. Elles passent ensuite à travers le DMA, ce qui permet de classer les particules en fonction de leur mobilité électrique. Pour une NP sphérique, ou un agglomérat considéré comme sphérique, la mobilité électrique est fonction de la taille et il est possible de déterminer la taille des particules ou des agglomérats. Les particules passent ensuite à travers un CPC, ce qui permet de déterminer pour chaque classe de taille le nombre ou le volume de particules correspondants.

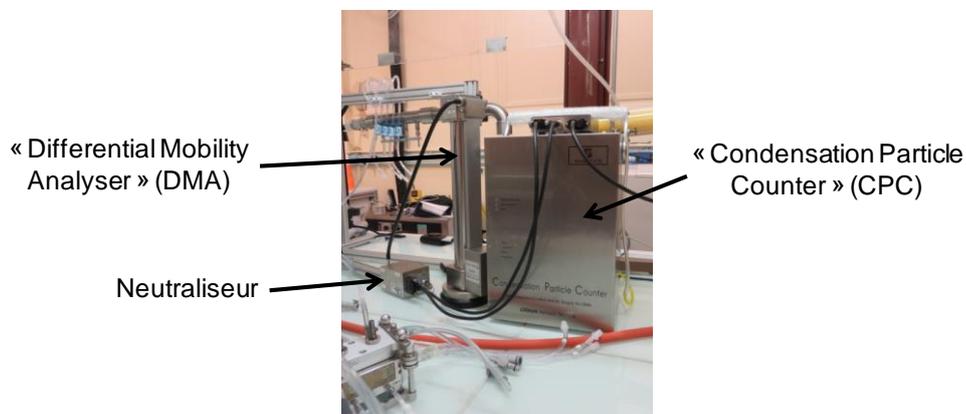


Figure 28 : Photo du SMPS.

2.2.3.3 Calcul de la densité effective des aérosols

Les données de distribution en volume et en taille des aérosols ont été utilisées pour calculer la concentration volumique totale de chaque aérosol. Celle-ci est équivalente à la concentration massique totale lorsque la densité de l'aérosol est égale à 1 g/cm^3 . La densité effective de l'aérosol a été calculée en divisant la concentration massique totale mesurée par gravimétrie par la concentration massique totale calculée pour une densité de 1 g/cm^3 .

2.2.4 Caractérisation du dépôt des NPs sur les cellules après exposition à l'ALI à des aérosols

2.2.4.1 Mesure de la masse déposée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)

Après exposition pendant 3h aux aérosols de NPs, le dépôt en NPs sur les cellules a été caractérisé en effectuant des mesures par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Brièvement, des inserts contenant des cellules A549 à confluence ont été exposés à l'ALI à des aérosols de TiO_2 (NM105, 101, 100) et de CeO_2 (NM212) pendant 3h. Après exposition, les inserts ont été découpés avec un scalpel, ont été placés dans des pots de prélèvement (Dutsher, 030402), puis ont été stockés à -20°C avant analyse. Pour l'analyse, les inserts sont minéralisés par ajout d'une solution acide (1,5 ml de HNO_3 65% + 0,2 mL de HF 38%). Les tubes sont ensuite agités sous ultrasons pendant 10 min, puis 2 mL de H_3BO_3 à 55 g/L sont ajoutés afin de neutraliser les acides. Les tubes sont agités sous ultrasons une seconde fois pendant 10 min, puis les liquides de minéralisation contenant les espèces métalliques à doser sont récupérés dans des tubes de 50 mL. Les tubes sont ensuite rincés plusieurs fois avec de l'eau Milli-Q pour atteindre un volume final de 20 mL. Le minéralisat a ensuite été analysé par ICP-MS (AGILENT 7500) pour évaluer la quantité en métal de chaque échantillon.

2.2.4.2 Mesure de la masse déposée en temps réel à l'aide d'une microbalance de Quartz

Le dépôt des NPs sur les cellules a également été évaluée en temps réel à l'aide d'une microbalance en cristal de quartz (QCM) (Vitrocell). Un signal électrique est généré et enregistré lorsque les NPs se déposent sur la surface de la QCM, ce qui permet d'évaluer la masse déposée.

2.2.4.3 Calcul de l'efficacité de dépôt dans le système

La dépôt maximal théorique à été calculé pour chaque concentration d'aérosol générée. Pour cela, la masse maximale de NPs pouvant se déposer sur les cellules après 3h d'exposition a été calculée, en multipliant la concentration massique de l'aérosol déterminée par gravimétrie par le volume total de NPs passant au niveau de chaque insert (pour 3h d'exposition à un flux de 5 mL/min, le volume est de 900 mL). La masse mesurée par ICP-MS ou déposée sur les QCM a ensuite été divisée par la masse théorique maximum calculée, ce qui a permis de déterminer l'efficacité de dépôt dans le système

2.2.4.4 Évaluation de l'aspect des NPs déposées par analyse en Microscopie électronique à transmission (MET)

Afin d'évaluer l'aspect, la taille, et la distribution des NPs après dépôt, des grilles de cuivre pour MET (Quantifoil, S143-3) ont été placées sur des inserts, puis exposées pendant 3h à des aérosols générés à partir de suspensions de NPs de 10 g/L. Les grilles ont ensuite été analysées au microscope électronique à transmission (MET).

2.3 Exposition aux suspensions de NPs

2.3.1 Préparation des suspensions pour les expositions submergées

Afin d'exposer les cellules en conditions submergées, des suspensions mères de NPs à la concentration de 2,56 mg/mL ont été préparées dans de l'eau Milli-Q. Les suspensions ont été dispersées par sonication aux ultrasons (Cf. § 1.2). Les suspensions dispersées ont ensuite été diluées dans du milieu de culture contenant 10% de SVF pour atteindre les concentrations désirées (4 à 547 µg/mL).

2.3.2 Caractérisation des suspensions

Pour chaque NP, des mesures par DLS (Malvern, Zetasizer Nano S) ont été effectuées sur les suspensions mères et sur les suspensions diluées dans du milieu de culture à 400 µg/mL, afin d'évaluer la distribution en taille dans la suspension et de déterminer le diamètre hydrodynamique (Z-average) des NPs. La densité effective de chaque NP a été mesurée après centrifugation, d'après la méthode développée par Deloid et al. [112].

2.3.3 Caractérisation de la dose déposée à l'aide du modèle ISDD

Le modèle « *in vitro* sedimentation diffusion and dosimetry » (ISDD) [33] a été utilisé pour estimer, en fonction des caractéristiques physico-chimiques des NPs et des caractéristiques du milieu de culture, la fraction déposée sur les cellules après 3h et 24h de dépôt. Les paramètres qui ont été utilisés pour estimer la fraction déposée sur les cellules sont présentés dans le tableau 15. Pour l'interprétation des résultats, les concentrations théoriques en NPs, exprimées en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, ont été ajustées en fonction des fractions déposées estimées.

Tableau 15 : Paramètres utilisés pour estimer la fraction déposée sur les cellules / unité de temps avec le modèle mathématique ISDD.

| Paramètres de la NP | Paramètres du milieu |
|--|--|
| Taille et densité primaire de la poudre | Hauteur du milieu (0,214 cm sur inserts, 0,25 cm sur plaques 24 puits) |
| Diamètre hydrodynamique en suspension | Densité du milieu (1g/mL) |
| Densité effective en suspension | Viscosité du milieu (0,00074 Pa.s) |
| Concentration nominale en NPs dans la suspension | |

2.4 Évaluation de l'activité biologique

Pour évaluer l'activité biologique, tous les tests ont été réalisés sur un même échantillon cellulaire (insert ou puits), comme décrits ci-après (Figure 29).

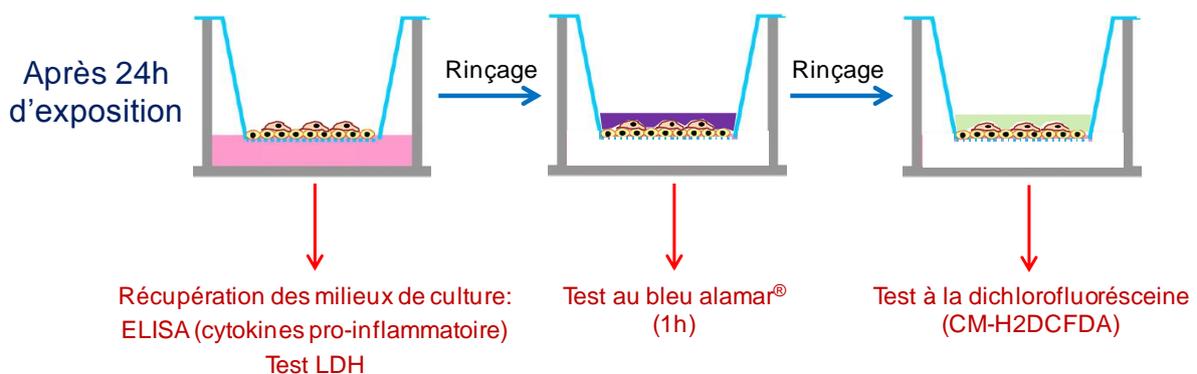


Figure 29 : Évaluation de l'activité biologique après 24h d'exposition sur insert.

2.4.1.1 Test au bleu alamar[®] (Fonctionnalité cellulaire)

Afin d'évaluer l'activité métabolique (ou fonctionnalité) des cellules après 24h d'exposition aux NPs, un test au bleu alamar[®] a été effectué. Pour réaliser le test, le milieu de culture a été récupéré et les cellules ont été lavées avec du HBSS (Gibco, 140025). Une partie des liquides de rinçage utilisés pour laver la partie apicale des cellules exposées aux aérosols de NPs a été conservée pour être analysée ultérieurement. Les cellules ont ensuite été gardées à l'incubateur pendant 1h, submergées avec 0,5 mL (sur plaques) ou 1 mL (sur insert) de solution de bleu alamar[®] (Invitrogen, prestoblue A13261) diluée à 10% dans du milieu de culture. Après 1h d'incubation, les cellules fonctionnelles ont métabolisé la resazurin du bleu alamar[®] en resorufin lors du processus de respiration mitochondriale. Pour chaque échantillon, 100 µL de solution métabolisée a ensuite été transférée dans une plaque 96 puits (Falcon, 353072), puis la fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 555 nm et une longueur d'onde d'émission de 585 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN, infinite 2000). L'intensité de fluorescence de chaque échantillon a ensuite été exprimée en pourcentage de fonctionnalité par rapport au témoin. Les cellules exposées à l'ALI à de l'air filtré ont servi de témoins pour les expositions aux aérosols. Les cellules exposées à du milieu de culture ont servi de témoins pour les expositions aux suspensions.

2.4.1.2 Test LDH (intégrité cellulaire)

Du lactate deshydrogénase (LDH) est libéré par les cellules vers le milieu extracellulaire lorsqu'il y a rupture de la membrane plasmique. C'est donc un marqueur représentatif de l'intégrité des cellules. Afin d'évaluer l'intégrité cellulaire après exposition aux NPs, le relargage du LDH en partie apicale ou basale a été mesuré dans les milieux de culture récupérés 24h après exposition aux aérosols ou aux suspensions de NPs. Les milieux de culture prélevés en partie apicale ont été préalablement centrifugés pendant 5 min à 13000 G et 4°C, pour enlever les NPs. L'activité en LDH dans les milieux a ensuite été évaluée à l'aide d'un kit commercial (Promega, CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity assay), en suivant les instructions du fournisseur. La fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 550 nm et une longueur d'onde d'émission de 585 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN infinite 2000). La valeur de chaque échantillon a été exprimée en fonction du maximum en LDH relargué par les cellules, en pourcentage d'intégrité cellulaire par rapport au témoin. Pour mesurer le relargage maximum de LDH, des cellules ont été lysées pendant 24h en utilisant une solution de Triton diluée à 0,1X (Sigma-Aldrich, T8787) dans du milieu de culture. Pour les expositions aux suspensions sur inserts, les résultats en

partie apicale et basale ont été rassemblés, pour être représentatif de l'intégrité total des cellules.

2.4.1.3 Test à la dichlorofluoresceine (DCF) (Espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires)

Après réalisation du test au bleu alamar, les cellules ont été rincées avec du PBS (Gibco, 10270), puis ont été incubées pendant 35 min avec 0,5 mL d'une solution de sonde 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) (Life technologies, C6827) à 10 μ M. La sonde est métabolisée par les espèces réactives de l'oxygène présentes dans les cellules en un composé fluorescent. Au bout de 30 min d'incubation, la solution a été retirée dans les puits servant de contrôle positif puis a été remplacée par une solution de H₂O₂ à 1 mM dans du PBS. Les cellules servant de contrôle positif ont été incubées pendant 5 min. Après incubation, les cellules sur inserts ou sur plaques ont été rincées avec du PBS puis incubées pendant 5 min avec 0,5 mL d'une solution de Diméthyle Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, D2438) à 90% dans du PBS. Les cellules ont ensuite été lysées à l'aide de grattoirs à cellules (TPP, 99002), afin de libérer le composé fluorescent dans le compartiment extracellulaire. Après cette étape, le contenu des inserts ou des puits a été récupéré dans des tubes eppendorf (Eppendorf, 3810X), puis a été centrifugé (10 000 rpm, 4°C, 5 min) afin d'éliminer les cellules mortes ou les NPs restantes. Cent cinquante microlitres de chaque tube a ensuite été transféré dans une plaque 96 puits opaque (Greiner Bio-one, 655076) et la fluorescence a été mesurée (excitation: 488 nm, émission: 530 nm) au spectrophotomètre (TECAN, infinite 2000). La valeur de chaque échantillon a été exprimée en pourcentage de ROS intracellulaire par rapport au témoin.

2.4.1.4 Quantification des cytokines et des chémokines par ELISA

La sécrétion en médiateurs pro-inflammatoires a été mesurée dans les milieux de culture ou les liquides de rinçage récupérés après 24h d'exposition aux aérosols ou aux suspensions de NPs et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse. Avant congélation, les milieux de culture et les liquides de rinçages récupérés en partie apicale ont été centrifugés pendant 5 min à 13 000G et 4°C pour enlever les NPs. La sécrétion en IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α a été mesurée en utilisant des kits ELISA multiplex (Mesoscale discovery, K15025B) et un spectrophotomètre MSD (Mesoscale discovery, Sector Imager 24000) en suivant les recommandations du fournisseur. La valeur de chaque échantillon a été exprimée en pourcentage de cytokine sécrétée par rapport au témoin. Les cellules stimulées pendant 21h avec une concentration de

LPS de 20 µg/mL (Sigma-Aldrich, L2880) (en partie basale pour les expositions sur inserts), ont été utilisées comme contrôle positif.

2.4.1.5 Interactions entre les NPs et le LDH

L'existence de potentielles interactions entre les NPs utilisés et le LDH a été évaluée. Des plaques 96 puits (Falcon, 353072) ont été incubées, en absence de cellules, pendant 24h avec des suspensions en TiO₂ et CeO₂ de 0, 100, 400 µg/mL en présence de 0,275 UI/mL de standard en LDH (Roche, 10127876001). Après 24h d'incubation, les surnageants ont été récupérés dans des tubes eppendorfs, centrifugés pendant 5 min à 13 000 G et 4°C pour enlever les NPs, puis la quantité en LDH a été évaluée.

2.4.1.6 Interactions entre les NPs et les cytokines

Les potentielles interactions entre les NPs et les cytokines ont été évaluées. Des plaques 96 puits (Falcon, 353072) ont été incubées, en absence de cellules, pendant 24h avec des suspensions en TiO₂ et CeO₂ de 0, 100, 400 µg/mL en présence de 1250 pg/mL de IL-1β, IL-6, IL-8 et TNF-α. Après 24h d'incubation, les surnageants ont été récupérés dans des tubes eppendorfs puis centrifugés pendant 5 min à 13 000 G et 4°C pour enlever les NPs. Les quantités en IL-1β, IL-6, IL-8 et TNF-α ont ensuite été mesurées dans les milieux à l'aide de kits par ELISA multiplex (Mesoscale discovery, K15025B).

3. Expérimentations *in vivo*

3.1 Animaux

Des rats âgés de 7 semaines et exempts de tout pathogènes (WISTAR, JANVIER LABS, France ; 200 g) ont été hébergés, dans des cages en polycarbonate, dans une pièce avec un contrôle de la température, de l'humidité et un accès libre à de l'eau et de la nourriture. Toutes les expérimentations *in vivo* ont été approuvées par le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de Picardie (CREMEAP) (C2EA – 96).

3.2 Préparation et caractérisation des suspensions de NPs

Des suspensions de TiO₂ (NM105, NM101, NM100) et de CeO₂ (NM212) ont été préparées à 10 mg/mL dans de l'eau Milli-Q, puis dispersées à amplitude 100 pendant 2 min (1 min on, 1

min off, 1 min on) en utilisant un sonicateur muni d'un cuphorn (QSONICA, Q700). Des dilutions à 5 ; 0,5 et 0,05 mg/mL ont ensuite été effectuées dans de l'eau Milli-Q afin d'exposer les rats par aspiration intratrachéale à 0,5 ; 0,05 et 0,005 g/animal. D'après la surface alvéolaire d'un rat adulte, (4000 cm², [93]), cela correspond à des masses nominales déposées dans les poumons par unité de surface d'environ 0,1 ; 0,01 et 0,001 µg/cm². Les suspensions de NPs ont été caractérisées par mesures DLS (Malvern, Zetasizer Nano S) pour évaluer le diamètre hydrodynamique et la distribution en taille des NPs.

3.3 Exposition par aspiration intratrachéale

Les rats ont été préalablement anesthésiés par injection intra péritonéale avec 0,5 mL d'une solution de kétamine/atropine/xylazine (0,5 mg/kg de ketamine hydrochloride, 0.1 mg/kg d'atropine et 1 mg/kg de xylazine). Une fois anesthésiés, les rats ont été intubés au niveau de la trachée avec une canule, puis ont été connectés à un respirateur pendant 30s afin de créer une hyperventilation. Après déconnection du respirateur, 100 µL de suspension de NPs ou d'eau Milli-Q ont été déposés dans la canule. La suspension déposée a été aspirée dans les poumons des animaux à la reprise de la respiration.

3.4 Dosage des NPs dans les poumons

Trois heures après instillation, les rats ont été sacrifiés pour évaluer la masse de NPs dans les poumons (n=2). La masse de NPs déposée a été mesurée par analyse ICP-MS, après digestion des organes dans de l'acide.

3.5 Évaluation de l'activité biologique

Les rats (n=6) ont été sacrifiés 24h après exposition aux suspensions de TiO₂ et CeO₂. Trois lavages Bronchoalvéolaires (BAL) ont été effectués avec du PBS, afin de récupérer les cellules présentes dans la lumière alvéolaire ainsi que certains marqueurs biologiques libérés (premier lavage avec 5 mL pour les dosages biochimiques, puis deux de 10 mL pour récupérer plus de cellules). Les LBA récupérés ont ensuite été centrifugés pendant 10 min, à 350g et à 4°C, afin de séparer les cellules du surnageant. Les cellules ont directement été utilisées pour analyse. Les surnageants ont été aliquotés dans des tubes eppendorfs qui ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse biochimique.

3.5.1 Comptage des cellules

Après centrifugation, les culots de cellules ont été resuspendus dans 5 mL de milieu RPMI (Gibco, 61870), 20 μ L de suspension cellulaire ont été mélangés avec 20 μ L d'une solution contenant de l'iodure de propidium et de l'acridine orange, puis les cellules ont été comptées avec un compteur équipé d'un fluoromètre (Nexcelom, Cellometer[®] Auto 2000). Cela a permis de différencier les cellules pulmonaires des cellules mortes et des érythrocytes.

3.5.2 Cytologie des LBA

Après comptage, les cellules ont été diluées dans du milieu RPMI puis déposées à 300 000 cellules/spot sur des lames à l'aide d'un cytopspin (300g, 5 min). Les lames ont ensuite été fixées et colorées au May-Grunwald Giemsa (MGG). Pour cela, les lames ont été fixées dans du MG pur pendant 3 min, plongées pendant 2 min dans du MG dilué à 50% dans de l'eau Milli-Q, rincées 2 fois avec de l'eau milli-Q, puis colorées au Giemsa. Le pourcentage de chaque type cellulaire présent dans les LBA (macrophages, neutrophiles, éosinophiles) a été déterminé après analyse des lames au microscope optique (Figure 30).

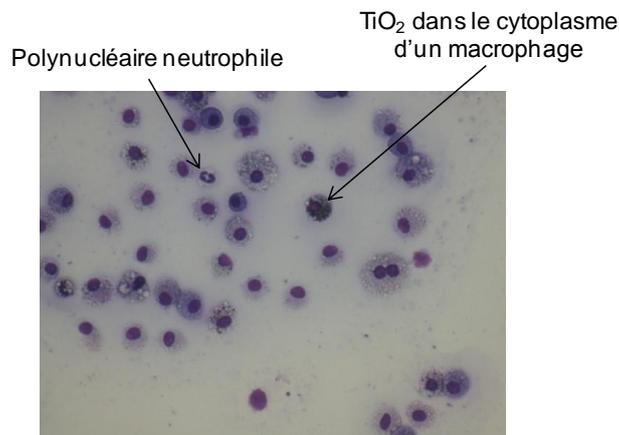


Figure 30 : Cellules de LBA d'un rat exposé 24h au TiO₂ NM105. Observation au microscope optique x40.

3.5.3 Test à la DCF (Espèces réactive de l'oxygène intracellulaire)

Après comptage, les cellules présentes dans les LBA et reprises dans du milieu RPMI ont étéensemencées à 1×10^6 cells/mL (0,5 mL/puits), en présence de 10 % de SVF, dans des plaques 24 puits (Falcon, 353047). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 18h, pour laisser les cellules (principalement les macrophages) adhérer au fond de la plaque. Après rinçage des cellules avec du PBS, un test à la DCF a été réalisé, comme détaillé

précédemment pour les expérimentations *in vitro* (Cf. § 2.4.1.3). La fluorescence a été mesurée (excitation: 488 nm, émission: 530 nm) au spectrophotomètre (TECAN, infinite 2000). La valeur de chaque échantillon a été exprimée en pourcentage de ROS intracellulaire par rapport au témoin (rat exposés à de l'eau milli-Q).

3.5.4 Libération de médiateurs pro-inflammatoires dans les surnageants des LBA

Le relargage des cytokines pro-inflammatoires Il-1 β , IL-6, Kc-gro et TNF- α a été mesuré dans les surnageants collectés en utilisant des kits ELISA multiplex (Mesoscale discovery, Proinflammatory Panel 2, N05059A-1) et un lecteur multiplex (Mesoscale discovery, Sector Imager 24000) suivant les recommandations du fournisseur.

3.5.5 Quantité de LDH dans les surnageants des LBA

La quantité de LDH dans les surnageants des LBA a été mesurée de la même manière qu'*in vitro* (Cf. § 2.4.1.2), pour évaluer la cytotoxicité.

4. Analyses statistiques

Pour les expérimentations *in vitro*, les données ont été exprimées en moyenne \pm écart-type, sur trois expériences indépendantes réalisées en triplicats. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Les tests de Shapiro-wilk et de Bartlett ont été utilisés pour évaluer la normalité des données et l'égalité des variances. Comme les variances n'étaient pas égales, les données ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi par le test post-hoc de Dunn, pour comparer les groupes traités à leurs témoins. Les cellules exposées à l'ALI à l'air ont servi de témoins pour les expositions aux aérosols. Les cellules exposées au milieu de culture ont été utilisées comme contrôle pour les expositions aux suspensions. Pour les tests au bleu alamar et au LDH, les valeurs issues des cellules exposées aux NPs ou à leur témoins et les valeurs issues des cellules gardées à l'incubateur (pour les expositions à l'ALI uniquement) ont été incluses dans l'analyse statistique. Pour le test DCF, les valeurs issues des cellules exposées aux NPs ou à leur témoins, et celles issues des cellules exposées à 1 mmol de H₂O₂ (témoins positif) ont été incluses dans l'analyse statistique. Pour les tests ELISA, les valeurs des cellules exposées

aux NPs, au milieu de culture et au LPS à la concentration de 20 µg/mL (témoin positif) ont été incluses dans l'analyse statistique.

Afin de comparer la sécrétion en médiateurs pro-inflammatoires à l'ALI et en conditions submergées, une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post hoc de Bonferroni a été effectuée pour comparer les groupes traités à leurs témoins respectifs ou pour effectuer des comparaisons entre l'ALI et la condition submergée. Pour toutes les analyses, les p-values < 0,05 ont été considérées comme significatives.

In vivo, les données ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et le test post-hoc de Dunn ont été utilisés pour comparer les groupes traités au contrôle.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les NPs représentent un danger potentiel pour la santé des travailleurs et du grand public, notamment en cas d'exposition par voie respiratoire. Les études de nanotoxicologie permettent d'évaluer leurs effets sanitaires au niveau pulmonaire. Si une NP est évaluée comme étant toxique *in vivo* chez l'animal, cela peut inciter à prendre des mesures pour réduire l'exposition de l'Homme à celle-ci, avant qu'il y ait des conséquences sur la santé des personnes. Ces études sont donc d'une importance capitale afin de diminuer les potentiels risques sanitaires pour l'Homme.

Néanmoins, dans un contexte de diminution du nombre d'animaux utilisés et compte tenu du nombre important de NPs existantes et de leur grande diversité physico-chimique, la nanotoxicologie a besoin de modèles alternatifs, comme le *in vitro*, permettant de prédire de manière aussi fiable que les modèles *in vivo*, les potentiels effets sanitaires chez l'Homme. Des progrès importants ont été faits pour développer des modèles *in vitro* pulmonaires plus physiologiques et des méthodes d'exposition permettant de simuler l'inhalation de NPs *in vitro*. Cependant, des incertitudes existent quant à la capacité de ces nouveaux modèles à prédire les réponses observées *in vivo* après inhalation de NPs.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer la capacité de plusieurs modèles *in vitro* de complexité différente à prédire les effets toxiques observés *in vivo* chez le rat après exposition aiguë pulmonaire à des NPs métalliques faiblement solubles de TiO₂ et de CeO₂.

Dans un premier temps, des expérimentations *in vitro* ont été effectuées afin d'évaluer si exposer des cellules en monocultures ou en co-cultures à l'interface l'ALI à des aérosols de NPs de TiO₂ et de CeO₂, générerait des résultats différents comparé à des expositions classiques à des suspensions en submergé. Ce travail, intitulé « L'exposition à l'interface air-liquide à des aérosols de nanomatériaux induit des niveaux d'activation biologique différents par rapport à l'exposition à des suspensions », a fait l'objet d'un **premier article** publié dans la revue Particle and Fibre Toxicology [193]. Dans un second temps, des expérimentations *in vivo* par aspiration intratrachéale ont été réalisées afin de comparer les réponses toxiques *in vitro* avec celles obtenus *in vivo*. Ce travail est présenté dans un **second article**, intitulé : « Prédiction de la toxicité *in vivo* pulmonaire induite par l'exposition aiguë à des nanomatériaux faiblement solubles en utilisant des méthodes *in vitro* avancées » et a été soumis dans la revue Nanotoxicology. Ces deux articles sont présentés ci-après dans ce chapitre.

1. Article n°1 : L'exposition à l'interface air-liquide à des aérosols de nanomatériaux induit des niveaux d'activation biologique différents par rapport à l'exposition à des suspensions.

Des progrès importants ont été réalisés afin de développer des modèles pulmonaires *in vitro* plus physiologiques. Néanmoins, le domaine de la nanotoxicologie manque encore de modèles et de méthodes d'exposition *in vitro* fiables, afin de prédire les réponses observées *in vivo* après inhalation de NMs. Dans ce contexte, le but de ce premier travail a été d'évaluer si se rapprocher des conditions d'exposition *in vivo*, en exposant des cellules pulmonaires en monocultures ou en co-cultures à l'interface l'ALI à des aérosols de NMs peu solubles, générerait des résultats différents comparé à des expositions classiques à des suspensions en submergé. Pour cela, quatre NPs différentes, trois nano-TiO₂ et un nano-CeO₂, ont été utilisées. Un système permettant d'exposer des cellules à l'ALI à des aérosols de NPs a été mis en place en utilisant des chambres d'exposition VitroCell[®]. Des cellules alvéolaires de la lignée épithéliale A549 ont été cultivées en mono ou en co-culture avec des monocytes de la lignée cellulaire THP-1 différenciés en macrophages et ont été exposées à des aérosols sur des inserts ou à des suspensions de NPs sur des inserts ou des plaques. Les expositions sur les inserts en conditions submergées ont été réalisées en utilisant des conditions de culture et des cinétiques d'exposition similaires à celles utilisées à l'ALI, afin de comparer de manière précise les deux méthodes d'exposition. Les expositions sur les plaques, en utilisant des conditions classiquement utilisées en submergé, ont été effectuées afin de fournir des résultats comparables avec ceux obtenus dans d'autres études. L'activité biologique des cellules (inflammation, viabilité cellulaire, stress oxydant) a ensuite été évaluée après 24h d'exposition aux NPs et des comparaisons ont été réalisées entre les différentes méthodes *in vitro* utilisées. Pour effectuer les comparaisons, les doses réellement déposées sur les cellules ont été prises en compte.

Les doses de TiO₂ et de CeO₂ déposées sur les cellules, en utilisant notre système d'exposition aux aérosols (environ 3 µg/cm² au maximum), ont été suffisantes pour observer des effets indésirables. Parmi les marqueurs testés, le dosage des médiateurs de pro-inflammation est apparu comme étant le plus sensible pour évaluer de potentiels effets biologiques, que cela soit à l'ALI ou en submergé. Par ailleurs, nous avons observé que les co-cultures semblaient plus sensibles que les monocultures. Lorsque nous avons comparé les

réponses biologiques en fonction des méthodes d'exposition utilisées, nous avons mis en évidence des effets toxiques à des doses plus faibles à l'ALI par rapport à en submergé. Néanmoins, un classement des NPs en fonction des effets toxiques a été établi et celles-ci ont été classées de manière similaire, quelle que soit la méthode d'exposition utilisée.

En conclusion, nous avons montré que l'exposition de cellules pulmonaires à l'ALI à des aérosols était une méthode valable et sensible pour évaluer les potentiels effets toxiques de NPs faiblement solubles. Nous avons également souligné l'importance du modèle cellulaire et nous avons montré qu'il était possible d'utiliser des modèles plus sensibles et plus physiologiques pour compenser le fait que les doses maximales administrées par la méthode ALI restaient faibles en comparaison du submergé. Ces résultats apportent des perspectives intéressantes quant à l'usage de méthodes d'exposition *in vitro* plus pertinentes pour évaluer la toxicité des NPs.

RESEARCH

Open Access

Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions



Thomas Loret^{1,2}, Emmanuel Peyret¹, Marielle Dubreuil¹, Olivier Aguerre-Chariol³, Christophe Bressot³, Olivier le Bihan³, Tanguy Amodeo³, Bénédicte Trouiller¹, Anne Braun¹, Christophe Egles^{2,4} and Ghislaine Lacroix^{1*} 

Abstract

Background: Recently, much progress has been made to develop more physiologic in vitro models of the respiratory system and improve in vitro simulation of particle exposure through inhalation. Nevertheless, the field of nanotoxicology still suffers from a lack of relevant in vitro models and exposure methods to predict accurately the effects observed in vivo, especially after respiratory exposure. In this context, the aim of our study was to evaluate if exposing pulmonary cells at the air-liquid interface to aerosols of inhalable and poorly soluble nanomaterials generates different toxicity patterns and/or biological activation levels compared to classic submerged exposures to suspensions. Three nano-TiO₂ and one nano-CeO₂ were used. An exposure system was set up using VitroCell® devices to expose pulmonary cells at the air-liquid interface to aerosols. A549 alveolar cells in monocultures or in co-cultures with THP-1 macrophages were exposed to aerosols in inserts or to suspensions in inserts and in plates. Submerged exposures in inserts were performed, using similar culture conditions and exposure kinetics to the air-liquid interface, to provide accurate comparisons between the methods. Exposure in plates using classical culture and exposure conditions was performed to provide comparable results with classical submerged exposure studies. The biological activity of the cells (inflammation, cell viability, oxidative stress) was assessed at 24 h and comparisons of the nanomaterial toxicities between exposure methods were performed.

Results: Deposited doses of nanomaterials achieved using our aerosol exposure system were sufficient to observe adverse effects. Co-cultures were more sensitive than monocultures and biological responses were usually observed at lower doses at the air-liquid interface than in submerged conditions. Nevertheless, the general ranking of the nanomaterials according to their toxicity was similar across the different exposure methods used.

Conclusions: We showed that exposure of cells at the air-liquid interface represents a valid and sensitive method to assess the toxicity of several poorly soluble nanomaterials. We underlined the importance of the cellular model used and offer the possibility to deal with low deposition doses by using more sensitive and physiologic cellular models. This brings perspectives towards the use of relevant in vitro methods of exposure to assess nanomaterial toxicity.

Keywords: Nanomaterials, In vitro, Alveolar cells, Co-culture, Air-liquid interface, Submerged conditions, Toxicity

* Correspondence: ghislaine.lacroix@ineris.fr

¹Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), (DRC/VIVA/TOXI), Parc Technologique ALATA—BP 2, Verneuil-en-Halatte F-60550, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions

Thomas Loret^{1,2}, Emmanuel Peyret¹, Marielle Dubreuil¹, Olivier Aguerre-Chariol³,
Christophe Bressot³, Olivier le Bihan³, Tanguy Amodeo³, Bénédicte Trouiller¹, Anne Braun¹,
Christophe Egles^{2,4} and Ghislaine Lacroix^{1*}

⁽¹⁾Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), (DRC/VIVA/TOXI), Parc Technologique ALATA - BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France,

⁽²⁾Université de Technologie de Compiègne (UTC), Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), UMR CNRS 7338, 60205 Compiègne, France,

⁽³⁾Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), (DRC/CARA/NOVA), Parc Technologique ALATA - BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France,

⁽⁴⁾Tufts University, department of Biomedical Engineering, Medford, Massachusetts, United States of America.

Corresponding Author

*Ghislaine Lacroix, INERIS, Parc Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France,
tel : 03 44 55 63 15

Abstract

Background: Recently, much progress has been made to develop more physiologic *in vitro* models of the respiratory system and improve *in vitro* simulation of particle exposure through inhalation. Nevertheless, the field of nanotoxicology still suffers from a lack of relevant *in vitro* models and exposure methods to predict accurately the effects observed *in vivo*, especially after respiratory exposure. In this context, the aim of our study was to evaluate if exposing pulmonary cells at the air-liquid interface to aerosols of inhalable and poorly soluble nanomaterials generates different toxicity patterns and/or biological activation levels compared to classic submerged exposures to suspensions. Three nano-TiO₂ and one nano-CeO₂ were used. An exposure system was set up using VitroCell® devices to expose pulmonary cells at the air-liquid interface to aerosols. A549 alveolar cells in monocultures or in co-cultures with THP-1 macrophages were exposed to aerosols in inserts or to suspensions in inserts and in plates. Submerged exposures in inserts were performed, using similar culture conditions and exposure kinetics to the air-liquid interface, to provide accurate comparisons between the methods. Exposure in plates using classical culture and exposure conditions was performed to provide comparable results with classical submerged exposure studies. The biological activity of the cells (inflammation, cell viability, oxidative stress) was assessed at 24h and comparisons of the nanomaterial toxicities between exposure methods were performed.

Results: Deposited doses of nanomaterials achieved using our aerosol exposure system were sufficient to observe adverse effects. Co-cultures were more sensitive than monocultures and biological responses were usually observed at lower doses at the air-liquid interface than in submerged conditions. Nevertheless, the general ranking of the nanomaterials according to their toxicity was similar across the different exposure methods used.

Conclusions: We showed that exposure of cells at the air-liquid interface represents a valid and sensitive method to assess the toxicity of several poorly soluble nanomaterials. We underlined the importance of the cellular model used and offer the possibility to deal with low deposition doses by using more sensitive and physiologic cellular models. This brings perspectives towards the use of relevant *in vitro* methods of exposure to assess nanomaterial toxicity.

Keywords: nanomaterials, *in vitro*, alveolar cells, co-culture, air-liquid interface, submerged conditions, toxicity.

Background

The growing utilization of nanomaterials (NMs) in nanotechnologies leads to an increased risk of human exposure [1], raising concerns about public health and safety [2-4]. Metallic and poorly soluble NMs are among the most widely used [5] and a major exposure route for these NMs is inhalation [6]. Nevertheless, occupational and environmental atmospheres have not been well characterized in terms of NMs [7], which partly explains the lack of epidemiological data on the relationship between exposure to airborne NMs and potential adverse human health effects. However, based on epidemiological studies showing an association between exposure to environmental ultrafine particles and adverse health effects [8], the potential toxicity of NM has been taken into consideration and been widely studied in cell cultures and animal models [9, 10]. Results from animal experimentations remain the most reliable [11, 12], especially because of the similar level of complexity compared with the human body. Besides ethical considerations, *in vitro* studies are widely used to study mechanisms of toxicity because they are usually cheaper, faster and easier to implement than *in vivo* studies [13]. Nevertheless, the relevance of *in vitro* studies to predict *in vivo* effects needs to be carefully assessed.

In vivo, inhaled NMs can deposit in the alveolar region [14, 15] and interact with components of the alveolar barrier at the air-liquid interface (ALI) [15]. At the apical side of the barrier, insoluble NMs first interact with the thin layer of surfactant secreted by pneumocytes [16]. This layer covers the entire alveolar surface and transport of NMs occurs from the air to the aqueous surfactant phase [15]. NMs can then be taken up by circulating macrophages to be eliminated or interact directly with pneumocytes [15, 17]. If NMs cross the alveolar barrier [18, 19], they can interact with other components of the barrier such as endothelial cells or immune cells and be transferred to the blood and other organs [19, 20]. As a consequence of the particle-cell interactions, mechanisms of defense can become activated and cell damages can occur such as cell function impairment, release of pro- and anti-inflammatory cytokines, production of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) and anti-oxidant species, and genotoxicity [4, 6, 21].

In vitro, monocultures of pulmonary cells are usually exposed in submerged conditions to suspensions of NMs to determine mechanisms of toxicity [21] or high throughput screening of novel compounds [13]. However, these experimental conditions do not reflect cell-cell communications and cell-particle interactions occurring *in vivo* in the lung, making *in vitro* results difficult to interpret [11, 12, 22-24]. Moreover, in submerged conditions, cell-particle

interactions are dependent on the medium composition [25, 26]. NMs can interact with components of the culture medium, resulting in the formation of a medium specific corona [26, 27] and can agglomerate into larger particles of different sizes. Furthermore, in suspensions the dose delivered to the cells depends on the NM properties in suspension and capacity to settle, which makes *in vitro* dosimetry complex [28-30].

To overcome these difficulties, more complex cellular models [31, 32] and new *in vitro* exposure methods [23, 33] have been and are still being developed to study NM toxicity. Co-culture models are used to mimic communications occurring between different cell types *in vivo* in the lungs [9, 22]. These models associate various cells such as epithelial, macrophage, endothelial or dendritic cells [31]. *In vitro* systems exposing cells to aerosols of NMs at the ALI have been developed to accurately mimic the cell-particle interactions occurring in the lungs [23]. With these ALI systems, NM deposition on cells occurs through diffusion and/or gravitational mechanisms [23]. However, due to current technical limitations, the maximum doses achieved in these systems remain generally low compared to those achievable through suspension exposure. More recently, in order to improve the deposition rate, exposure devices using electrostatic deposition of charged particles [23, 34] or thermal precipitation [35] have been introduced. However, it has not yet been clearly defined whether *in vitro* simulation of *in vivo* exposure conditions to test NM toxicity gives more predictive results.

As a first step to address this question, the aim of our study was to assess whether ALI exposures to NM aerosols give similar results in terms of cellular responses, compared to submerged exposures to NM suspensions. For this purpose, we set up an *in vitro* system allowing exposure of cell cultures to aerosols of poorly-soluble metallic NMs. We exposed two alveolar models in inserts: monocultures of alveolar epithelial cells A549 and co-cultures of A549 and macrophage like cells THP-1 at the ALI to aerosols of three TiO₂ and one CeO₂ NM. In parallel, we performed submerged exposures in inserts to suspensions of the NMs, using similar culture conditions and exposure kinetics. We also performed classical culture and exposure conditions in plates. We assessed the biological activity of the cells (release of pro-inflammatory markers, cell functionality, cell integrity, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels) after 24h of exposure and compared the toxicities of the NMs between aerosol and suspension exposure.

Results and discussion

The aim of our study was to evaluate if exposing alveolar cells at the ALI to aerosols of inhalable and poorly soluble NMs would generate different toxicity patterns and/or biological activation levels compared to submerged exposures to suspensions (Figure 1).

Exposures at the air-liquid interface to aerosols of NM

To simulate inhalation *in vitro* and to study the toxicity of inhalable and poorly soluble metallic NMs on cells, a system using VitroCell[®] chambers was set up in our laboratory (Figure 2). NM aerosols were generated by nebulization of NM suspensions, using a nebulizer. The deposition of NMs using similar VitroCell[®] systems was validated in several studies [36-39]. Moreover, it was shown that the deposited doses were sufficient to observe biological adverse effects, even at low exposure doses [36, 39]. To validate our system, four different metallic and poorly soluble NMs: three TiO₂ (NM105, NM101, NM100) and one CeO₂ NM (NM212), possessing different physicochemical characteristics (Table 1) were used. TiO₂ and CeO₂ NMs were selected because they are inhalable and commonly used in toxicity studies at the lung level [12, 20, 40].

Table 1. TiO₂ and CeO₂ physicochemical properties

| | | Crittallinity | Primary particle size (nm) | Surface area, BET (m ² /g) | Primary density (g/cm ³) |
|------------------|-------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| TiO ₂ | NM105 | 80% anatase / 20% rutile | 21 | 46.1 | 4.2 |
| | NM101 | anatase | 8 | 316 | 3.9 |
| | NM100 | anatase | 100 | 10 | 3.9 |
| CeO ₂ | NM212 | cubic cerionite | 29 | 27 | 7.2 |

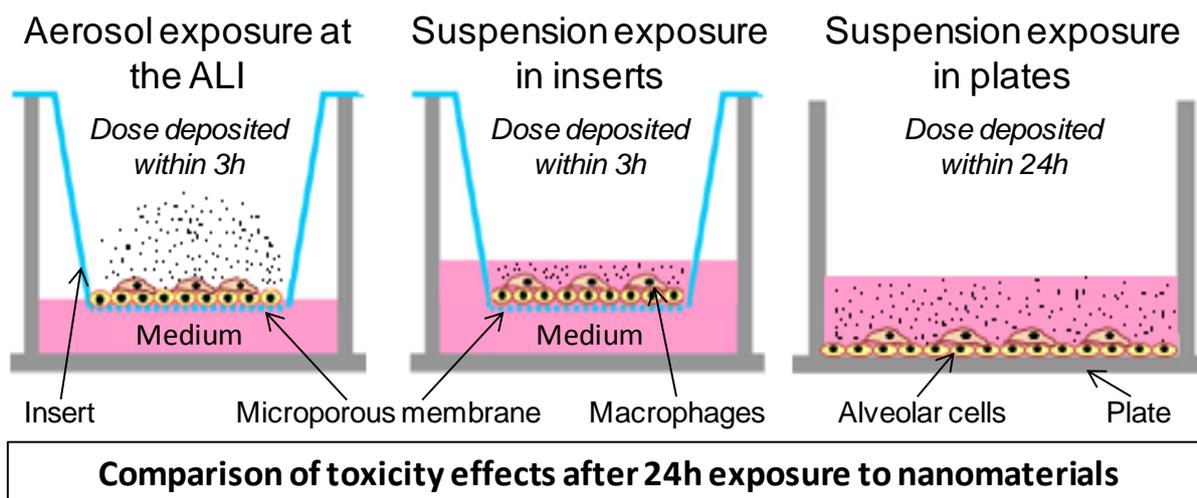


Figure 1. In vitro comparisons between ALI and submerged exposure.

Alveolar cells in monoculture or in co-culture were cultured in inserts or in plates and exposed at the ALI to aerosols or in submerged conditions to suspensions of four poorly soluble NMs. Final doses were reached within 3h in inserts and 24h in plates. Total deposited doses were measured at the ALI or estimated in submerged conditions and cell biological activity was assessed after 24h of exposure to the NMs, performing cell viability, stress oxidative and inflammation assays. Comparisons were performed between the biological activation levels determined after statistical analysis.

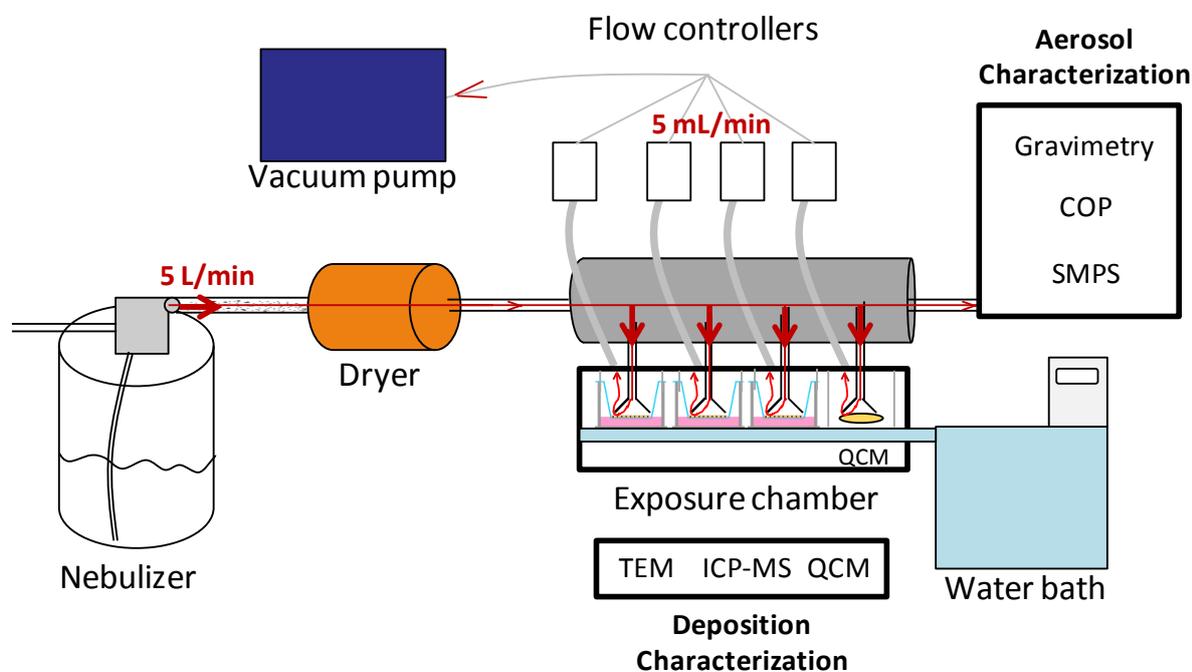


Figure 2. Exposure of cells at the ALI to aerosols of NMs.

Cells at the ALI in inserts were exposed simultaneously to aerosols of NMs or to air in two different VitroCell[®] exposure chambers. NM aerosols were generated at a 5 L/min flow rate by nebulization of suspensions using a nebulizer. Aerosols were dried using a dryer to reduce relative humidity to 90 %. The aerosols were sucked using a vacuum pump to allow the NM deposition on the cells. At the cell level, the flow rate was reduced to 5 mL/min/well using flow controllers to prevent cell damage. Aerosols were characterized in real time using a SMPS and a COP, to assess the size distribution and by gravimetric measurements, to assess the mass concentration. The deposition of NMs on the cells was assessed by performing QCM and ICP-MS measurements and TEM analysis, to assess the mass, shape, size and distribution of the NMs on the cells.

Characterization of NM in aerosols

To evaluate the deposition of the NMs on the cells, we first characterized the NM aerosols that were generated in our system. By gravimetric measurements, NM mass concentrations of around 10, 50 and 100 mg/m³ were measured in the aerosols, for suspension concentrations in the nebulizer of 1, 5 and 10 g/L, respectively (Table 2). The mass size distributions of the aerosols were evaluated (Figure S1) and the total aerosol volume concentrations were determined to assess the aerosol effective densities (Table 2). Consistently with the Cosnier et al. study [41], the aerosol effective densities were much lower than the NM primary densities. The number size distributions of the aerosols were evaluated (Figure 3a): we observed some isolated primary-sized particles, but most particles were agglomerated, as indicated by higher Geometric Mean Diameters (GMDs) than the NM primary particle diameters (Table 2). This may explain why primary densities were low and why high Volumetric Mean Diameters (VMDs) were calculated (Table 2), indicating that most of the aerosol mass was due to agglomerates. Furthermore, we observed that the VMDs and GMDs of the NMs in the aerosols were correlated to the NM mass concentrations measured in the aerosols.

Table 2. Characterization of aerosols and deposition of NM on cells

| Nebulizer (PALAS, AGK 2000) | TiO ₂ NM105 | | | TiO ₂ NM101 | | | TiO ₂ NM100 | | | CeO ₂ NM212 | | |
|---|------------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| Suspension concentration (g/L) | | | | | | | | | | | | |
| Aerosol concentration (mg/m ³) (Gravimetry) | 7.9 | 52.5 | 105.7 | 7.1 | 35.1 | 75.3 | 10.6 | 55.4 | 101.8 | 10.6 | 56.7 | 113.5 |
| Total aerosol volume concentration (µm ³ /cm ³) (SMPS+OPC) | 18.6 | 83.3 | 133 | 11.8 | 66.4 | 114 | 11.7 | 55.3 | 118.4 | 10.8 | 45.8 | 101.3 |
| Aerosol effective density ^a (g/cm ³) | 0.42 | 0.63 | 0.79 | 0.90 | 0.83 | 0.89 | 0.60 | 0.63 | 0.64 | 0.98 | 1.24 | 1.12 |
| Aerosol VMD ^b (nm) | 874 | 963 | 997 | 683 | 750 | 1060 | 1240 | 1360 | 1320 | 597 | 727 | 842 |
| Volume geometric standard deviation | 2.56 | 2.15 | 2.01 | 1.91 | 1.83 | 2.23 | 2.52 | 2.31 | 2.23 | 2.52 | 2.17 | 2.25 |
| Aerosol GMD ^b (nm) | 196 | 234 | 249 | 61 | 74 | 85 | 289 | 319 | 317 | 135 | 190 | 210 |
| Theoretical deposited mass ^c (µg/cm ² in 3h) | 1.5 | 10.1 | 20.4 | 1.4 | 6.8 | 14.5 | 2.0 | 10.7 | 19.6 | 2.0 | 10.9 | 21.9 |
| Deposited mass ^d (µg/cm ² in 3h) (n=4-7) (ICP-MS) | 0.06 ± 0.01 | 0.66 ± 0.12 | 2.68 ± 0.6 | 0.22 ± 0.03 | 1.51 ± 0.11 | 3.15 ± 0.44 | 0.11 ± 0.01 | 0.50 ± 0.12 | 2.85 ± 0.30 | 0.22 ± 0.02 | 1.54 ± 0.08 | 3.26 ± 0.68 |
| Deposited mass ^e (µg/cm ² in 3h) (n=3) (QCM) | 0.11 ± 0.01 | 0.72 ± 0.06 | 1.07 ± 0.02 | 0.14 ± 0.01 | 1.08 ± 0.39 | 2.43 ± 0.21 | 0.44 ± 0.08 | 1.43 ± 0.53 | 3.21 ± 0.69 | 0.24 ± 0.05 | 1.37 ± 0.17 | 2.97 ± 0.64 |
| Deposition efficiency ^f (%) (ICP-MS) | 4.1 | 6.5 | 13.2 | 15.8 | 22.4 | 21.7 | 5.2 | 4.7 | 14.5 | 10.7 | 14.1 | 14.9 |
| Deposition efficiency ^f (%) (QCM) | 7.1 | 7.1 | 5.2 | 10.5 | 15.9 | 16.7 | 21.7 | 13.4 | 16.4 | 11.8 | 12.5 | 13.6 |

^aAerosol density = Aerosol concentration (gravimetry) / total aerosol volume concentration (SMPS + OPC)

^bGeometric Mean Diameter (GMD) and Volumetric Mean Diameter (VMD) were measured with a Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) and an Optic Counter (OPC)

^cTheoretical deposited mass calculated when assuming 100% deposition on cells: theoretical deposited mass = mass concentration of aerosol/volume of aerosol passing through exposure chambers during exposure

^dDeposited mass measured by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)

^eDeposited mass measured using Quartz Cristal Microbalances (QCM)

^fDeposition efficiency = Deposited mass measured / theoretical deposited mass calculated

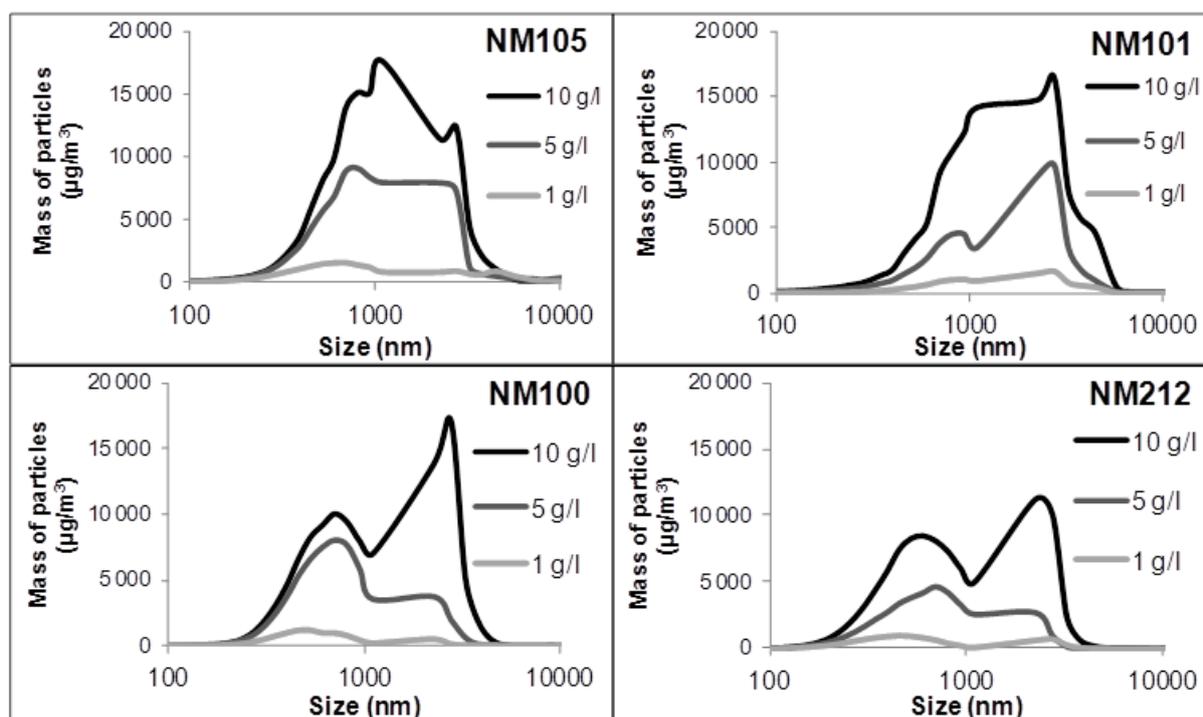


Figure S1. Mass size distribution of TiO₂ and CeO₂ aerosols.

Aerosols were generated by nebulization of suspensions of TiO₂ (NM105, 101, 100) and CeO₂ (NM212) at concentrations of 1 g/L (light grey), 5 g/L (dark grey) and 10 g/L (black). The mass size distribution of the NMs in aerosols was assessed using a Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) and an Optic Counter (OPC), measuring particles ranging from 10 to 1095 nm and 300 to 34 000 nm, respectively.

Characterization of NM deposition on cells

After 3h of exposure of the cells at the ALI, the size distribution of the particles deposited on the cell surfaces (Figure 3) seemed to correlate with the size distribution of the particles in the aerosols. Thus, the complete range of particle sizes present in the aerosols was able to deposit on the cell surfaces during exposure (Figure 3b). Furthermore, homogeneous distributions of the particles on the cell surfaces were observed (Figure 3b). To assess the mass of NM deposited, QCM and ICP-MS techniques were used. Some differences in results were observed, which could be explained by technical differences between the two methods. In the QCM technique, NMs get deposited on an inert quartz surface instead of cells and there is no discrimination between NMs and potential contaminants in the deposited mass detected. However, the ICP-MS methodology reveals the mass of NMs deposited on the cell surface by direct dosage. For these reasons, we took the ICP-MS method as reference and the ICP-MS measurements were used to determine the deposited mass of the NMs on the cells at the ALI for the rest of the study. Deposited masses of around 0.1, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ were measured for nebulized suspensions at concentrations of 1, 5 and 10 g/L, respectively (Table I). The deposition efficiency on the cells was calculated based on the deposited mass, the mass concentration of the aerosol, the duration of exposure (3h) and the flow rate in the VitroCell[®] chambers (5 mL/min). Depending on the NM physicochemical characteristics and on the initial suspension concentrations, mean depositions ranging from around 4 to 20% were observed (Table 2).

The maximum deposition efficiency observed in our study was either higher or lower than those reported in several studies using similar exposure systems (4%, 2%, 1.1% [37, 42, 43] and 70% [36]). These discrepancies could be due to differences in the physicochemical characteristics of the NMs and aerosols generated or the methods used to characterize the deposition. Nevertheless, the maximum doses deposited in our system, although remaining high when put into perspective with real exposure scenarios [23], were low compared to those reachable through submerged exposure [23].

Devices allowing electrostatic deposition of charged particles [23, 34] or thermal precipitation [35] have been introduced to improve deposition efficiency. For example, Panas et al. [38] increased the deposition percentage of SiO₂ NMs of 50 nm from 0.5% to 11% using an electromagnetic field. However, it remains unclear whether modification of the overall particle charge may alter the particle-cell interactions. Furthermore, the mean deposition rates obtained with our system were sufficient for further toxicological assessments and we decided to test the NM toxicities without using this approach.

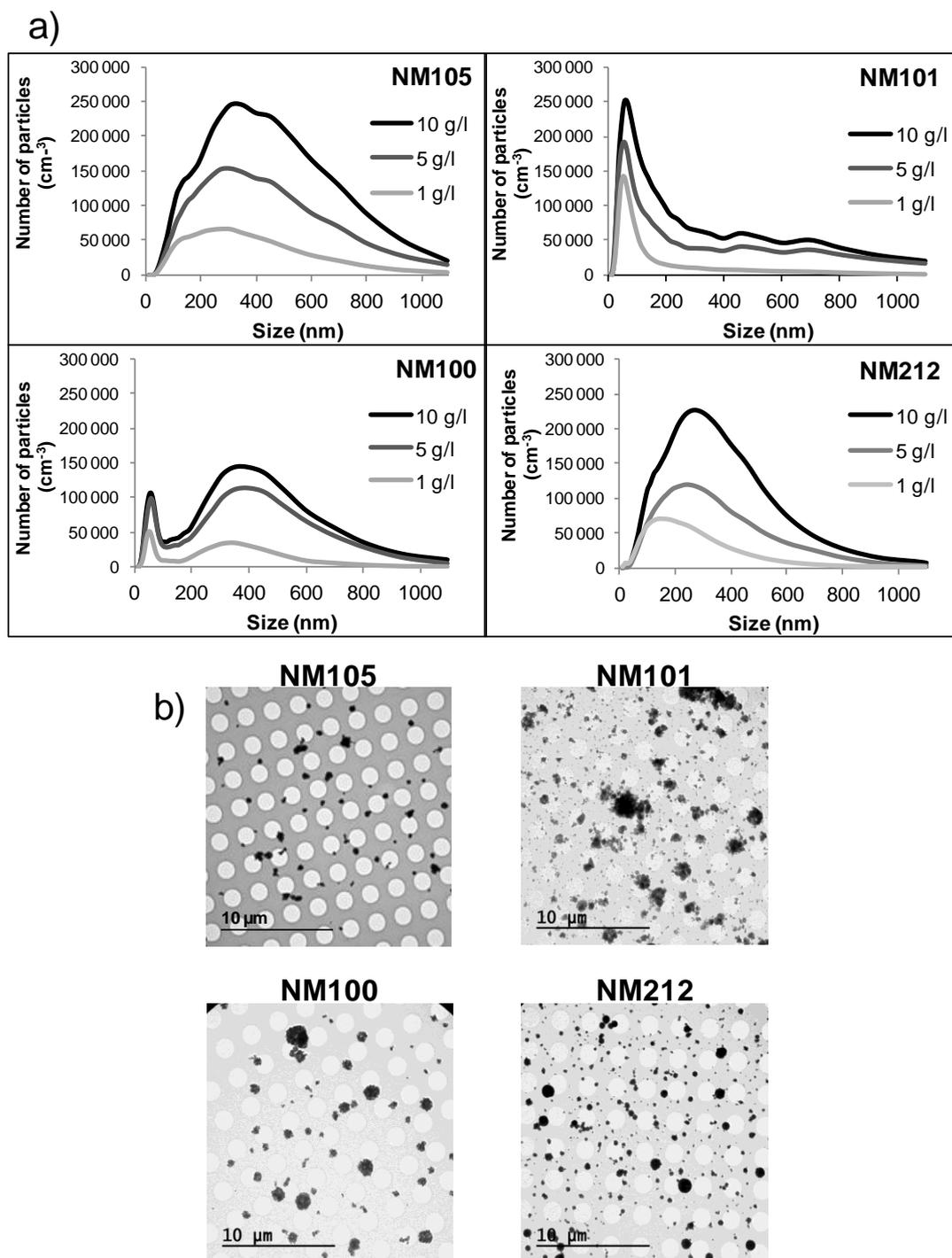


Figure 3. Number size distribution of the aerosols and respective deposition in inserts.

Aerosols were generated by nebulization of suspensions of TiO_2 (NMs 105, 101, 100) and CeO_2 (NM212) at concentrations of 1 g/L (light grey), 5 g/L (dark grey), 10 g/L (black). The size distributions of the NMs in the aerosols were measured using a SMPS and an OPC, and particles ranged from 10 to 1095 nm and 300 to 34 000 nm, respectively (a). The deposition of the NMs on the TEM grids was assessed after exposure (b). TEM grids were placed on the apical side of inserts and exposed 3h to aerosols generated with suspensions of 10 g/L in the nebulizer. After exposure, the grids were analyzed by TEM to assess the sizes, shapes and distributions of the deposited NMs

Cellular models used to assess toxicity of NM at the air-liquid interface

We assessed the toxicity of TiO₂ and CeO₂ NMs at the ALI with our aerosol exposure system. Two cellular models of the alveolar epithelium were chosen. Monocultures of A549 cells, which is one of the most studied alveolar epithelial cell line, were used for the ability of these cells to form a cell layer (although without functional tight junctions), grow at the ALI in inserts and secrete surfactant [44, 45]. This cell line was successfully exposed at the ALI to NM aerosols in several studies in which similar exposure systems were used [36, 38]. A co-culture model of A549 cells and THP-1 cells, differentiated into macrophages, was also used to mimic complex cell-cell interactions and communications occurring *in vivo*. This model was chosen to represent the complex alveolar structure comprising macrophages, in close contact with alveolar cells, which are involved in the mechanisms of defense against particles [46, 47]. Circulating in the lumen of the alveolar space, macrophages have the ability to produce pro-inflammatory markers and internalize particles, underlining their relevance in the study of host responses to NMs [46, 47]. To mimic physiology, a ratio of ten A549 cells to one THP-1 cell was used, which is among the highest pneumocyte to macrophage ratio observed in normal human lungs [48].

To enable ALI exposure to NM aerosols, the cellular models were grown in 0.4 µm pore inserts. In this configuration, after reaching confluence it was possible to keep the A549 monocultures at the ALI, in the presence (for co-cultures) or not of differentiated THP-1 cells, without observing non-physiological medium translocation from the basolateral to the apical compartment. To maintain physiological conditions and prevent damage from exposure to air, the cultures were exposed to aerosols with 90% humidity and exposure times of 3h with 5 mL/min flow rates were used. In these conditions, no decrease in mono or co-culture viability was observed, compared to control cells kept at the ALI in the incubator (Figure S2).

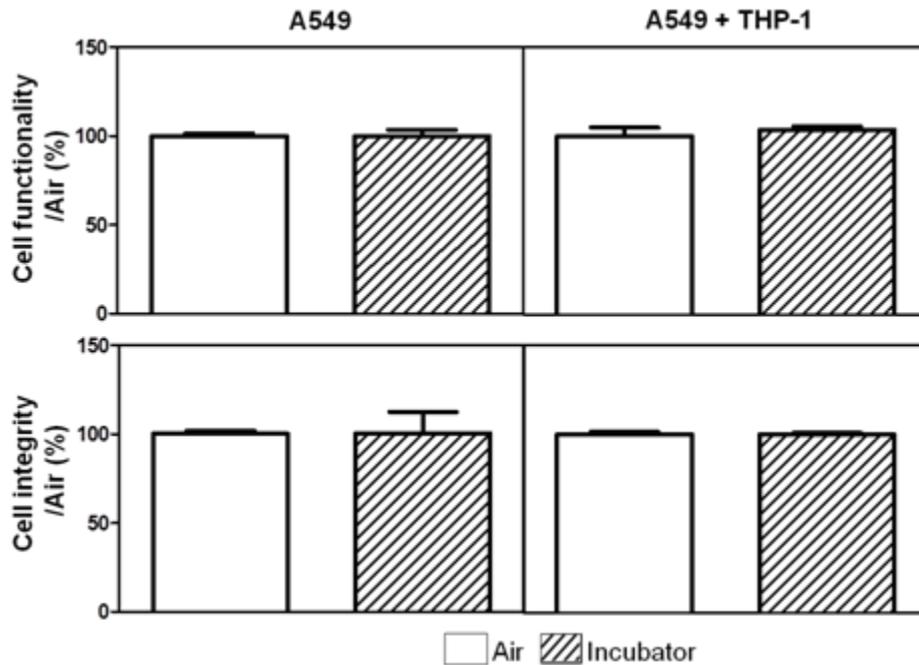


Figure S2. Functionality and integrity of mono and co-cultures exposed at the ALI.

Cells were exposed for 3h to air in a VitroCell® system and then kept at the ALI in the incubator for the remaining 21h (Air) or kept at the ALI in the incubator during 24h (Incubator). Alamar blue® and LDH assays were performed to assess functionality and integrity of the cells, respectively. Data represents the mean \pm SD of three independent experiments. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test were performed to compare treated groups to control (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001).

NM toxicity at the air-liquid interface

To assess the potential adverse effects generated by TiO₂ and CeO₂ NMs, mono and co-cultures were exposed to one (about 3 µg/cm²) and three doses (about 0.1 µg/cm², 1 µg/cm² and 3 µg/cm²) of NMs, respectively (Table 2). These final doses were achieved by exposing the cells at the ALI to the aerosols of NMs continuously for 3h. After apical NM deposition, the cells were kept at the ALI in the incubator during 21h with fresh medium containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) in the basolateral compartment. Twenty-four hours after exposure, we generally observed significant biological adverse effects in the co-culture models and none in the monocultures. Across the different biological assays performed, adverse effects were detected at medium and high doses of NMs (1 and 3 µg/cm²) (Figure 4 and 5) and none were observed at doses of 0.1 µg/cm².

Among all the markers tested, the pro-inflammatory mediators were the most sensitive. In the co-cultures, all the cytokines tested were high above the quantification limit. In the monocultures, IL-1β levels were between detection and quantification limits, IL-6 and TNF-α levels were just above the quantification limit and IL-8 levels were largely above the quantification limit. We observed significant differences in cytokine levels in the co-cultures with all NMs tested, compared to control (Figure 4). TiO₂ NMs105 and 101 triggered pro-inflammatory responses at lower doses than TiO₂ NM100 and CeO₂ NM212. After exposure to aerosols of TiO₂ NM105, we observed increased levels of IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α at doses of 1 and 3 µg/cm². With TiO₂ NM101, we observed significant increases in IL-1β, IL-6, TNF-α levels at doses of 1 and 3 µg/cm² and in IL-8 levels at 3 µg/cm², compared to control. Intriguingly, we observed lower levels of response to TiO₂ NM101 at high doses than at medium doses. Although cytokines were dosed in the basolateral compartment to avoid bias due to potential interactions with the NMs, we cannot rule out the possibility that apical cytokines coated with NMs at the apical side may not have translocated to the basal compartment inducing variability in the results at high doses. With TiO₂ NM100, we observed a significant increase in IL-8 levels at doses of 1 µg/cm² and a significant increase of IL-6 levels at doses of 3 µg/cm², compared to control. With regards to CeO₂ NM212, we observed a significant increase in IL-1β and IL-6 levels and a significant decrease in IL-8 levels at doses of 3 µg/cm², compared to control.

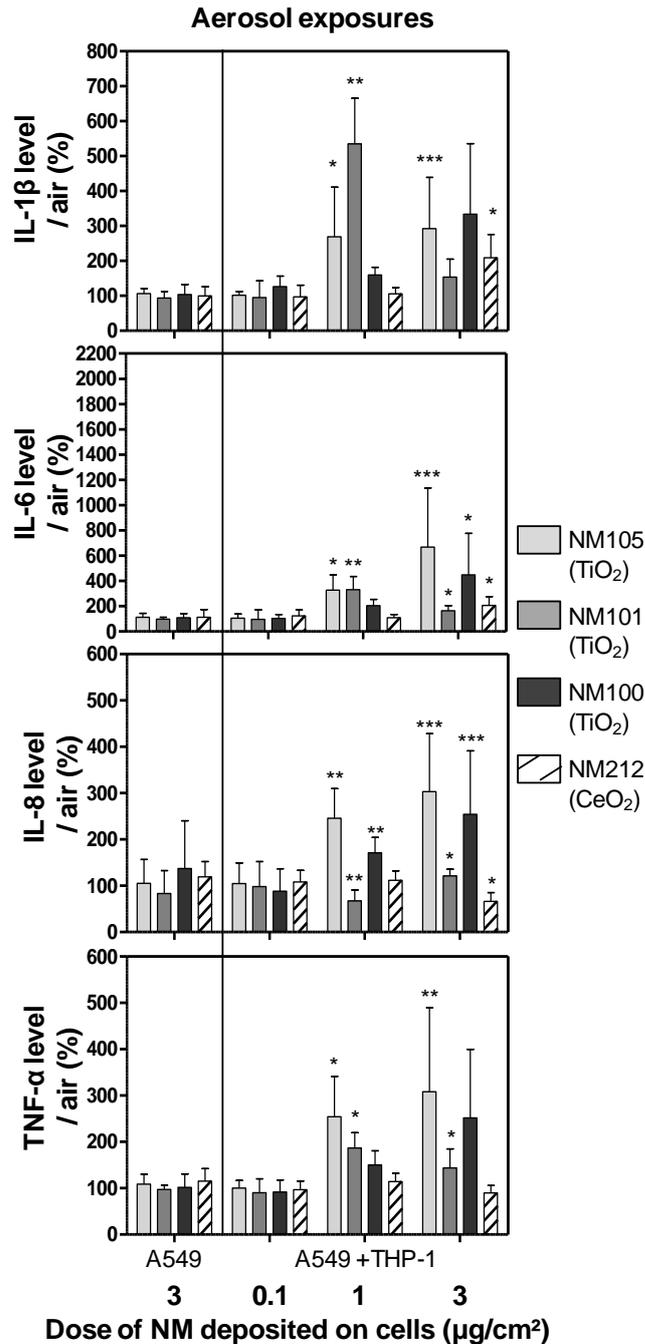


Figure 4. Levels of pro-inflammatory mediators IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α in culture medium of cells exposed at the ALI to aerosols.

Mono (A549) and co-cultures (A549+THP-1) were exposed for 3h at the ALI to aerosols of TiO₂ (NM105, NM101, NM100) and CeO₂ (NM212) or air and kept in the incubator at the ALI for 21h, with NMs deposited on their surface. Deposited doses were around 0.1, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. At 24h, IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the culture medium were measured by ELISA multiplex at the basal side. For exposures at the ALI, specific air and positive controls (LPS 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (not shown on the graph) were used for each NM used and for each concentration tested. Data represent the mean \pm Standard Deviation (SD) of three independent experiments. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test were performed to compare treated groups to controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Cell functionality was not affected across the conditions. Regarding cell integrity, we observed a slight but statistically significant decrease in cell integrity (around 5%) in the co-cultures exposed to medium doses of NM105, but not with the other NMs (Figure 5). However, probably due to high variability, we didn't observe a significant loss of integrity in the co-cultures exposed to high doses of NM105. The integrity of the cells was not impaired with the other NMs (Figure 5). Finally, a significant increase in intracellular ROS levels was observed in co-cultures exposed to high doses of NM101 but not with the other NMs (Figure 5).

The potential adverse effects of poorly soluble NMs were assessed at the ALI in a few other studies. For example, in two linked studies [49, 50], the cytotoxicity of TiO₂ NM105 was evaluated in A549 cells using a CULTEX[®] Radial flow system module. With a deposited mass of 25 µg/cm² per 15 min on the cells during 15, 30 and 60 min, they showed a strong decrease in cell viability 24h after exposure, of about 50%, 60% and 70%, respectively. Using an electrode device to enhance deposition, Panas et al. [38] exposed A549 cells to aerosols of Aerosil200 (SiO₂) and SiO₂-50 with deposited doses of 52 µg/cm² and 117 µg/cm², respectively. They showed increased lactate dehydrogenase (LDH) and IL-8 release after exposure to Aerosil200 and increased IL-8 release after exposure to SiO₂-50.

To conclude, it was shown in several studies that ALI systems can be used to assess the toxicity of soluble NMs in monocultures and co-cultures [36, 39, 51, 52] with deposited doses of about 1-3 µg/cm². Assessment of poorly soluble NM toxicity was also proven to be feasible with alveolar epithelial cells in monocultures, by increasing the deposited doses to around 25 - 100 µg/cm² [38, 49]. Our results indicate that it is also possible to evaluate the toxicity of metallic and poorly soluble NMs at the ALI at lower deposited doses, by using more sensitive cell models like the co-cultures. The enhanced sensitivity of co-culture models including macrophages compared to monocultures of alveolar epithelial cells was also observed in several studies in submerged conditions [53-55]. More physiological culture models such as human primary alveolar epithelial cells could also be used. However, these are not commercially available and their use requires to have access to human biopsies [32].

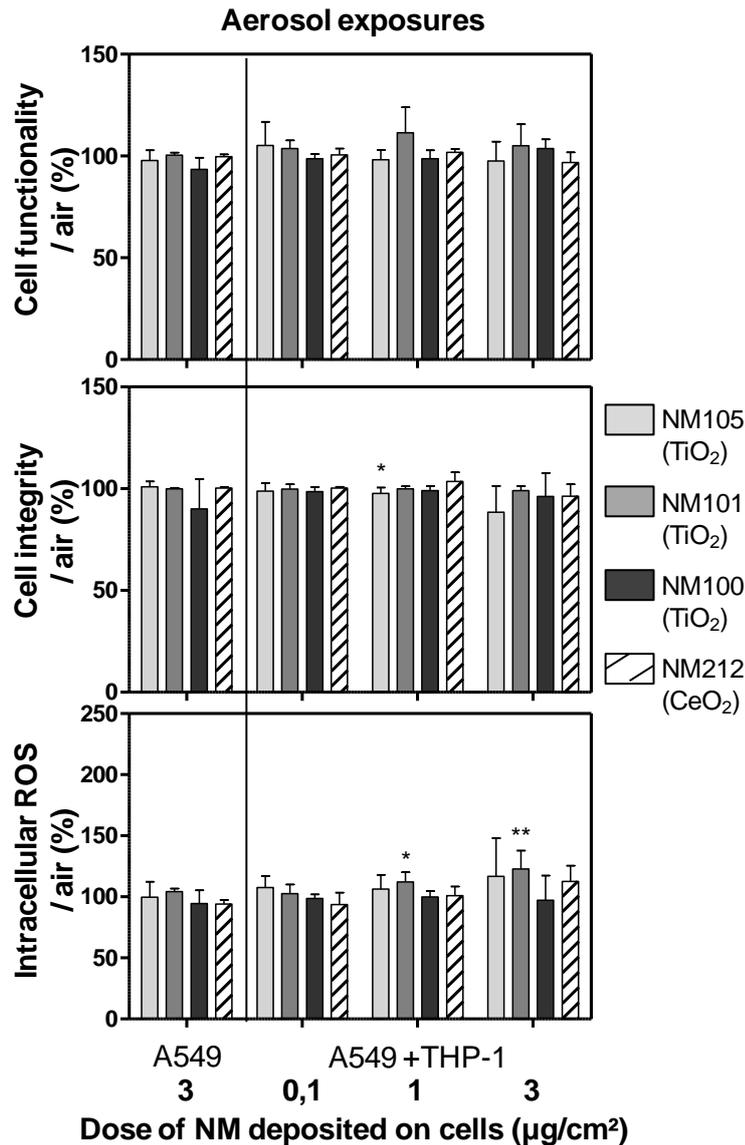


Figure 5. Functionality, integrity and intracellular ROS levels of cells exposed at the ALI to aerosols.

Mono (A549) and co-cultures (A549+THP-1) were exposed for 3h at the ALI to aerosols of TiO₂ (NM105, NM101, NM100) and CeO₂ (NM212) or air and kept at the ALI for 21h in the incubator, with NMs deposited on their surface. Deposited doses were around 0.1, 1, 3 µg/cm². At 24h, Alamar blue[®] and LDH assays were performed to assess functionality and integrity of the cells, respectively. A DCF assay was performed to measure intracellular ROS levels and H₂O₂ (1 mM) was used as positive control for the DCF assay (not shown on the graph). Specific air and incubator controls (cells kept in the incubator) (not shown on the graph) were used for each NM used and for each concentration tested. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test were performed to compare treated groups to control (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Exposure in submerged conditions to suspensions of NM

Since we could only observe biological adverse effects with the co-cultures after exposure to aerosols of NMs at the ALI, we focused on this model for the following experiments. The co-cultures were exposed in submerged conditions to suspensions of TiO₂ NMs 105, 100, 101 and CeO₂ NM212 in inserts and plates with culture medium containing 10% FBS. In inserts, the final deposited dose was achieved within 3h, after which the suspensions were replaced with fresh medium and the cells were kept in the incubator during the remaining 21h with the deposited NMs on their surface. In plates, the final deposited dose was achieved within 24h.

Characterization of suspensions and deposited doses on cells

For accuracy, we characterized the NMs in suspension and estimated the real mass deposited on the cells after 3h of exposure in inserts and 24h of exposure in plates, using the *in vitro* sedimentation diffusion and dosimetry (ISDD) model [30] (Table 3). First, Dynamic Light Scattering (DLS) measurements were performed in 2.56 mg/mL sonicated stock suspensions in Milli-Q water and in 0.4 mg/mL suspensions in culture medium (Figure S3), to assess the size distribution and hydrodynamic diameter of the NMs (Table 3). We observed that the NMs were all polydispersed and that most of the particles were agglomerated in suspension, with sizes ranging approximately from 100 to around 1000 nm (Figure S3). Furthermore, we observed similar distributions in the Milli-Q water and the culture medium. The effective densities of the NMs in culture medium were measured following the Volumetric Centrifugation Method (VCM) developed by Deloid and coworkers [56] (Table 3). Once the NM suspensions were characterized, we used these values to estimate the mean deposited fractions of the NMs on the cells after 3h and 24h of exposure, using the ISDD model (Table 3). It is important to note that for each NM we assumed that all the particles were agglomerated, had the same size in suspension and had the same density. To estimate more precisely the deposition, which depends highly on the size and effective density, it would have been necessary to measure the sizes and effective densities of all the agglomerates separately, as mentioned by Deloid et al. [57].

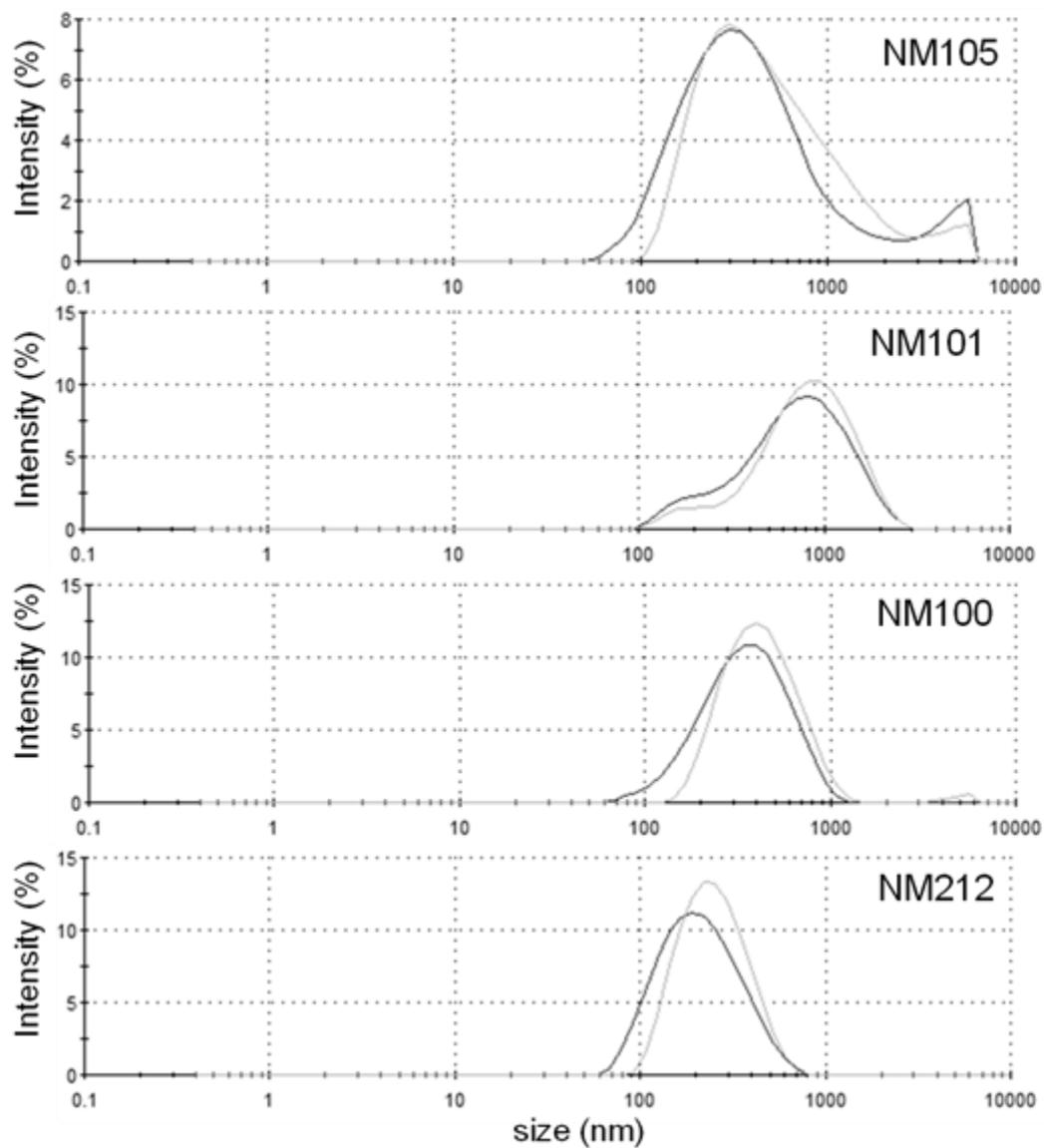


Figure S3. Size distribution of TiO₂ (NM105, 101, 100) and CeO₂ (NM212) in suspensions used to expose cells. DLS measurements were performed after sonication in stock suspensions (2.56 mg/mL in milli-Q water) (dark grey) and after dilution in 0.4 mg/mL suspensions in culture medium (light grey).

Table 3. Characterization of suspensions and deposition of NM on cells

| | Hydrodynamic diameter ^a , Z-average (nm) (n=6) | Effective density ^b (g/cm ³) (n=3) | Deposited fraction after 24h in plates ^c | Deposited fraction after 3h in inserts ^c |
|-------|---|---|---|---|
| NM105 | 381.1 | 1.4 | 28.5% | 8.6% |
| NM101 | 660.9 | 1.586 | 100.0% | 20.0% |
| NM100 | 353.0 | 1.938 | 70.0% | 13.6% |
| NM212 | 240.7 | 1.9701 | 37.8% | 11.0% |

^aDLS measurement^bMeasured after centrifugation, following the VCM developed by Deloid et al.[56]^cEstimated using the ISDD model

Initial concentrations in suspensions were adjusted according to the estimated deposited fractions to determine the real dose deposited on the cells (Table 4). As shown by Deloid et al., we observed that the particles were able to settle faster when the hydrodynamic diameter and the effective density were higher. Furthermore, as it was shown that NMs could interfere in assays [58-60] leading to misinterpretation of results, we assessed the potential interactions between the NMs and the cytokine and LDH assays (Figure S4).

Table 4. Dose deposited in submerged conditions in function of nominal concentration in suspensions

| | | 24h deposition in plates | | | | 3h deposition in inserts | | |
|---|---|--------------------------|------------|-------------|-------------|--------------------------|----------|-----------|
| TiO ₂ NM105 | Nominal dose (µg/mL) | 10 | 50 | 100 | 200 | 54.5 | 163.5 | 544.9 |
| | Nominal dose (µg/cm ²) | 2.5 | 12.5 | 25 | 50 | 11.7 | 35.0 | 116.7 |
| | Estimated dose using the ISDD model (µg/cm ²) | 0.7 | 3.6 | 7.1 | 14.3 | 1 | 3 | 10 |
| TiO ₂ NM101 | Nominal dose (µg/mL) | 4 | 10 | 50 | 100 | 23.4 | 70.1 | 233.5 |
| | Nominal dose (µg/cm ²) | 1 | 2.5 | 12.5 | 25 | 5.0 | 15.0 | 50.0 |
| | Estimated dose using the ISDD model (µg/cm ²) | 1.0 | 2.5 | 12.5 | 25.0 | 1 | 3 | 10 |
| TiO ₂ NM100 | Nominal dose (µg/mL) | 4 | 10 | 50 | 100 | 34.3 | 102.9 | 343.1 |
| | Nominal dose (µg/cm ²) | 1 | 2.5 | 12.5 | 25 | 7.3 | 22.0 | 73.5 |
| | Estimated dose using the ISDD model (µg/cm ²) | 0.7 | 1.8 | 8.8 | 17.5 | 1 | 3 | 10 |
| CeO ₂ NM212 | Nominal dose (µg/mL) | 10 | 50 | 100 | 200 | 42.5 | 127.4 | 424.5 |
| | Nominal dose (µg/cm ²) | 2.5 | 12.5 | 25 | 50 | 9.1 | 27.3 | 90.9 |
| | Estimated dose using the ISDD model (µg/cm ²) | 0.9 | 4.7 | 9.5 | 18.9 | 1 | 3 | 10 |
| Tested doses about (µg/cm²) | | 1 | 3 | 10 | 20 | 1 | 3 | 10 |

Supplementary data: Interaction between NMs and assays

Interactions between NMs and LDH

After 24h of incubation under cell-free conditions with suspensions at concentrations of 0, 100, 400 $\mu\text{g/mL}$ of TiO_2 or CeO_2 and in presence of 0.275 UI/mL of LDH, LDH levels were assessed in the supernatants. No significant differences in LDH levels were observed (0 $\mu\text{g/mL}$), compared to control (Figure S3a).

Interactions between NMs and cytokines

After 24h of incubation in cell-free conditions with suspensions at concentrations of 0, 100, 400 $\mu\text{g/mL}$ of TiO_2 (NMs 105, 101, 100) or CeO_2 (NM212) and in the presence of 1250 pg/mL of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α , cytokine concentrations were assessed by ELISA (Figure S3b). Interactions between NMs and cytokines were observed with the three NMs but not with the NM CeO_2 . At 1250 pg/mL and in the presence of 100 $\mu\text{g/mL}$ of TiO_2 NM101, significant decreases in IL-8 concentration were observed, compared to control. In the presence of 400 $\mu\text{g/mL}$ of NM105, significant increases in IL-1 β and significant decreases in IL-8 and TNF- α concentrations were observed. In the presence of 400 $\mu\text{g/mL}$ of NM101, significant decreases in IL-6, IL-8 and TNF- α concentrations were observed. In the presence of 400 $\mu\text{g/mL}$ of NM100, significant increases in IL-1 β and significant decreases in IL-8 concentrations were observed.

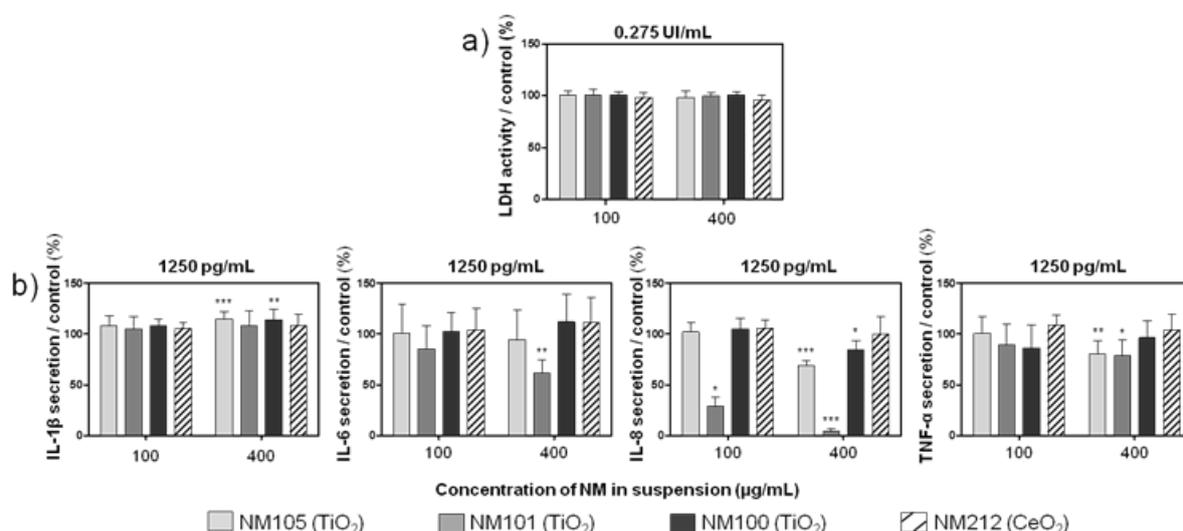


Figure S4. Interactions between NMs and LDH (a) or NMs and cytokines (b) in suspensions. Plates were incubated in cell-free conditions for 24h with suspensions at concentrations of 0, 100, 400 $\mu\text{g/mL}$ of TiO_2 (NMs 105, 101 and 100) and CeO_2 (NM212), in the presence of 0.275 UI/mL of LDH (a) or in the presence of 1250 pg/mL of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α (b). LDH and cytokine levels were assessed in the supernatants, after centrifugation for 5 min at 13 000 G. Data represents the mean \pm SD of three independent experiments. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test were performed to compare treated groups to control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

NM toxicity in submerged conditions

Co-cultures were exposed to suspensions of NMs in inserts using similar culture conditions and exposure kinetics to the air-liquid interface, to assess whether the cells were more sensitive to NMs when exposed to aerosols at the ALI. Cells were exposed for 3h to NM suspensions to achieve deposited doses of around 1, 3, and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Table 4). Cells were then kept in the incubator with fresh medium during the remaining 21h with the deposited NMs on their surface, and biological adverse effects were assessed at 24h.

The levels of the pro-inflammatory mediators IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α were assessed after submerged exposure in inserts, and similarly to at the ALI we generally observed significant effects at lower doses with TiO₂ NMs 105 and 101 than with TiO₂ NM100 and CeO₂ NM212 (Figure 6). With NM105, we observed significant increases in IL-1 β , IL-8 and TNF- α levels at doses of 3 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for IL-6. Significant effects were observed with NM101 at 3 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for IL-6, IL-8 and TNF- α and at 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for IL-1 β . Significant inductions were observed for IL-6 and IL-8 with NM100, at doses of 3 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. Finally, we observed significant effects only with IL-8 and TNF- α , at doses of 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ with NM212.

Cell functionality and integrity were measured to evaluate cell viability (Figure 7). We observed slight (below 5%) but significant decreases in cell functionality at the dose of 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ with the NMs 105 and 212 only, compared to control. However, we observed significant decreases in cell integrity with all the NMs tested: at doses of 3 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for the NMs 105 and 101 and at doses of 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for the NMs 100 and 212. Intracellular ROS levels were also measured and we observed significant increases only after exposure to doses of 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ with NMs 105 and 100 (Figure 7).

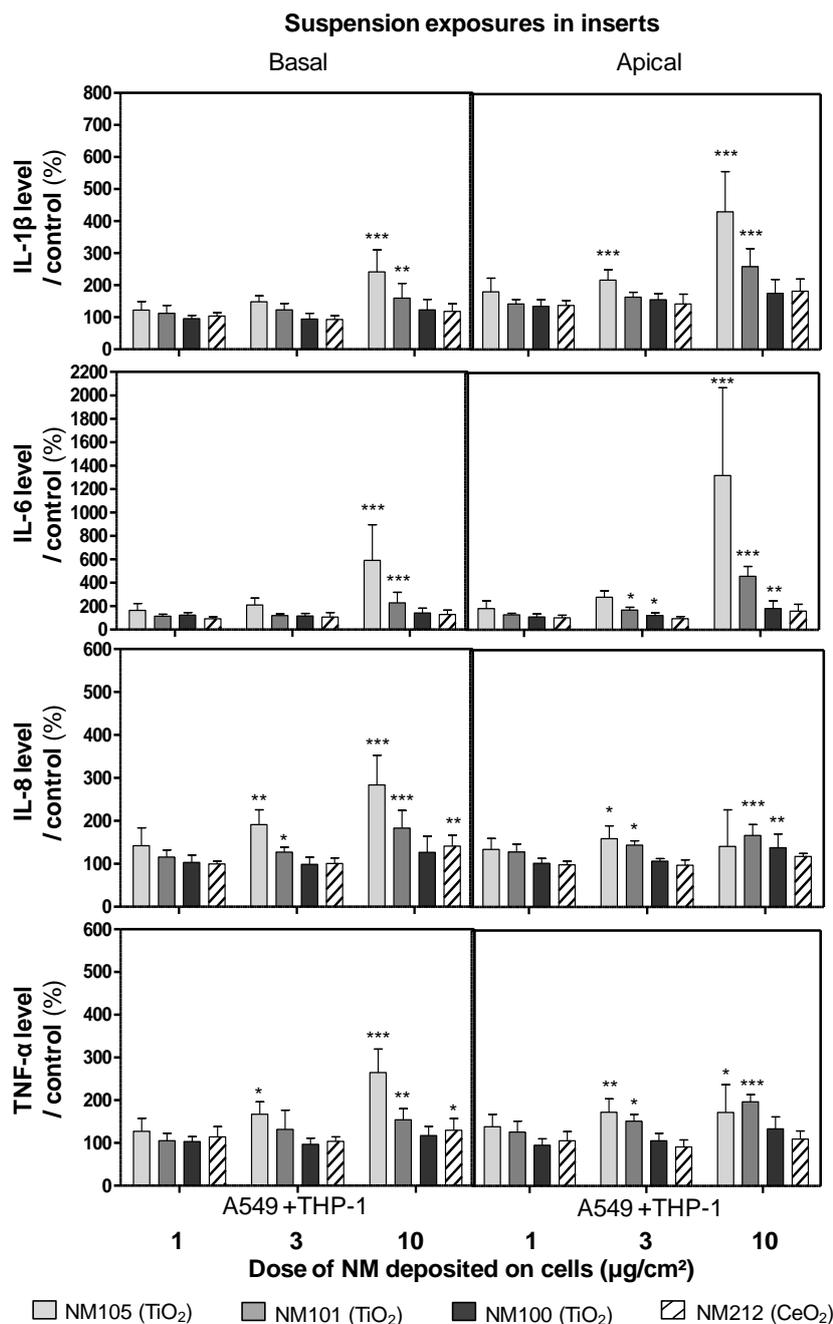


Figure 6. Levels of pro-inflammatory mediators IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α in culture medium of cells exposed in submerged conditions in inserts.

Co-cultures (A549+THP-1) were exposed in inserts for 3h to suspensions of TiO₂ (NM105, NM101, NM100) and CeO₂ (NM212), to achieve deposited doses of around 1, 3 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Suspensions were then replaced by fresh medium and cells were kept for 21h at the incubator with NMs deposited on their surface. At 24h, IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α levels were measured by ELISA multiplex in cell culture medium (apical and basal sides). A specific control (cells exposed to culture medium) and positive control (LPS 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (not shown on the graph) were used for each NM used. Data represent the mean \pm Standard Deviation (SD) of three independent experiments. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test were performed to compare treated groups to controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

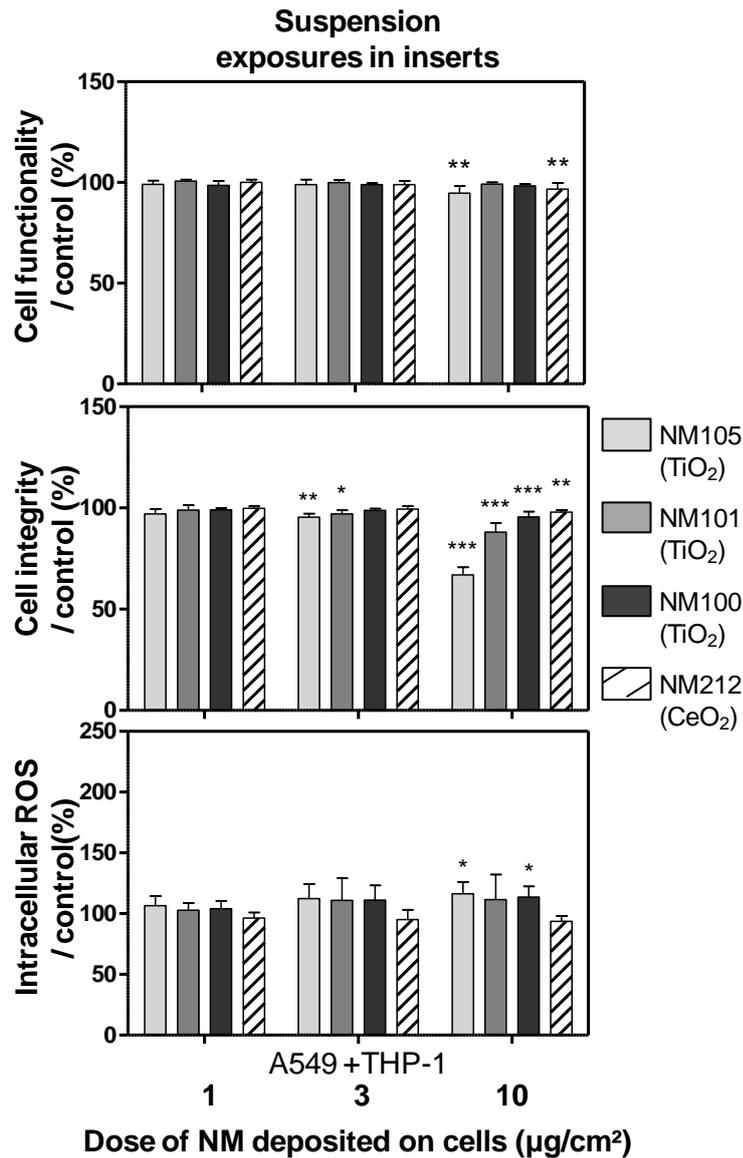


Figure 7. Functionality, integrity and intracellular ROS levels of cells exposed in submerged conditions in inserts.

Co-cultures (A549+THP-1) were exposed in inserts for 3h to suspensions of TiO₂ (NM105, NM101, NM100) and CeO₂ (NM212), to achieve deposited doses of around 1, 3 and 10 µg/cm². Suspensions were then replaced by fresh medium and cells were kept for 21h at the incubator with NMs deposited on their surface. At 24h, Alamar blue[®] and LDH assays were performed to assess functionality and integrity of the cells, respectively. A DCF assay was performed to measure intracellular ROS levels and H₂O₂ (1 mM) was used as positive control for the assay (not shown on the graph). Data represent the mean ± SD of three independent experiments. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test were performed to compare treated groups to controls (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Co-cultures were also exposed in plates for 24h to deposited doses of about 1, 3, 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Table 4), to compare the ALI results with those obtained by classic submerged protocols (Figure 8, 9). In plates, we only observed significant biological effects with the TiO_2 NMs 105 and 101, compared to control. We observed significant increases in the pro-inflammatory mediators IL-1 β and IL-6 at doses of 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NMs 105 and 101 (Figure 8). Significant increases in TNF- α levels at doses of 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for NM101 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for the NM105 were also observed, compared to control. Nevertheless, we didn't observe any significant effects on IL-8 levels, probably due to NM-cytokine interactions (Figure S4). Regarding cell functionality, decreases were observed in cells exposed to suspensions of NM105 (at doses of 3, 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and NM101 (at doses of 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Figure 9). We observed a loss in cell integrity at doses of 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figure 9). Finally, we observed significant increases in intracellular ROS levels at doses of 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ with NM105 only (Figure 9).

As reported in several studies, we observed that TiO_2 NM [20, 40] and CeO_2 NM [61, 62] were slightly toxic but could induce oxidative stress, inflammation, and cytotoxicity after exposure to high concentrations in suspension [12].

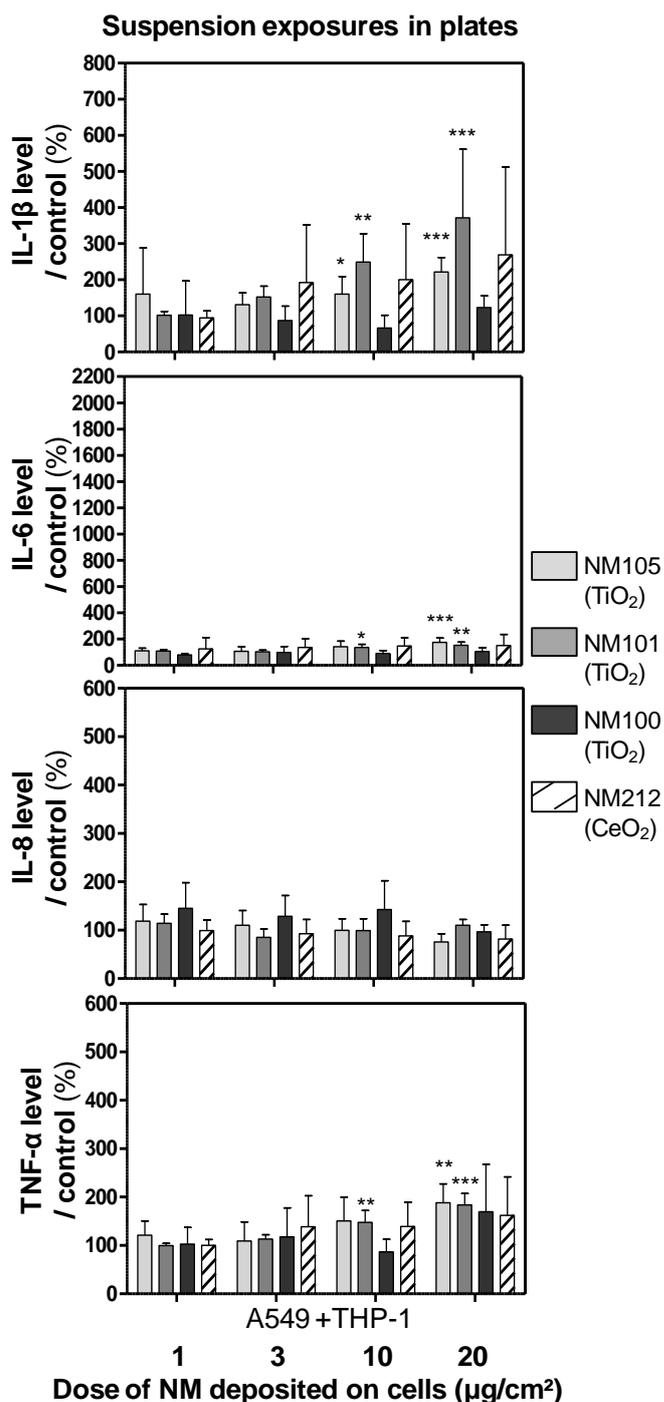


Figure 8. Levels of pro-inflammatory mediators IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α in the culture medium of cells exposed in submerged conditions in plates.

Co-cultures (A549+THP-1) were exposed in plates for 24h to suspensions of TiO₂ (NM105, NM101, NM100) and CeO₂ (NM212), to achieve deposited doses of around 1, 3 and 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α levels were measured by ELISA multiplex in the culture medium. A specific control (cells exposed to culture medium) and positive control (LPS 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (not shown on the graph) were used for each NM used. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test were performed to compare treated groups to controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

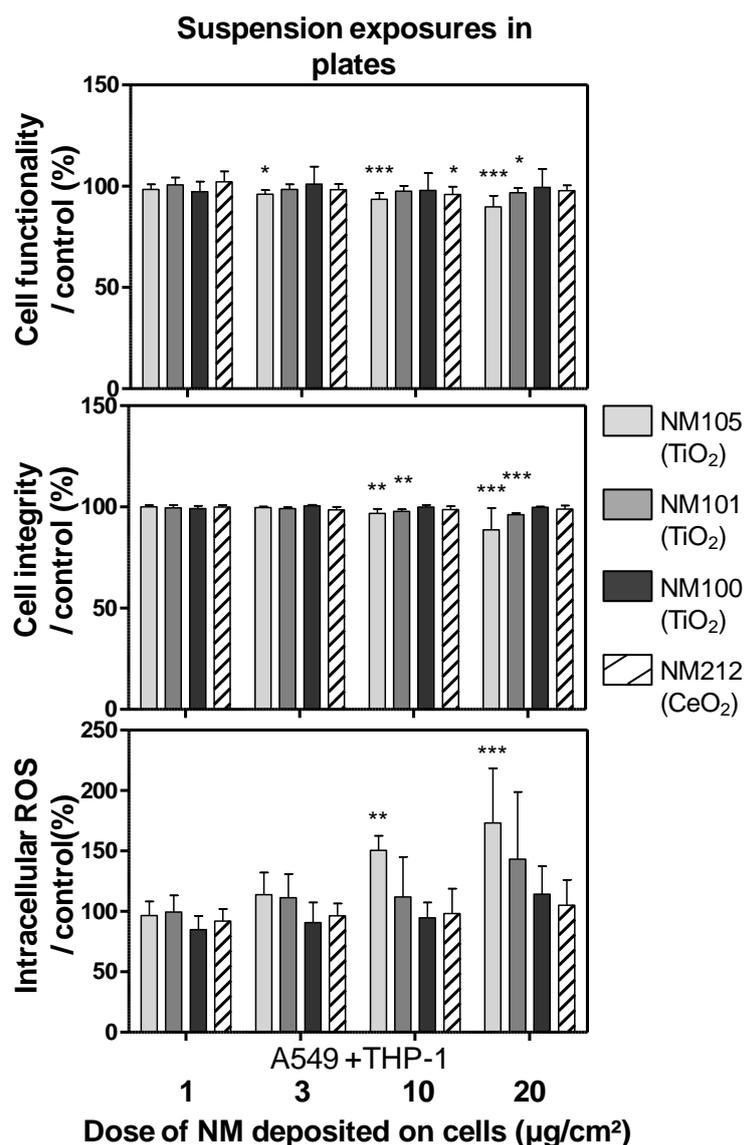


Figure 9. Functionality, integrity and intracellular ROS levels of cells exposed in submerged conditions in plates.

Co-cultures (A549+THP-1) were exposed in plates for 24h to suspensions of TiO₂ (NM105, NM101, NM100) and CeO₂ (NM212), to achieve deposited doses of around 1, 3 and 10 and 20 µg/cm². Alamar blue[®] and LDH assays were performed to assess functionality and integrity of the cells, respectively. A DCF assay was performed to measure intracellular ROS levels and H₂O₂ (1 mM) was used as positive control for the assay (not shown on the graph). Data represent the mean ± SD of three independent experiments. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test were performed to compare treated groups to controls (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Comparison between air-liquid interface and submerged results

We observed significant pro-inflammatory effects in the co-cultures both at the ALI and in submerged conditions (Table 5). However, we observed less significant impacts in cytotoxicity and oxidative stress (Table 6). To provide accurate comparisons between ALI and submerged exposures, the potential interactions between the NMs in suspension and the LDH and cytokine assays were assessed in cell free conditions, as described in the materials and methods section. No interactions between the LDH assay and the NMs were observed (Figure S4a). Although interactions were detected between the pro-inflammatory markers and the NMs (Figure S4b), these interactions did not prevent appropriate data interpretation. Release of pro-inflammatory mediators by the cells appeared to be the most sensitive indicator of biological adverse effects to the NMs at 24h. For this reason, we focused on the pro-inflammatory responses to the NMs to perform the following comparisons between ALI and submerged exposures.

Table 5. Lowest observed adverse effect levels (LOAELs in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) determined with the pro-inflammatory effects for each exposure method used.

| | IL-1 β | | | IL-6 | | | IL-8 | | | TNF- α | | |
|-------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
| | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^b |
| NM105 | 1 | 3 | 10 | 1 | 10 | 20 | 1 | 3 | Ø | 1 | 3 | 20 |
| NM101 | 1 | 10 | 10 | 1 | 3 | 10 | 1 | 3 | Ø | 1 | 3 | 10 |
| NM100 | Ø | Ø | Ø | 3 | 3 | Ø | 1 | Ø | Ø | Ø | Ø | Ø |
| NM212 | 3 | Ø | Ø | 3 | Ø | Ø | 1 | 10 | Ø | Ø | 10 | Ø |

^aExposure at the air-liquid interface on insert (ALI)

^bExposure in submerged conditions in inserts

^cExposure in submerged conditions in plates

Ø No effects measured at tested doses

Table 6. LOAELs in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ determined with the cytotoxicity and oxidative stress effects for each exposure method used.

| | Alamar blue | | | LDH | | | DCFDA | | |
|-------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
| | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c |
| NM105 | 1 | 10 | 3 | 1 | 3 | 10 | Ø | 10 | 10 |
| NM101 | Ø | Ø | 20 | Ø | 3 | 10 | 1 | Ø | Ø |
| NM100 | Ø | Ø | Ø | Ø | 10 | Ø | Ø | 10 | Ø |
| NM212 | Ø | 10 | 10 | Ø | 10 | Ø | Ø | Ø | Ø |

^aExposure at the air-liquid interface on insert (ALI)

^bExposure in submerged conditions in inserts

^cExposure in submerged conditions in plates

Ø No effects measured at tested doses

Comparisons according to deposited doses

We observed significant pro-inflammatory responses in cultures exposed to lower deposited doses at the ALI compared to submerged exposures (Table 5). Moreover, in submerged conditions, we observed significant effects at lower doses in inserts compared with plates (Table 5). Nevertheless, *in vitro* effects were observed at extremely high doses (at least 100 fold higher) compared to realistic human exposure scenarios [23].

We determined the Lowest Observed Adverse Effect Levels (LOAELs) for significant pro-inflammatory levels. For TiO₂ NMs 105 and 101 we observed LOAELs at doses of 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ at the ALI, at 3 or 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in submerged conditions in inserts and at 10 or even 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in plates. After exposure to TiO₂ NM100 or CeO₂ NM212, we observed significant adverse effects at doses of 1 or 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ at the ALI, at doses of 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in submerged conditions in inserts but no effects after exposure in plates, even with the maximum concentration tested. Based on these results, we provided a ranking of the four NMs used in our study according to the LOAELs observed. Generally, the rankings were similar whatever the exposure method used. We observed significant adverse effects at lower doses with TiO₂ NMs 105 and 101, compared to TiO₂ NM100 and CeO₂ NM212. This was in agreement with both *in vitro* and *in vivo* literature observations. The mass based toxic effects observed depend on the NM primary particle size (surface area) [12]. Indeed, despite differences regarding their crystalline phases, TiO₂ NM105 (20% anatase, 80% rutile) and NM101 (100% anatase), with primary particle sizes of 21 and 8 nm respectively, were more toxic than NM100, which has a primary particle size of 100 nm. The observed toxic effects also depend on the NM chemical composition and surface properties [12]. We observed that CeO₂ NM212, with a primary

particle size of 29 nm, appeared as toxic as TiO₂ NM100, which has a primary particle size of 100 nm and less toxic than NM105, which has a similar primary particle size.

To understand why significant effects were observed at lower deposited doses at the ALI than in submerged conditions, we attempted to evaluate whether the cells cultivated at the ALI were more sensitive to xenobiotics in general than cells cultivated in submerged conditions. We compared the release of pro-inflammatory mediators in the co-culture model in insert at the ALI and in submerged conditions. We stimulated cells cultured at the ALI and in submerged conditions with a dose of 20 µg/mL of Lipopolysaccharide (LPS) in the basolateral compartment (Figure 10). The stimulation was effective and significant differences in cytokine levels were observed for all the cytokines tested, compared to non-stimulated controls. In ALI conditions we observed cytokine inductions only at the basolateral side, except for TNF-α (Figure 10a) and in submerged exposures we observed inductions both at the apical and basal sides (Figure 10a). Moreover, we observed significantly higher levels of pro-inflammatory mediators at the basolateral side but not at the apical side after stimulation at the ALI compared to submerged conditions (Figure 10a). This can be partly attributable to higher basal secretion at the basolateral side at the ALI. Indeed, when the data was normalized to non-stimulated cellular secretion, the increase of cytokine secretion at the ALI was less clear, compared to submerged exposure (Figure 10b). At the ALI, we dosed significantly more cytokines at the basolateral side for IL-1β and TNF-α, but significantly less for IL-6, compared to submerged conditions. On the contrary, in submerged conditions we dosed significantly more cytokines at the apical side compared to at the ALI. For IL-8, stimulation with LPS induced an unexpected significant drop in secretion compared to control (Figure 10a) with significantly less cytokines at the basolateral side and more at the apical side in ALI compared to submerged conditions (Figure 10b). In summary, there seemed to be opposite trends in the polarity of cytokine secretion between the exposure conditions, with more basolateral secretion at the ALI and more apical secretion in submerged conditions. Nevertheless, after taking into account the different cellular responses observed in the ALI and submerged conditions after exposure to LPS, we observed that the levels of induction were similar. We concluded, therefore, that there was no difference in sensitivity to xenobiotics that could explain the higher adverse effects observed in the cells at the ALI after exposure to NMs (Table 5).

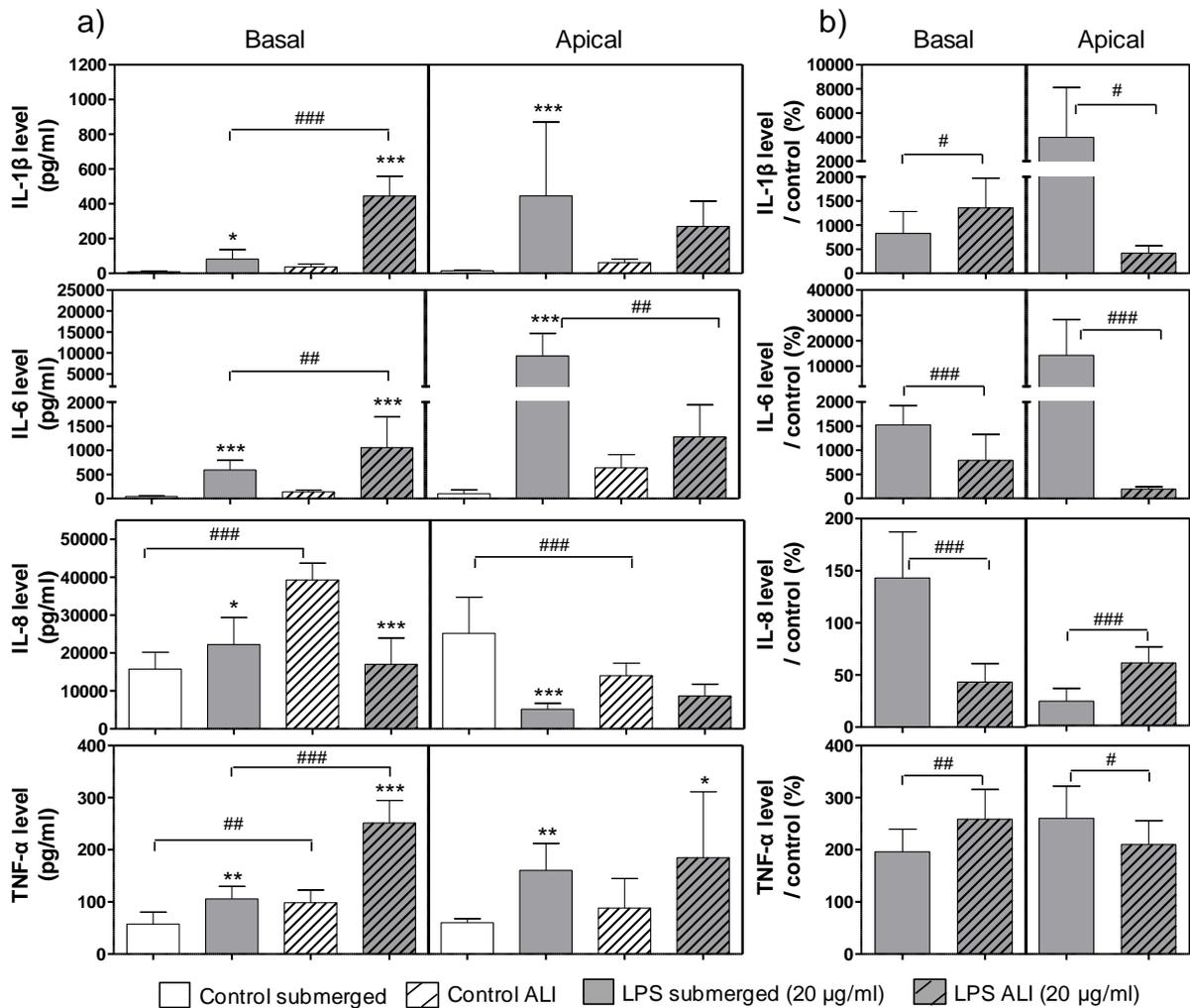


Figure 10. levels of pro-inflammatory mediators after stimulation with LPS (20 μ g/mL). Co-cultures were stimulated at the ALI or in submerged conditions in inserts with 20 μ g/ml of LPS at the basal side for 21h. Levels of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α were assessed in culture medium at basal side and in culture medium or washing liquid at the apical side for submerged and ALI exposures, respectively. The control for ALI exposures was cells exposed at the ALI to air for 3h in the exposure system and kept at the ALI for 21h with fresh medium in the incubator. The control for submerged exposure was cells kept in submerged condition with fresh medium for 21h. IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α secretions were measured by ELISA multiplex in the cell culture medium. Results were first expressed in concentrations (pg/mL), to assess whether cells secreted similar amounts of cytokines at the ALI and in submerged conditions in inserts, after stimulation (a). Because we observed more basal secretion at the ALI (secretion by non stimulated cells), the data was also expressed in cytokine levels compared to control (b), to compare ALI and submerged results more accurately. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. A two-way Anova followed by a Bonferroni post-hoc test were performed to compare treated groups to their respective controls (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001) or to compare ALI and submerged exposures (# p <0.05; ## p <0.01; ### p <0.001).

We also assessed whether the differences observed between the ALI and submerged conditions could be explained by differences in cell densities. In their study, Lenz et al. [63] observed a strong correlation between exposures at the ALI in inserts and submerged conditions in inserts and in plates, when expressing results in dose per cell units. We measured the number of cells in the inserts and in the plates during exposure to the NMs. We counted similar numbers of cells at the ALI (599 000 cells/cm²) and in submerged conditions (608 000 cells/cm²) in inserts, and fewer cells in submerged conditions in plates (226 000 cells/cm²). Thus, by expressing results in doses per cell, the differences observed in LOAELs remained similar between conditions in inserts. Moreover, lower cell densities in submerged conditions in plates conferred higher LOAELs when expressing the results in doses per cell instead of doses per surface thus increasing the differences observed between the ALI and classical submerged conditions. In our study, cells were exposed to NMs and not to soluble chemicals (Bortezomib), as was the case in the Lenz et al. study, which may explain why we did not observe a correlation of the results between the ALI and submerged conditions by normalizing the LOAELs to the number of cells exposed. Indeed, poorly soluble NMs are toxic through surface reactivity [64]. Moreover, in contrast to chemicals which are highly soluble, the doses of poorly soluble NMs are heterogeneously distributed on cells, especially in the complex co-culture model presenting an uneven surface. For this reason we thought that expressing the doses in µg/cm² rather than in µg/cells may be better to describe our results. Nevertheless, further investigations are still needed to assess if µg/cm² is a better dose metric for poorly soluble NMs.

To conclude, the lower LOAELs observed in the ALI conditions were not due to higher basolateral cytokine secretion by the cells or because of different cell numbers. The differences were unlikely caused by NM-cytokine interactions in the submerged conditions, as the cytokines were dosed separately in the apical and basolateral sides to limit this bias (for exposure in inserts only). For these reasons, we hypothesized that the differences may have been due to a higher sensitivity of the cells to the NMs or at least to particles at the ALI. However, it was not possible to conclude this with certainty. Indeed, we could not totally exclude that uncertainties regarding the measurements of the deposited doses on cells, especially in submerged conditions where no direct dosage was performed, could explain the differences in LOAELs, of at least a 3 fold order of magnitude, observed between ALI and submerged exposure in inserts. Thus, more accurate dosimetry should be considered in the future to provide better comparisons.

After exposure to NMs, direct comparisons between ALI and submerged results have been performed in other studies, leading to different conclusions. As was observed in our study, Lenz et al. observed effects at lower doses when cells were exposed to ZnO NPs at the ALI [51]. Using ZnO NM, Xie et al. observed toxic effects at “doses that are in the same order of magnitude” [39]. Using SiO₂-50 and Ag NM respectively, Panas et al. [38] and Herzog et al. [52] concluded that the nanoparticles were less toxic when deposited at the ALI. In these studies, different NMs were used, which could explain the discrepancy between the conclusions. For example, some NMs have the ability to release ions in suspension [65] and it was shown that both ions and particles are able to cause toxic effects on cells [66]. Thus in some cases, the differences in toxic effects observed between ALI and submerged exposures can be attributed to an increase in the proportion of ions released in the submerged conditions [52]. Differences in cellular models, methodologies used to expose the cells to aerosols or suspensions and in methods employed to characterize the NM deposition on the cells are additional factors that could also explain the different conclusions.

Xie et al. [39] used the same method to prepare the NM suspensions to generate aerosol and submerged exposures. In this study, FBS was added to the suspension, which could induce the formation of a medium specific corona at the ALI. This might explain why they observed similar effects between the ALI and submerged exposures. To improve the deposited dose in their system, Panas et al. [38] raised the aerosol flow rate to 100 mL/min at the cellular level. As an increase of the flow rate can lead to a decrease in cell viability, they added 100 µL of PBS on the cell surface, which can lead to a decrease in the cell surface directly exposed at the ALI. Moreover in some studies, the real mass deposited on the cells after exposure to suspensions was reached after 24h of exposure, which can create uncertainties towards the conclusions.

In conclusion, while there is a general trend towards higher sensitivity of ALI as compared to submerged exposure conditions, relatively large uncertainties in the dose estimates for submerged conditions (due to uncertainties in volume median diameter and effective density) render this result uncertain. More advanced dosimetry methods as currently available are required to resolve this issue with certainty.

Importance of the dose rate

In our study, the final deposited doses were reached either within 3h in the inserts, in ALI and submerged conditions or within 24h in the plates. We observed significant effects at lower doses in the inserts than in the plates, in the submerged conditions (Table 5). Thus, as shown

recently *in vivo* [67], it also seems important to consider the dose delivery rate when assessing NM toxicity *in vitro*.

Conclusions

The deposition of NMs on cells via aerosol exposure was validated in our system. We showed that the maximum deposited doses achieved were of about 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for a 3h-exposure at the ALI. These doses were low compared to those reached in submerged exposures, but were sufficient to observe biological adverse effects (inflammation, cytotoxicity and oxidative stress) 24h after exposure. Thus, we hypothesize that our model can be used to assess the toxicity of other metallic and insoluble NMs. Furthermore, biological adverse effects were observed in A549 + THP-1 co-cultures but not in A549 monocultures, indicating a higher sensitivity of the coculture model. This underlines the importance of the cellular model used and offers the possibility to deal with low deposition doses by using more sensitive and physiologic cellular models.

To compare the ALI results to those obtained in classic submerged experiments, we exposed the co-culture models to suspensions of NMs and assessed for biological adverse effects (inflammation, cytotoxicity and oxidative stress). Based on the quantified or estimated deposited doses on the cells, we performed direct comparisons of the results between the different exposure methods used. We observed adverse effects at lower deposited doses after exposure at the ALI to aerosols of NMs than in submerged conditions to suspensions of NMs. Furthermore, comparing submerged exposures in inserts and plates at the same dose of NMs, we showed that the biological effects observed were dependent on the timing of the dose delivery. We provided a ranking of the NMs according to the biological adverse effects observed and these were ranked similarly whatever the exposure method used. Thus, despite the differences in levels of biological adverse effects observed, we showed that the two *in vitro* methods provided reliable results in the assessment of potential biological adverse effects and the ranking of poorly soluble and metallic NMs. Future studies should examine more precisely why biological effects were observed at lower deposited dose at the ALI in our study. Studies with accurate dosimetry are still necessary to confirm if differences in sensitivity exist when cells are exposed at the ALI to poorly soluble NMs. It would be also interesting to determine the influence of surfactant and to assess the importance of the corona surrounding NMs, both at the ALI and in submerged conditions.

Methods

Nanomaterials

The nano-TiO₂ NM105 (AEROXIDE[®] TiO₂ P25) was obtained from Evonik Industries. The nanos TiO₂ NM100 and NM101 and nano-CeO₂ NM212 were obtained from the Joint research council (JRC). The TiO₂ and CeO₂ physicochemical properties (Table 1) were well characterized by the Joint research council (JRC) [68, 69]. The endotoxin levels of the NMs were tested by partners of the European project NANoREG. They were below the limit of detection (data not shown).

Cell cultures

The human type II alveolar epithelial cell line A549 and the human alveolar monocyte cell line THP-1 were obtained from our partners of the NANoREG project (from BAUA and GAIKER, respectively). Both cell lines were cultivated in RPMI 1640 medium (Gibco, 61870), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, 15070) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15070) (culture medium) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ (Sanyo-18AIC). A549 and THP-1 cells were seeded in 75 cm² tissue culture flasks (Falcon, 353136), with 700 000 A549 cells/flask and 3 000 000 THP-1 cells/flask. At 90% confluency, A549 cells were trypsinized (Gibco, 25300), and seeded into 24-well plates (Falcon, 353047) with 50 000 cells/well, (0.5 mL of culture medium/well) for submerged exposures in plates or seeded in 6 well plates inserts (4.67 cm² of diameter, 0.4 μm pore size, Costar, 3450) with 80 000 cells/insert (1 mL of culture medium at the apical side and 2 mL at the basal side/insert) for aerosol exposures and submerged exposures in inserts. For the co-cultures, THP-1 cells were differentiated into mature macrophage-like cells in culture flasks with 300 ng/mL of Phorbol Myristate Acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, P1585) for 24h and seeded on the A549 cells 24h before exposure, at a ratio of one THP-1 cell to ten A549 cells. To calculate the number of A549 cells at the exposure time, cells were grown for five days in dedicated inserts (at the ALI and in submerged conditions) or for 72h in plates, were trypsinized and then counted. To trypsinize cells in inserts, trypsin was added at the apical and basal side to promote cell detachment.

Exposure at the ALI to aerosols

For monoculture exposures, A549 cells were grown for 96h until confluence. The culture medium at the apical side of the cells was then retrieved to adapt the cells to the ALI for 20h before exposure. For co-culture exposures, A549 cells were grown for 96h until confluence. In the meantime, THP-1 cells were differentiated into mature macrophage-like cells. One day prior exposure, the differentiated THP-1 cells were washed, trypsinized (Gibco, 25200), centrifuged and seeded on the A549 cells with a ratio of one THP-1 cell for ten A549 cells. Four hours after seeding, the culture medium at the apical side of the cells was removed to adapt the co-cultures to the ALI for 20h before exposure. Five days after A549 seeding, both cell models were exposed for 3h at the ALI. Just after exposure cells were placed in new plates (Costar, 3516) with fresh culture medium containing 10% FBS at the basal side and kept at the ALI for 21h in the incubator. At every step, the condition of the cells was checked carefully by optical microscopy.

Aerosol exposure system

A system using VitroCell[®] devices was set up to expose mono or co-cultures to aerosols of NMs (Figure 2). The system was composed of two chambers (VitroCell[®], 6/4 and 6/3 CF Stainless cultivation base modules) in which cells seeded in inserts were exposed at the ALI to aerosols of NMs or to filtered air. The NM exposure chamber contained 4 wells. Three wells were dedicated to expose cells grown in inserts to aerosols of NMs, and one to assess the real-time deposition of the NMs on a Quartz Cristal Microbalance (QCM) (VitroCell[®]). The QCM was used to check if the system was running properly and to quantify the NM deposition on the inserts. The air exposure chamber contained three wells in which cells grown in inserts were exposed to filtered air containing 90% humidity. Culture medium supplemented with 25 mM HEPES (Gibco, 156030-056) was individually supplied to each basolateral compartment of the inserts to maintain the cells at the ALI during exposure. The chambers were connected to a water bath to maintain the cells at 37°C.

To generate the aerosols, suspensions of 1, 5 and 10 g/L of NM were prepared in Milli-Q water, and sonicated for 5 min in an ultrasonic bath (Bioblock, Leo-80). A nebulizer (Palas, AGK 2000) supplied with filtered air (Norgren, SPGB/BMR/28262) was used at a flow rate of 5 L/min, to aerosolize the suspension. A dryer composed of silica gel (Roth, P077) was used to prevent condensation into the system, maintaining the relative humidity above 90%. To expose the cells, a vacuum pump (KnF, N840FT-18) and flow calibration valve

(VitroCell[®]) were used to suck TiO₂ and CeO₂ aerosols or air into the VitroCell[®] chambers at a 5 mL/min flow rate.

Characterization of aerosols and NM deposition on cells

Mass concentrations of the NMs 105, 100, 101 and 212 in the aerosols were measured by a gravimetric method. Briefly, quartz microfiber filters (Whatman, 1851-037) were dried for 24h in a desiccator and weighed before exposure. Samplings of the aerosols were performed in triplicates at 4 L/min for at least 10 min using a sampling pump (Casella, Apex personal air sampler). After exposure, the filters were dried for 24h and weighed. The mass concentration was calculated according to the mass of NM weighed and the sampling volume. A Scanning Mobility Particle Sizer SMPS, (Differential Mobility Analyser (DMA) (Grimm, L-DMA 5400) with Condensation Particle Counter (CPC) (Grimm, 5.416) and X-Ray neutralizer (TSI, 3087), and an optic counter (OPC) (Grimm, 1.109) were used to measure the size distribution of the particles in the aerosol. Particles ranging from 10 nm to 30 µm of diameter were measured. According to the number size distribution measurements, the GMDs of the aerosols (equivalent to count median diameters) were calculated. VMDs were also calculated assuming perfect spherical geometry of the NMs in the aerosol for the conversion from number size distributions to volume size distributions. This assumption was made based on the observations of spherical NM agglomerates deposited at the apical side of the inserts (Figure 3b). The effective densities of the aerosols were then calculated by dividing the aerosol concentration, measured by gravimetry, by the total aerosol volume concentration, calculated by SMPS and OPC.

The deposition of the NMs on the cells after 3h of exposure was also characterized. QCM and ICP-MS measurements were performed to measure the mass of NMs deposited on cells. For ICP-MS analysis, A549 cells at confluence were exposed for 3h to aerosols of NMs. At the end of the exposure period, the insert membranes were directly cut with a scalpel and kept in tubes (Dutsher, 030402) at -20°C before analysis. Samples were mineralized to perform the analysis. According to the deposited masses measured, the deposition efficiencies on the cells were calculated. To do this, the theoretical deposited masses were calculated assuming 100% of deposition on the cells, by dividing the mass concentration of the aerosols by the aerosol volume passing through the exposure chambers within 3h. The deposition efficiencies were calculated for each NM and concentration used by dividing the mass measured (by QCM or ICP-MS) by the theoretical deposited mass. Transmission Electron Microscopy (TEM) grids (Agar scientific, Quantifoil S143-3) were used to assess the shapes, sizes, and distributions of

the NMs deposited. TEM grids were deposited on the apical side of the inserts, exposed for 3h to aerosols of NMs and then analyzed by TEM.

Submerged exposure to NM suspensions

To expose co-cultures to suspensions, THP-1 cells were first differentiated into mature macrophage-like cells with 300 ng/mL of PMA in culture flasks for 24h. Differentiated THP-1 cells were trypsinized, washed, centrifuged and seeded on A549 cells 20h before exposure, to achieve a ratio of ten A549 cells to one THP-1 cell. In inserts, five days after A549 seeding, the co-cultures were exposed at the apical side to NM suspensions in culture medium containing 10% FBS with concentrations ranging from 23 to 545 $\mu\text{g/mL}$ depending on the NMs used, to achieve deposited doses of 1, 3 and 10 $\mu\text{g/cm}^2$ after 3h of exposure (Table 4). After 3h of exposure, the apical NM suspensions and the basal medium were removed carefully, to ensure that all the particles deposited remained on the cell surface and were replaced by fresh culture medium containing 10% FBS. Cells were kept for the remaining 21h in the incubator with NMs deposited on their surface. In plates, 72h after A549 seeding, cells were exposed for 24h to suspensions of NMs in culture medium containing 10% FBS, with concentrations ranging from 4 $\mu\text{g/mL}$ to 200 $\mu\text{g/mL}$ (equivalent to about 1 $\mu\text{g/cm}^2$ to 20 $\mu\text{g/cm}^2$ deposition, depending on the deposition ratio calculated) (Table 4).

Characterization of suspensions and NM deposition on cells

Stock suspensions of NMs were prepared in Milli-Q water at 2.56 mg/mL. Suspensions were dispersed with a sonicator equipped with a cup horn (QSONICA, Q700), at maximum amplitude, at a frequency of 2 times 1 min with a pause of 1 min between. The cup horn indicated the total energy delivered to the volume of water in the cup (1L) and to the sample (40 000 J). We also estimated the energy delivered to the sample experimentally (97 J), as described in the supplementary data. To expose the cells, sonicated suspensions were first diluted in culture medium and successive dilutions were performed to achieve the desired concentrations. For each NM, DLS measurements were performed (Malvern, Zetasizer Nano S) on stock and 0.4 mg/mL suspensions to measure the hydrodynamic diameter and assess the size distribution of the particles in suspension. The effective densities of each NM were measured in suspension according to the VCM method developed by Deloid and coworkers [56].

The ISDD model [30] was used to estimate the deposited fraction on cells after 3h of exposure in inserts or 24h of exposure in plates. The primary particle diameters, the primary

densities of the powders, the hydrodynamic diameters, the effective densities of the NMs measured in suspensions, the height (0.214 cm for inserts, 0.25 cm for plates), the temperature (37 °C), the density (1.00 g/mL), the viscosity (0.00074 Pa.s) and the nominal NM concentrations (4 to 547 µg/mL) of the medium were used as input parameters. For results interpretation, nominal NM concentrations expressed in µg/cm² were adjusted according to the estimated deposited fraction.

Alamar blue[®] assay (cell functionality)

After 24h of exposure to NMs, an Alamar blue[®] assay was performed to measure the metabolic activity of the cells exposed to aerosols or suspensions. The culture medium was retrieved and the cells were washed with HBSS (Gibco, 140025). Some washing liquids (1 mL/sample) from aerosol exposures were also kept for analysis. Cells were then incubated at 37°C, in 5% CO₂ for 1h submerged with 0.5 mL (in plates) or 1 mL (in inserts) of Alamar blue[®] solution (Invitrogen, prestoblue A13261) diluted to 10% in culture medium. After 1h of incubation, 100 µl of metabolized Alamar blue[®] was transferred in a 96 well plate (Falcon, 353072) and the fluorescence was read (excitation: 555 nm, emission: 585 nm) using a spectrophotometer (TECAN, infinite 2000). The values of each sample were expressed in percentage of cell functionality compared to control. Cells exposed to clean air at the ALI served as controls for the aerosol exposures; cells exposed to culture medium served as controls for suspension exposures.

LDH assay (cell integrity)

LDH releases in apical or basal sides were measured in culture media retrieved after 24h of exposure to suspensions and aerosols and kept at 4°C until analysis. Culture media, retrieved at the apical sides, were centrifuged for 5 min at 13 000 G and 4°C to remove the NMs. A commercially available kit (Promega, CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity assay) was used according to the supplier manual. The fluorescence was measured (excitation: 550 nm, emission: 585 nm) using a spectrophotometer (TECAN infinite 2000). The values of each sample were expressed in function of the maximum LDH release by cells, in percentage of cell integrity compared to control. To measure the maximum LDH release, cells were lysed for 24h using a 0,1X solution of triton (Sigma-Aldrich, T8787). For exposure to suspensions in inserts, results from the apical and basal sides were pooled to evaluate the cell integrity.

Dichlorofluorescein (DCF) assay (Intracellular ROS)

After performing Alamar blue[®] assays, the cells were washed with PBS (Gibco, 10270). Afterwards, the cells were incubated at 37°C, in 5% CO₂ with 10 µM of a 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) probe (Life technologies, C6827) in PBS (0.5 mL/well or insert) for 35 min. After 30 min of incubation, the probe was removed in some wells, 1 mM of H₂O₂ in PBS was added and the cells were incubated for 5 min to serve as positive controls. After incubation, the cells were washed with PBS and incubated for 5 min in 90% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, D2438) in PBS (0.5 mL/well or insert). Then the cells were scraped using a scraper (TPP, 99002), the well or inserts contents were recovered in tubes (Eppendorf, 3810X) and the tubes were centrifuged at 10 000 G, at 4°C, for 5 min to eliminate dead cells and remove remnants particles. The tube contents were transferred into black 96 well plates (150 µL/well) (Greiner Bio-one, 655076) and the fluorescence of the samples was read (excitation: 488 nm, emission: 530 nm) using a spectrophotometer (TECAN, infinite 2000). The values of each sample were expressed in percentage of intracellular ROS compared to their respective control.

Cytokine and chemokine quantification by ELISA

Pro-inflammatory mediator levels were measured in culture media or washing liquids retrieved after 24h of exposure from aerosol and submerged exposures and kept at -80°C until analysis. Before freezing, culture media and washing liquids were retrieved from the apical side of submerged and aerosol exposures and centrifuged for 5 min at 13 000 G at 4°C to remove the nanoparticles. Il-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α release was measured using a commercially available ELISA multiplex kit (Mesoscale discovery, K15025B) and a multiplex reader (Mesoscale discovery, Sector Imager 24000), according to the supplier recommendations. The values of each sample were expressed in percentage of cytokine levels compared to the respective control. Cells stimulated for 21h to a concentration of 20 µg/mL of LPS (Sigma-Aldrich, L2880) (at the basal side for exposures in inserts), were used as positive control.

Interactions between the NMs and the LDH assay

Potential interactions between LDH and NMs were assessed. 96 well plates (Falcon, 353072) were incubated under cell-free conditions for 24h with suspensions of 0, 100, 400 µg/mL of TiO₂ and CeO₂ in presence of 0,275 UI/mL of LDH standard (Roche, 10127876001). After

24h of incubation, supernatants were retrieved, centrifuged for 5 min at 13 000 G at 4°C to remove the nanoparticles and the LDH assay was performed.

Interactions between the NMs and the cytokines

Potential interactions between NMs in suspension and the cytokines were studied. For suspension exposures, 96 well plates (Falcon, 353072) were incubated under cell-free conditions for 24h with suspensions of 0, 100, 400 µg/mL of TiO₂ and CeO₂ in presence of 1250 pg/mL of IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α. After 24h of incubation, the supernatants were retrieved and centrifuged for 5 min at 13 000 G at 4°C to remove the nanoparticles. IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α were measured by ELISA multiplex (Mesoscale discovery, K15025B) in the supernatants.

Statistical analysis

All the data was expressed as mean ± standard deviation (SD) from three independent experiments performed in triplicates. The statistical analysis was performed using Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Shapiro-wilk's and Bartlett's tests were used to assess the data normality and the variance equality, respectively. Because variances weren't equal, results were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test to compare the different treated groups to the controls. Cells exposed to air at the ALI served as control for aerosol exposures. Cells exposed to culture medium served as control for suspension exposures. For alamar blue and LDH assays, values from cells exposed to NMs or control and from cells kept in the incubator (for ALI exposure only) were included in the statistical analysis. For the DCF assay, values from the cells exposed to NMs or to control air and from cells exposed to 1 mmol H₂O₂ were included in the statistical analysis. For ELISA assays, values from cells exposed to NMs or control and from cells stimulated with 20 µg/mL of LPS were included in statistical analysis. To assess the level of pro-inflammatory mediators at the ALI and in submerged conditions after stimulation with LPS, a two-way Anova followed by Bonferroni post-hoc test was performed to compare treated groups to controls or to compare ALI and submerged exposure. In all the analysis, p-values < 0.05 were considered significant.

Abbreviations

ALI, Air-Liquid Interface; DLS, Dynamic Light Scattering; DMSO, Dimethyl Sulfoxide; FBS, Fetal Bovine Serum; ICP-MS, Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry; ISDD, *in vitro* Sedimentation Diffusion and Dosimetry; LDH, Lactate Deshydrogenase; LPS, Lipopolysaccharides; NM(s), Nanomaterial(s); OPC, Optic Counter; PMA, Phorbol Myristate Acetate; QCM, Quartz Cristal Microbalances; ROS, Reactive Oxygen Species; SD, Standard Deviation; SMPS, Scanning Mobility Particle Sizer; TEM, Transmission Electron Microscopy; VCM, Volumetric Centrifugation Method.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article (and its additional files).

Competing interests

The authors report no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the French ministry of environment (“Programme 190”) and by the EU-FP7 (NANoREG project).

Authors' contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors gave approval to the final version of the manuscript. TL was involved in the conception, design, performance of the experiments, analysis and interpretation of the data and wrote the manuscript. EP helped to set up the aerosol exposure system and in deposition characterization experiments.

MD performed several *in vitro* exposures to suspensions. CB and OAC performed the TEM analysis. OLB and TA helped in the interpretation of the aerosol characterization data.

BT, AB, CE were involved in the writing and the revisions. GL was involved in the conception, design, writing and the revisions.

Acknowledgements

We thank Dominique Lison (Université catholique de Louvain) and Sophie Lanone (INSERM) for their advice regarding the manuscript conception. We thank our NANoREG partners BAuA and GAIKER, for providing the A549 and THP-1 cells respectively. We thank Camille Rey for the critical revision and the language corrections.

References (1st article)

1. Nowack B, Ranville JF, Diamond S, Gallego-Urrea JA, Metcalfe C, Rose J, et al. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environ Toxicol Chem.* 2012;31(1):50-9. doi: 10.1002/etc.726.
2. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):823-39.
3. Yokel RA, Macphail RC. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *J Occup Med Toxicol.* 2011;6:7. doi: 10.1186/1745-6673-6-7.
4. Johnston H, Pojana G, Zuin S, Jacobsen NR, Moller P, Loft S, et al. Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: potential solutions to current and future challenges. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(1):1-20. doi: 10.3109/10408444.2012.738187.
5. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res.* 2012;14(9). doi: Artn 1109
10.1007/S11051-012-1109-9.
6. Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol.* 2012;24(2):125-35. doi: 10.3109/08958378.2010.642021.
7. Holden PA, Klaessig F, Turco RF, Priester JH, Rico CM, Avila-Arias H, et al. Evaluation of exposure concentrations used in assessing manufactured nanomaterial environmental hazards: are they relevant? *Environ Sci Technol.* 2014;48(18):10541-51. doi: 10.1021/es502440s.
8. Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(4):1376-83.
9. Frohlich E, Salar-Behzadi S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* studies. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):4795-822. doi: 10.3390/ijms15034795.
10. Clift MJ, Gehr P, Rothen-Rutishauser B. Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not *in vitro* testing is a valid alternative. *Arch Toxicol.* 2011;85(7):723-31. doi: 10.1007/s00204-010-0560-6.

11. Oomen AG, Bos PM, Fernandes TF, Hund-Rinke K, Boraschi D, Byrne HJ, et al. Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment--report of the NanoSafety Cluster Working Group 10. *Nanotoxicology*. 2014;8(3):334-48. doi: 10.3109/17435390.2013.802387.
12. Landsiedel R, Sauer UG, Ma-Hock L, Schnekenburger J, Wiemann M. Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(16):2557-85. doi: 10.2217/nnm.14.149.
13. Nel A, Xia T, Meng H, Wang X, Lin S, Ji Z, et al. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc Chem Res*. 2013;46(3):607-21. doi: 10.1021/ar300022h.
14. Londahl J, Moller W, Pagels JH, Kreyling WG, Swietlicki E, Schmid O. Measurement techniques for respiratory tract deposition of airborne nanoparticles: a critical review. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2014;27(4):229-54. doi: 10.1089/jamp.2013.1044.
15. Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. Part *Fibre Toxicol*. 2010;7:2. doi: 10.1186/1743-8977-7-2.
16. Gehr P, Schurch S, Berthiaume Y, ImHof V, Geiser M. Particle retention in airways by surfactant. *J Aerosol Med*. 1990. 3;27-43.
17. Donnelly LE. Airway Epithelial Cells (Primaries vs Cell Lines). *Methods Mol Med*. 2001;56:127-36. doi: 10.1385/1-59259-151-5:127.
18. Choi HS, Ashitate Y, Lee JH, Kim SH, Matsui A, Insin N, et al. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol*. 2010;28(12):1300-3. doi: 10.1038/nbt.1696.
19. Elder A, Vidyasagar S, DeLouise L. Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009;1(4):434-50. doi: 10.1002/wnan.44.
20. Boland S, Hussain S, Baeza-Squiban A. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2014;6(6):641-52. doi: 10.1002/wnan.1302.
21. Stone V, Johnston H, Schins RP. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol*. 2009;39(7):613-26. doi: 10.1080/10408440903120975.
22. Joris F, Manshian BB, Peynshaert K, De Smedt SC, Braeckmans K, Soenen SJ. Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. *Chem Soc Rev*. 2013;42(21):8339-59. doi: 10.1039/c3cs60145e.
23. Paur HR, Cassee FR, Teeguarden J, Fissan H, Diabate S, Aufderheide M, et al. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung-A dialog between aerosol science and biology. *J Aerosol Sci*. 2011;42(10):668-92.
24. Schrurs F, Lison D. Focusing the research efforts. *Nat Nanotechnol*. 2012;7(9):546-8. doi: 10.1038/nnano.2012.148.
25. Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA, Aberg C. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J Am Chem Soc*. 2013;135(4):1438-44. doi: 10.1021/ja309812z.
26. Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, et al. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2011;133(8):2525-34. doi: 10.1021/ja107583h.
27. Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggard T, Flanagan MB, Lynch I, et al. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*. 2011;5(9):7503-9. doi: 10.1021/nn202458g.

28. Cohen J, Deloid G, Pyrgiotakis G, Demokritou P. Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry. *Nanotoxicology*. 2013;7(4):417-31. doi: 10.3109/17435390.2012.666576.
29. Cohen JM, Teeguarden JG, Demokritou P. An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11:20. doi: 10.1186/1743-8977-11-20.
30. Hinderliter PM, Minard KR, Orr G, Chrisler WB, Thrall BD, Pounds JG, et al. ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7(1):36. doi: 10.1186/1743-8977-7-36.
31. Klein SG, Hennen J, Serchi T, Blomeke B, Gutleb AC. Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(8):1516-34. doi: 10.1016/j.tiv.2011.09.006.
32. Berube K, Aufderheide M, Breheny D, Clothier R, Combes R, Duffin R, et al. In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Altern Lab Anim*. 2009;37(1):89-141.
33. Bakand S, Hayes A. Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010;61(2):76-85. doi: 10.1016/j.vascn.2010.01.010.
34. Jeannot N, Fierz M, Kalberer M, Burtscher H, Geiser M. Nano aerosol chamber for in-vitro toxicity (NACIVT) studies. *Nanotoxicology*. 2015;9(1):34-42. doi: 10.3109/17435390.2014.886739.
35. Brossell D, Troller S, Dziurawicz N, Plitzko S, Linsel G, Asbach C, et al. A thermal precipitator for the deposition of airborne nanoparticles onto living cells-Rationale and development. *J Aerosol Sci*. 2013;63:75-86.
36. Kim JS, Peters TM, O'Shaughnessy PT, Adamcakova-Dodd A, Thorne PS. Validation of an in vitro exposure system for toxicity assessment of air-delivered nanomaterials. *Toxicol In Vitro*. 2013;27(1):164-73.
37. Comouth A, Saathoff H, Naumann KH, Muelhopt S, Paur HR, Leisner T. Modelling and measurement of particle deposition for cell exposure at the air-liquid interface. *J Aerosol Sci*. 2013;63:103-14.
38. Panas A, Comouth A, Saathoff H, Leisner T, Al-Rawi M, Simon M, et al. Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2014;5:1590-602.
39. Xie YM, Williams NG, Tolic A, Chrisler WB, Teeguarden JG, Maddux BLS, et al. Aerosolized ZnO Nanoparticles Induce Toxicity in Alveolar Type II Epithelial Cells at the Air-Liquid Interface. *Toxicol Sci*. 2012;125(2):450-61.
40. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:15. doi: 10.1186/1743-8977-10-15.
41. Cosnier F BS, Grossmann S, Nunge H, Brochard C, Viton S, Payet R, Witschger O, Gaté L. Design and Characterization of an Inhalation System to Expose Rodents to Nanoaerosols. *Aerosol and Air Quality Research*. 2016. doi: 10.4209/aaqr.2016.01.0034.
42. Bitterle E, Karg E, Schroepfel A, Kreyling WG, Tippe A, Ferron GA, et al. Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere*. 2006;65(10):1784-90.
43. Elihn K, Cronholm P, Karlsson HL, Midander K, Wallinder IO, Moller L. Cellular Dose of Partly Soluble Cu Particle Aerosols at the Air-Liquid Interface Using an In Vitro Lung Cell Exposure System. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2013;26(2):84-93.

44. Klein SG, Serchi T, Hoffmann L, Blomeke B, Gutleb AC. An improved 3D tetraculture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10.
45. Blank F, Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Gehr P. An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *Journal of Aerosol Medicine-Deposition Clearance and Effects in the Lung.* 2006;19(3):392-405.
46. Lehnert BE. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. *Environ Health Perspect.* 1992;97:17-46.
47. Bowden DH. The alveolar macrophage. *Environ Health Perspect.* 1984;55:327-41.
48. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis.* 1982;126(2):332-7. doi: 10.1164/arrd.1982.126.2.332.
49. Rach J, Budde J, Mohle N, Aufderheide M. Direct exposure at the air-liquid interface: evaluation of an in vitro approach for simulating inhalation of airborne substances. *J Appl Toxicol.* 2014;34(5):506-15. doi: 10.1002/jat.2899.
50. Steinritz D, Mohle N, Pohl C, Papritz M, Stenger B, Schmidt A, et al. Use of the Cultex (R) Radial Flow System as an in vitro exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility. *Chem-Biol Interact.* 2013;206(3):479-90. doi: 10.1016/j.cbi.2013.05.001.
51. Lenz AG, Karg E, Brendel E, Hinze-Heyn H, Maier KL, Eickelberg O, et al. Inflammatory and Oxidative Stress Responses of an Alveolar Epithelial Cell Line to Airborne Zinc Oxide Nanoparticles at the Air-Liquid Interface: A Comparison with Conventional, Submerged Cell-Culture Conditions. *Biomed Research International.* 2013.
52. Herzog F, Loza K, Balog S, Clift MJD, Epple M, Gehr P, et al. Mimicking exposures to acute and lifetime concentrations of inhaled silver nanoparticles by two different in vitro approaches. *Beilstein Journal of Nanotechnology.* 2014;5:1357-70.
53. Wottrich R, Diabate S, Krug HF. Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int J Hyg Environ Health.* 2004;207(4):353-61. doi: Doi 10.1078/1438-4639-00300.
54. Napierska D, Thomassen LC, Vanaudenaerde B, Luyts K, Lison D, Martens JA, et al. Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles: the role of size and surface area. *Toxicol Lett.* 2012;211(2):98-104. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.03.002.
55. Rothen-Rutishauser B, Blank F, Muhlfeld C, Gehr P. In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(8):1075-89. doi: 10.1517/17425250802233638.
56. DeLoid G, Cohen JM, Darrah T, Derk R, Rojanasakul L, Pyrgiotakis G, et al. Estimating the effective density of engineered nanomaterials for in vitro dosimetry. *Nat Commun.* 2014;5:3514. doi: 10.1038/ncomms4514.
57. DeLoid GM, Cohen JM, Pyrgiotakis G, Pirela SV, Pal A, Liu JY, et al. Advanced computational modeling for in vitro nanomaterial dosimetry. *Part Fibre Toxicol.* 2015;12. doi: ARTN 32
10.1186/s12989-015-0109-1.
58. Guadagnini R, Halamoda Kenzaoui B, Walker L, Pojana G, Magdolenova Z, Bilanicova D, et al. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology.* 2015;9 Suppl 1:13-24. doi: 10.3109/17435390.2013.829590.
59. Dekali S, Divetain A, Kortulewski T, Vanbaelinghem J, Gamez C, Rogerieux F, et al. Cell cooperation and role of the P2X(7) receptor in pulmonary inflammation induced by nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2013;7(8):1302-14. doi: 10.3109/17435390.2012.735269.

60. 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 1:115-22. doi: 10.1080/08958370902942533.
61. Kroll A, Dierker C, Rommel C, Hahn D, Wohlleben W, Schulze-Isfort C, et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part Fibre Toxicol.* 2011;8:9. doi: 10.1186/1743-8977-8-9.
62. Demokritou P, Gass S, Pyrgiotakis G, Cohen JM, Goldsmith W, McKinney W, et al. An in vivo and in vitro toxicological characterisation of realistic nanoscale CeO₂ inhalation exposures. *Nanotoxicology.* 2013;7(8):1338-50. doi: 10.3109/17435390.2012.739665.
63. Lenz AG, Stoeger T, Cei D, Schmidmeir M, Semren N, Burgstaller G, et al. Efficient Bioactive Delivery of Aerosolized Drugs to Human Pulmonary Epithelial Cells Cultured in Air-Liquid Interface Conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;51(4):526-35. doi: 10.1165/rcmb.2013-0479OC.
64. Duffin R, Tran L, Brown D, Stone V, Donaldson K. Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: Highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhalation Toxicol.* 2007;19(10):849-56. doi: 10.1080/08958370701479323.
65. Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11.
66. Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H. Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett.* 2012;208(3):286-92. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.11.002.
67. Baisch BL, Corson NM, Wade-Mercer P, Gelein R, Kennell AJ, Oberdorster G, et al. Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11. doi: Artn 5 10.1186/1743-8977-11-5.
68. Rasmussen K MJ, De Temmerman P-J, Verleysen E, Waegeneers N, Van Steen F, et al. Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: characterisation and physico-chemical properties. EUR - scientific and technical research reports Luxembourg: JRC and IHCP, EUR 26637 EN Contract No: JRC 86291 2014. 2014.
69. Singh C FS, Ceccone G, Gibson N, Jensen KA, Levin M, Infante HG., Carlander D, Rasmussen K. Cerium dioxide, NM-211, NM-212, NM-213: characterisation and test item preparation. EUR - scientific and technical research reports Luxembourg: JRC and ICHP, EUR 26649 EN Contract No: JRC89825. 2014.

Additional files not included in the main document

Estimation of the energy delivered to the NM suspensions using a sonicator equipped with a cup horn. (Annexe 1)

Tables of results (Annexe 2)

Table S1. Alamar blue results expressed in percentage of functionality compared to control.

Table S2. LDH results expressed in percentage of integrity compared to control.

Table S3. DCF results expressed in percentage of intracellular ROS compared to control.

Table S4. IL-1 β results expressed in percentage compared to control.

Table S5. IL-6 results expressed in percentage compared to control.

Table S6. IL-8 results expressed in percentage compared to control.

Table S7. TNF- α results expressed in percentage compared to control.

Table S8. IL-1 β levels at the basal and apical sides after stimulation with LPS (20 μ g/mL).

Table S9. IL-6 levels at the basal and apical sides after stimulation with LPS (20 μ g/mL).

Table S10. IL-8 levels at the basal and apical sides after stimulation with LPS (20 μ g/mL).

Table S11. TNF- α levels at the basal and apical sides after stimulation with LPS (20 μ g/mL).

2. Article n°2 : Prédiction de la toxicité *in vivo* pulmonaire induite par l'exposition aiguë à des nanomatériaux faiblement solubles en utilisant des méthodes *in vitro* avancées

Les modèles animaux sont de solides outils pour prédire les potentiels effets indésirables des NMs chez l'homme après exposition par inhalation. Néanmoins, considérant le nombre important de NMs utilisés ainsi que la grande diversité de ceux-ci, il semble difficile d'avoir recours uniquement à l'expérimentation animale pour évaluer leur potentielle toxicité. Les études de toxicité *in vitro*, basées sur l'utilisation de modèles cellulaires pulmonaires, représentent une alternative à l'*in vivo*. D'autant plus que des progrès importants ont été faits pour développer des modèles cellulaires et des méthodes d'exposition *in vitro* plus physiologiques. Cependant, la capacité du *in vitro* à prédire les effets indésirables observés *in vivo* dans les poumons des animaux après exposition aiguë à des NMs reste peu claire et nécessite d'être au préalable clairement évaluée.

C'est pourquoi, l'objectif de ce second travail a été d'évaluer l'aptitude des méthodes d'exposition *in vitro* utilisées dans notre étude et présentées dans notre premier article, à prédire les effets toxiques observés *in vivo* chez le rat après exposition aiguë pulmonaire à des NMs métalliques faiblement solubles. Dans ce but, des rats ont été exposés *in vivo* par la voie respiratoire aux mêmes NPs de TiO₂ et de CeO₂ qu'*in vitro*. Après 24h d'exposition, la réponse biologique pulmonaire des animaux (Inflammation, cytotoxicité, stress oxydatif) a été évaluée. Des comparaisons ont été effectuées entre les résultats *in vivo* et *in vitro*, en se focalisant sur l'inflammation car c'était le marqueur biologique activé le plus sensible dans notre étude, *in vivo* comme *in vitro*. Des comparaisons quantitatives ont été réalisées grâce à la sélection de plusieurs métriques de dose compatibles entre le *in vivo* et le *in vitro*. Pour cela, les doses réellement déposées sur les cellules *in vitro* ou dans les poumons des animaux *in vivo* ont été évaluées. Celles-ci ont été normalisées par rapport à la surface des alvéoles *in vivo* ou du tapis cellulaire *in vitro* et par rapport au nombre de macrophages présents dans le modèle de co-culture *in vitro* ou dans les alvéoles *in vivo*.

Quelle que soit la métrique de dose utilisée (masse/surface ou /macrophage), nous avons observé que la méthode d'exposition *in vitro* la plus avancée, l'interface air-liquide, était la plus prédictive des effets observés *in vivo*. Des réponses biologiques ont été notées à des doses plus proches du *in vivo* après exposition à l'interface air-liquide. Nous avons néanmoins

montré que la méthodologie submergée, même si elle est moins réaliste, ne devait pas être mise de côté. En effet, les quatre NPs utilisées dans notre étude ont été classées, en fonction des effets toxiques observés, similairement *in vivo* et *in vitro*, et cela quelle que soit la technique d'exposition *in vitro* utilisées. Nous avons également souligné dans notre étude plusieurs points clés méthodologiques à considérer avec attention lorsque la toxicité des NPs faiblement solubles était évaluée *in vitro*, notamment, la mesure de la dose déposée sur les cellules, le temps nécessaire pour délivrer la dose et l'aire de surface des NPs.

Predicting the *in vivo* pulmonary toxicity induced by acute exposure to poorly soluble nanomaterials by using advanced *in vitro* methods

Thomas Loret^{1,2}, Rogerieux Françoise¹, Bénédicte Trouiller¹, Anne Braun¹, Christophe Egles^{2,3} and Ghislaine Lacroix^{1*}

⁽¹⁾Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), (DRC/VIVA/TOXI), Parc Technologique ALATA - BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France,

⁽²⁾Université de Technologie de Compiègne (UTC), Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), UMR CNRS 7338, 60205 Compiègne, France,

⁽³⁾Tufts University, department of Biomedical Engineering, Medford, Massachusetts, United States of America.

Abstract

Animal models are powerful tools to predict potential adverse effects in human after acute inhalation of nanomaterials. However, considering the number of nanomaterials used and their physicochemical diversity, it seems difficult to rely only on animal experimentation. *In vitro* studies using lung cells represent alternatives to assess their toxicity. Nevertheless, the ability of the *in vitro* to predict potential acute pulmonary effects *in vivo* in animals remains unclear and need to be carefully assessed.

For this purpose, rats were exposed by the respiratory route *in vivo* and pneumocytes in co-culture with macrophages were exposed using *in vitro* methodologies of different complexity. After 24h of exposure to three TiO₂ and one CeO₂ nanomaterials, the biological responses were assessed, focusing on the pro-inflammatory effects. Quantitative comparisons were performed between the *in vivo* and *in vitro* responses using compatible dose metrics.

For each dose metric used (mass/surface or mass/macrophage), we observed that the most realistic *in vitro* exposure method, the Air liquid interface, was the most predictive of *in vivo* effects. We nevertheless showed that the submerged methodology, which is classically used *in vitro*, should not be set aside as the four poorly soluble nanomaterials were ranked similarly *in vivo* and *in vitro*, for all the *in vitro* methodologies used. Moreover, we highlighted several methodological key points which should be carefully considered when assessing poorly soluble nanomaterial toxicity *in vitro*, including measurement of the deposited dose, timing of the dose delivery, but also the surface area of the nanomaterials.

Key words (2-5 key words)

Poorly soluble nanomaterials, acute exposure, alternative toxicity testing, Air-liquid interface, vivo-vitro correlations

Introduction

Inhalation is an important route of exposure for many metallic and poorly soluble nanomaterials (NMs) (Bakand et al., 2012), including TiO₂ or CeO₂, which are among the most commonly used in nanotechnology products (Piccinno et al., 2012). When assessing the pulmonary toxicity of these NMs after acute exposure, *in vivo* assays using animal models remain the most reliable approach to predict potential adverse effects in humans (Oomen et al., 2014), because of similar levels of complexity. Nevertheless, considering the high number of NMs used and their physicochemical diversity, it seems difficult, for ethical and financial reasons, to rely on animal experimentation only. It is therefore necessary to find reliable methods that could be used as alternatives to *in vivo* models in this context.

In vitro studies using lung cells represent an inexpensive and easy-to-use alternative to assess pulmonary toxicity after acute exposure to NMs (Nel et al., 2013). *In vitro*, cells are usually exposed for 24h to suspensions of NMs. However, these simplistic experimental conditions do not accurately mimic the interactions between particles and lungs in the human body (Joris et al., 2013). This may lead to different biological responses between *in vivo* and *in vitro* approaches. Recently, many progresses have been made to simulate *in vitro* the cell–particle interactions occurring in the lungs *in vivo*. Importantly, advanced cellular models including co-cultures or 3D-cultures (BeruBe et al., 2009) and physiological exposure methods including systems allowing exposure of cells at the air-liquid interface (ALI) to aerosols of NMs (Paur et al., 2011), have been developed. These new methodologies could help to predict more reliably the pulmonary effects observed *in vivo*. However, this point has to be evaluated. In this context, the aim of our study was to assess the ability of several *in vitro* methods, differing in complexity, to predict the adverse effects observed *in vivo* after exposure to some metallic and poorly soluble NMs. For this purpose, *in vivo* experiments were performed. Rats were exposed to TiO₂ and CeO₂ NMs by intratracheal instillation and then sacrificed after 24h of exposure. *In vitro* experiments were also performed. Alveolar epithelial cells in co-culture with macrophages were exposed for 24h at the ALI to aerosols or in submerged conditions to suspensions of the same NMs as *in vivo*. Moreover, two different deposition kinetics were tested *in vitro*. After exposure, cytotoxicity, inflammation and oxidative stress were assessed, both *in vivo* and *in vitro*. Quantitative and qualitative comparisons were then performed between the *in vivo* and *in vitro* results. To perform these comparisons, common dose metrics between the *in vivo* and *in vitro* methods were selected.

Materials and methods

Nanomaterials

Four poorly soluble NMs were used in the study. The TiO₂ NM100 and NM101 and the CeO₂ NM212 were obtained from the Joint research council (JRC). The TiO₂ NM105 was obtained from Evonik Industries (AEROXIDE[®] TiO₂ P25). The TiO₂ and CeO₂ physicochemical properties (Table 1) were well characterized by the JRC (Rasmussen et al., 2014, Singh et al., 2014). The endotoxin levels of the NMs were tested by partners of the European project NANoREG. They were below the limit of detection (data not shown).

Table 1. Physicochemical properties of TiO₂ and CeO₂ nanomaterials

| | Crittallinity | Primary particle size (nm) | Surface area, BET (m ² /g) | Primary density (g/cm ³) | Coating |
|-------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| NM105 | 80% anatase / 20% rutile | 21 | 46.1 | 4.2 | No |
| NM101 | anatase | 8 | 316 | 3.9 | Hydrophobic |
| NM100 | anatase | 100 | 10 | 3.9 | No |
| NM212 | cubic cerionite | 29 | 27 | 7.2 | No |

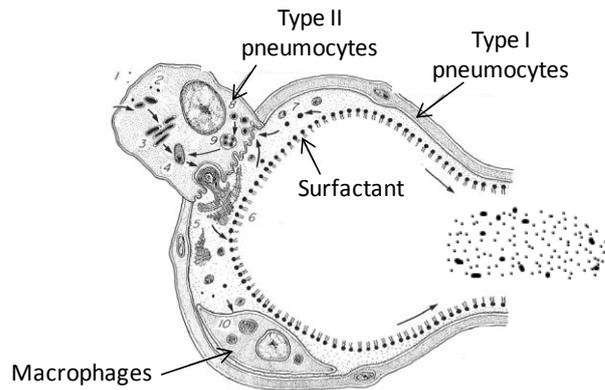
In vivo / in vitro correlation

General overview of the experimental conditions used for the in vitro/in vivo comparisons

(figure 1)

***In vivo* exposure**

Intratracheal aspiration after hyperventilation



***In vitro* exposure**

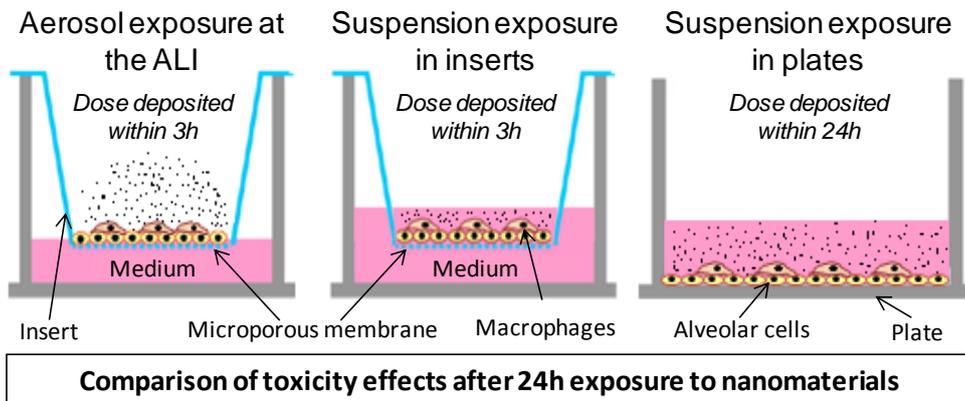


Figure 1. Experimental conditions used for the *in vitro*/*in vivo* comparisons (adapted from Loret et al., 2016)

In vivo study

The complete materials and methods used in the *in vivo* study and suspension characterization results are presented in the supplementary material section of the manuscript. Briefly, 7-week-old male rats (WISTAR) were exposed after hyperventilation by intratracheal instillation of TiO₂ and CeO₂ suspensions in milli-Q water. Four doses were administered: 0; 5; 50; 500 µg/animal. After 24h of exposure to NMs, the rats were sacrificed and bronchoalveolar lavages were performed using PBS. The biological responses (inflammation, oxidative stress, cytotoxicity) were then assessed in the cells and in the supernatants of the bronchoalveolar lavage fluids (BALF). All the *in vivo* experiments were approved by the “Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Picardie” (CREMEAP) (C2EA – 96).

In vitro studies

All materials and methods used in the *in vitro* studies are fully detailed in the following article (Loret et al., 2016). Briefly, alveolar epithelial cells (A549) in co-culture with macrophages (THP-1) were exposed either at the ALI to aerosols or in submerged condition to suspensions of TiO₂ and CeO₂ NMs in culture medium containing 10% of Fetal bovine serum. Different timings of the dose delivery were also used. At the ALI and in submerged conditions in inserts, the NM deposition was maintained for 3h, meaning that the final dose was reached within 3h. The cells were then kept in the incubator for the remaining 21h, at the ALI or in submerged conditions, with the NMs deposited on their surface. In submerged condition in plates, the NM deposition was maintained for the whole exposure time, meaning that the final dose was reached in 24h. After 24h of exposure, the cellular biological activity was assessed using cytotoxicity (Alamar blue, LDH), inflammation (IL-1b, IL-6, IL-8, TNF-α levels in culture medium (ELISA)), and oxidative stress assays (DCF assay), for all the methodologies used.

Deposited dose assessment

In vivo, the mass of each NM instilled into the lungs was measured by ICP-MS. No significant differences were observed compared to the nominal doses (data not shown).

In vitro, the real mass deposited on the cells was either assessed by ICP-MS dosage (for ALI exposures) or estimated (in submerged conditions) using the *in vitro* sedimentation diffusion and dosimetry model (ISDD) (Hinderliter et al., 2010), after measuring the hydrodynamic diameter by dynamic light scattering and the effective density of the agglomerates following the Volumetric Centrifugation Method (VCM) (DeLoid et al., 2014). The detailed material

and methods used *in vitro* and all the deposition data are available in the following paper (Loret et al., 2016).

Selection of relevant dose metrics

In order to compare *in vitro* and *in vivo* conditions, we selected common dose metrics (figure 2). The doses are often expressed in concentrations, including mass/volume of suspension *in vitro* in submerged conditions and mass/volume of air *in vivo* in inhalation studies. However, these metrics can't be applied within the different methodologies used *in vivo* (inhalation or instillation) and *in vitro* (ALI or submerged) (Figure 2). Moreover, using concentrations in mass/volume does not take into account the real contact between the NMs and the cells or tissues. Thus it does not seem appropriate to use such dose metrics for *vivo-vitro* comparisons; and more particularly for poorly soluble NMs as their toxicity is attributable to their surface reactivity (Braakhuis et al., 2016, Duffin et al., 2007, Schmid & Stoeger, 2016). *In vivo*, the total mass of NMs administered per lungs, animal or mass is often used as dose metric. This dose metric takes into account the deposition in the overall organ, but cannot be used *in vitro*. Nevertheless, common dose metrics can be used by normalizing the mass deposited on cells *in vitro* or into the lungs *in vivo* by the surface of the tissues or by the number of cells (EPA, 2004). In our study, the mass deposited was normalized by the total alveolar surface *in vivo* (4000 cm²) (Ohashi et al., 1994, Stone et al., 1992) and by the surface of the cell layer *in vitro* (4,67 cm² in inserts and 2 cm² in plates). As macrophages are highly involved in the acute host response against contaminants *in vivo* in the alveoli, the deposited mass was normalized by the total number of alveolar macrophages *in vivo* (around 25 million) (Crapo et al., 1982, Stone et al., 1992) and *in vitro* (60 000 or 25 000/cm² in inserts or in plates, respectively) (Loret et al., 2016).

The doses expressed in mass/macrophages were also normalized by the surface area of the NMs, determined by the BET method. We performed this normalization because it has been shown that the surface area was the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung (Braakhuis et al., 2016, Duffin et al., 2007, Schmid & Stoeger, 2016).

Doses could also be expressed in number of NMs per surface area or per cell. Nevertheless, these metrics were not chosen due to the difficulty to characterize the size distribution of NMs in the lungs. Moreover, it was shown that the number was not necessarily more pertinent than the mass metric (Braakhuis et al., 2016).

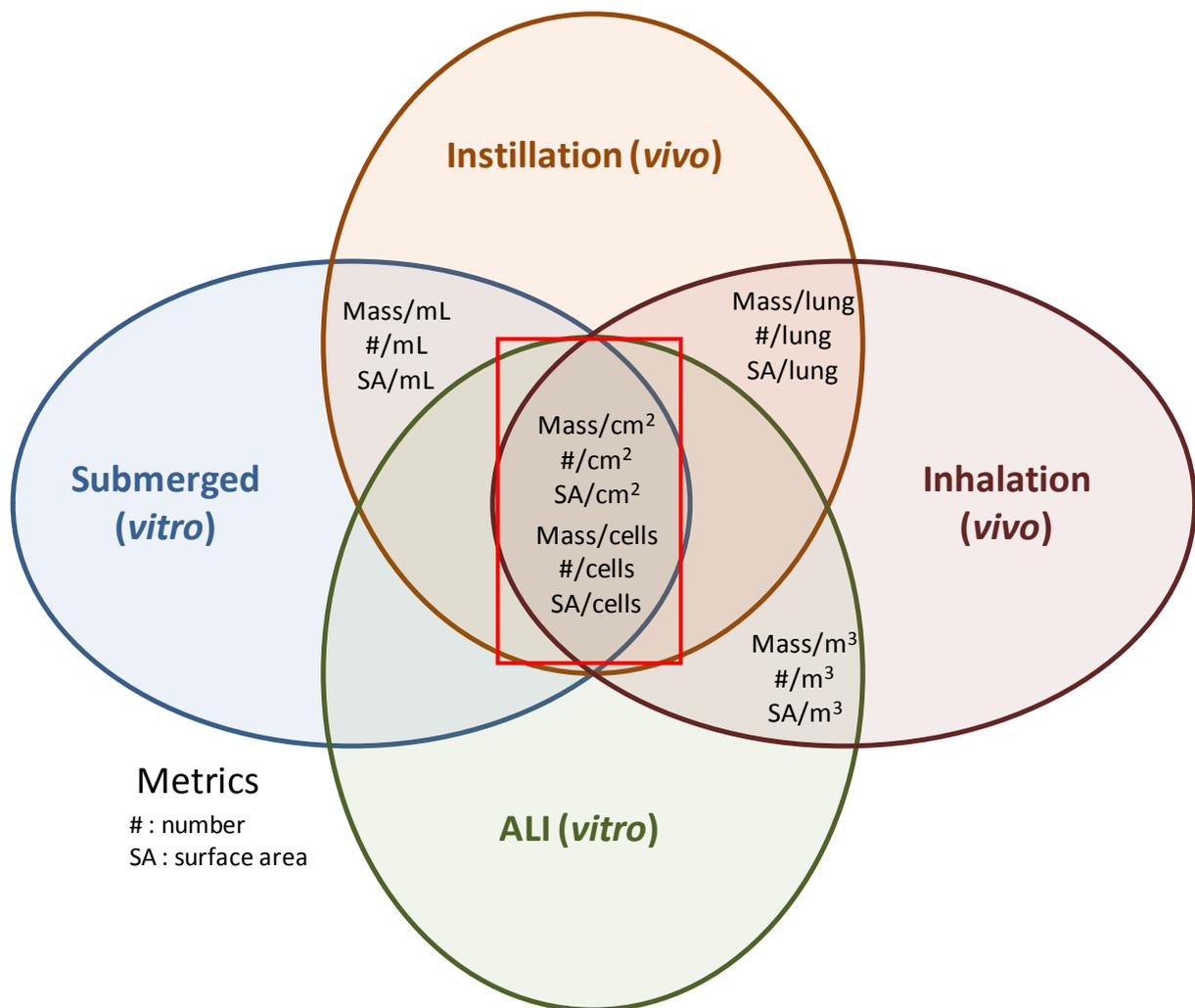


Figure 2. Compatibility of the different dose metrics *in vivo* and *in vitro*.

Results

Pro-inflammatory responses *in vivo* and *in vitro*

Both *in vivo* and *in vitro*, the pro-inflammatory responses were assessed after 24h of exposure to the NMs. *In vivo*, we observed significant pro-inflammatory effects only at the maximum dose tested: 500 $\mu\text{g}/\text{lungs}$, corresponding to around 0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ or 20 $\mu\text{g}/10^6$ macrophages, after normalization by the alveolar surface or the number of alveolar macrophages, respectively (Figure 3). We observed significant increases in the neutrophil influx in the BALF supernatants after exposure to the TiO_2 NMs 105 and 101, associated with increased concentrations in $\text{TNF-}\alpha$ with the NM101 and in KC-GRO and $\text{TNF-}\alpha$ with the NM105. A significant increase in $\text{IL-}\beta$, $\text{IL-}6$ and $\text{TNF-}\alpha$ secretion was also observed for the NM212, although no significant neutrophil influx was detected. This absence of significance in the neutrophil influx may be due to high variability in the control sample. No significant increase in neutrophils or cytokines was noted with the TiO_2 NM100. Moreover, whatever the NM used, we did not observe significant change in the number of macrophages. According to these significant pro-inflammatory effects observed, lowest observed adverse effects levels (LOAELs) were determined. The LOAELs determined were depending on the dose metric used.

***In vivo* (IT)**

Inflammation (BALF)

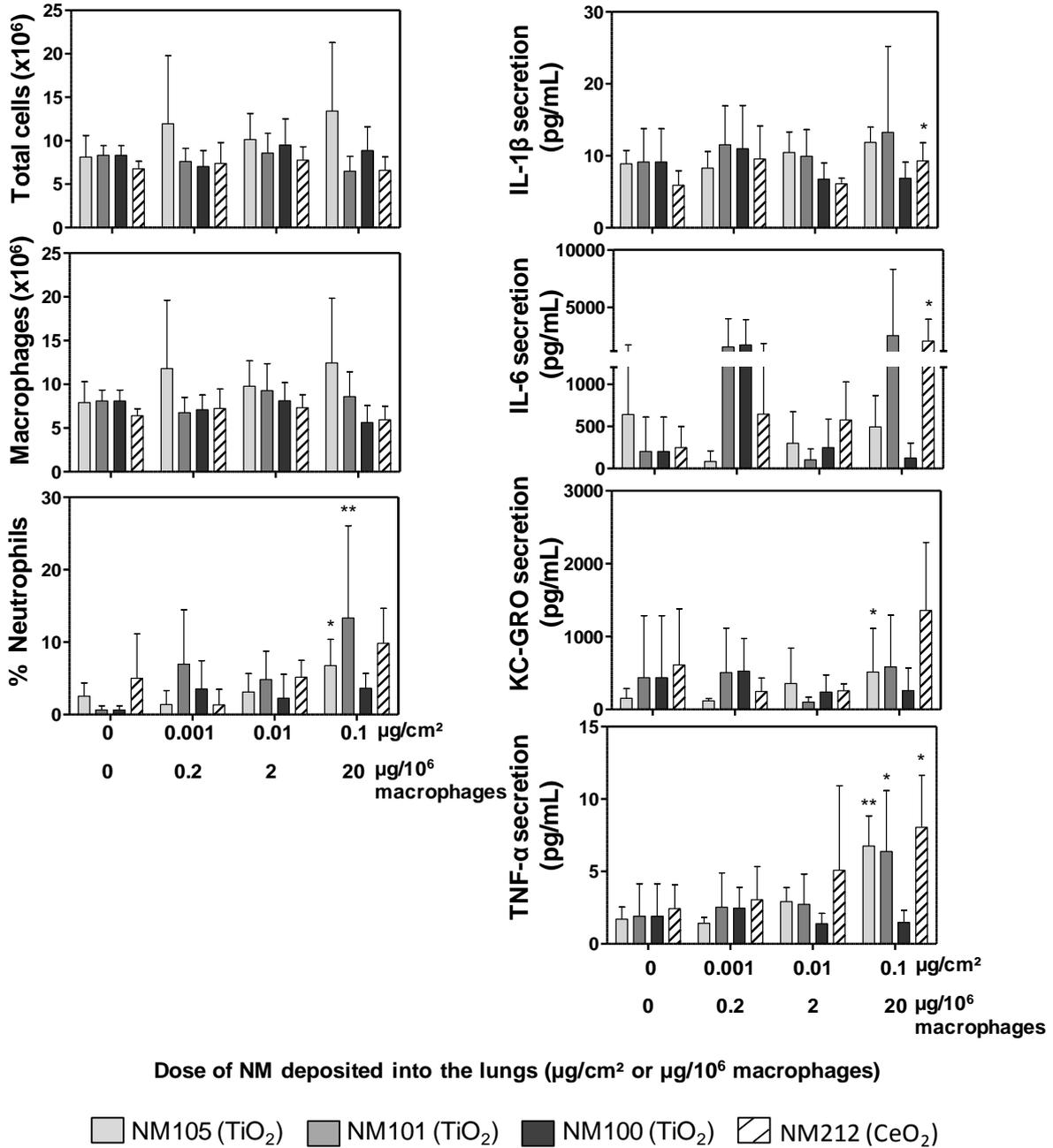


Figure 3. Cytology and cytokines levels in BALF 24h after instillation with TiO_2 and CeO_2 NMs. Data are mean \pm standard deviation (n=6) (* p <0.05; ** p <0.01; * p <0.001).**

As demonstrated in our previous study (Loret et al., 2016), we observed significant pro-inflammatory responses at the ALI for all the NMs used. Effects were also observed in submerged conditions, but mainly with the NMs 105 and 101. According to these results, LOAELs were determined for each assay performed (Table 2).

Table 2. LOAELs (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) determined *in vitro* with the pro-inflammatory effects for each exposure method used (First published in Loret et al., 2016).

| | IL-1 β | | | IL-6 | | | IL-8 | | | TNF- α | | |
|-------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
| | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm plate ^c | ALI ^a | Subm insert ^b | Subm Plate ^c |
| NM105 | 1 | 3 | 10 | 1 | 10 | 20 | 1 | 3 | Ø | 1 | 3 | 20 |
| NM101 | 1 | 10 | 10 | 1 | 3 | 10 | 1 | 3 | Ø | 1 | 3 | 10 |
| NM100 | Ø | Ø | Ø | 3 | Ø | Ø | 1 | Ø | Ø | Ø | Ø | Ø |
| NM212 | 3 | Ø | Ø | 3 | Ø | Ø | 1 | 10 | Ø | Ø | 10 | Ø |

^aExposure at the air-liquid interface (ALI) in insert for 24h. Final deposited within 3h.

^bExposure in submerged conditions in inserts for 24h. Final dose deposited within 3h.

^cExposure in submerged conditions in plates. Final dose deposited within 24h.

Ø No effects measured at the tested doses

Cytotoxicity and oxidative stress effects *in vivo* and *in vitro*

In vitro, we observed few significant cytotoxicity and oxidative effects at the ALI (for the NMs 105 and 101). LOAELs were also determined for cytotoxicity and oxidative stress in submerged conditions and more particularly in inserts (Table 3). However, *in vivo*, we did not observe significant cytotoxic or oxidative stress effects after 24h of exposure to NMs.

Table 3. LOAELs ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for cytotoxicity and oxidative stress effects determined after 24h of exposure.

| LOAELs ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | | Cytotoxicity* | | | | Oxidative stress | | | |
|---|-------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------|
| | | <i>In vitro</i> | | | <i>In vivo</i> | <i>In vitro</i> | | | <i>In vivo</i> |
| | | ALI ^a (3h+21h) | Subm ^b (3h+21h) | Subm ^c (24h) | IT ^d | ALI ^a (3h+21h) | Subm ^b (3h+21h) | Subm ^c (24h) | IT ^d |
| TiO ₂ | NM105 | 1 | 10 | 10 | >0.1 | > 3 | 10 | 10 | >0.1 |
| | NM101 | > 3 | 10 | 10 | >0.1 | 1 | > 10 | >20 | >0.1 |
| | NM100 | > 3 | 10 | > 20 | >0.1 | > 3 | 10 | >20 | >0.1 |
| CeO ₂ | NM212 | > 3 | 10 | > 20 | >0.1 | > 3 | > 10 | >20 | ND |

*LOAELs indicated represent significant cytotoxicity > 5%.

■ significant effects allowing the determination of a LOAEL

■ no significant observed effects

^aDoses at the ALI: 0.1, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^bDoses in submerged conditions in inserts: 1, 3, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^cDoses in submerged conditions in plates: 1, 3, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^dDoses *in vivo*: 0.001, 0.01, 0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

***Vivo-vitro* comparisons using the inflammation results**

Inflammation was our most sensitive marker of biological responses at 24h. For this reason, we focused on the pro-inflammatory responses for the *vivo-vitro* comparisons.

Comparisons in mass/surface

Doses of NMs were expressed in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, after normalization of the administered dose by the surface of the cell layer *in vitro* or by the total alveolar surface *in vivo*. LOAELs were then determined for pro-inflammatory effects using this dose metric (Table 4). For each NM, we observed lower LOAELs after 24h of exposure at the ALI compared to in submerged conditions. Nevertheless, the pro-inflammatory effects were observed at higher doses *in vitro* compared to *in vivo*. Moreover, in term of biological activation levels, we observed better *vivo-vitro* correlations when the final doses were achieved *in vitro* within 3h rather than within 24h.

Table 4. LOAELs (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for 24h exposure) determined for pro-inflammatory effects.

| LOAELs ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | | Inflammation | | | | |
|---|-------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | | <i>In vitro</i> | | | <i>In vivo</i> (cytokines) | <i>In vivo</i> (Neutrophils) |
| | | ALI ^a (3h+21h) | Subm ^b (3h+21h) | Subm ^c (24h) | IT ^d | IT ^d |
| TiO ₂ | NM105 | 1 | 3 | 10 - 20 | 0.1 | 0.1 |
| | NM101 | 1 | 3 | 10 | 0.1 | 0.1 |
| | NM100 | 1-3 | >10 | > 20 | >0.1 | >0.1 |
| CeO ₂ | NM212 | 1-3 | 10 | > 20 | 0.1 | >0.1 |

■ significant effects allowing the determination of a LOAEL

■ no significant adverse effects observed

^aDoses at the ALI: 0.1, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^bDoses in submerged conditions in inserts: 1, 3, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^cDoses in submerged conditions in plates: 1, 3, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^dDoses *in vivo*: 0.001, 0.01, 0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Comparisons in mass/macrophages

Doses were also normalized by the total number of macrophages and expressed in $\mu\text{g}/10^6$ macrophages to perform the comparisons. *In vitro*, doses expressed in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ were normalized by the total number of alveolar macrophages-like cells. *In vivo* doses expressed in μg were normalized to the number of alveolar macrophages. The pro-inflammatory responses were observed at similar doses *in vivo* and *in vitro* at the ALI (Table 5). We also noticed that the LOAELs determined *in vitro* were closer to the *in vivo* when the final doses were achieved within 3h than within 24h.

Table 5. LOAELs ($\mu\text{g}/10^6$ macrophages for 24h exposure) determined for pro-inflammatory-effects.

| LOAELs ($\mu\text{g}/10^6$ macrophages) | | Inflammation | | | | |
|---|-------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | | <i>In vitro</i> (cytokines) | | | <i>In vivo</i> (cytokines) | <i>In vivo</i> (Neutrophils) |
| | | ALI ^a (3h+21h) | Subm ^b (3h+21h) | Subm ^c (24h) | IT ^d | IT ^d |
| TiO ₂ | NM105 | 16.7 | 50 | 400 - 800 | 20 | 20 |
| | NM101 | 16.7 | 50 | 400 | 20 | 20 |
| | NM100 | 16.7-50 | >167 | >800 | >20 | >20 |
| CeO ₂ | NM212 | 16.7-50 | 167 | >800 | 20 | >20 |

■ significant effects allowing the determination of a LOAEL

■ no significant observed effects

^aDoses at the ALI: 1.67, 16.7, 50 $\mu\text{g}/10^6$ macrophages

^bDoses in submerged conditions in inserts : 16.7, 50, 167 $\mu\text{g}/10^6$ macrophages

^cDoses in submerged conditions in plates: 40, 120, 400, 800 $\mu\text{g}/10^6$ macrophages

^dDoses *in vivo*: 0.2, 2, 20 $\mu\text{g}/10^6$ macrophages

Ranking of the NMs according to the methodology used

Ranking using mass as dose metric

In mass ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ or $\mu\text{g}/10^6$ macrophages), NMs were ranked similarly both *in vivo* and *in vitro* (Table 4 and 5). *In vivo*, the NMs 100, 101 and 212 were clearly observed to be more toxic than the NM100, as we did not observe any significant effects with the NM100. The NMs 105 and 101 seemed also more toxic than the NM212 as significant increases in cytokine secretion were observed with the NM212 without significant neutrophil influx. Nevertheless, this has to be confirmed as this discrepancy could be attributable to an unexpected high neutrophil influx in the non-exposed control (Figure 2). *In vitro*, we observed significant pro-inflammatory responses for the NMs 105 and 101, clearly at lower doses than for the NM100 and the NM212, with all the methodology used. The NM212 also seemed to elicit slightly more pro-inflammatory responses *in vitro* than the NM100. Nevertheless, the discrepancy between these two NMs could only be observed in submerged conditions in inserts where LOAELs were determined for the NM212 but not for the NM100.

Ranking using the surface area as dose metric

Doses in mass/macrophages were also normalized by the surface area of each NM, to assess how the surface reactivity influenced the biological responses both *in vivo* and *in vitro*.

According to the LOAELs expressed in $\text{cm}^2/10^6$ cells (Table 6), a ranking was provided for the four poorly soluble NMs used in our study.

Table 6. LOAELs ($\text{cm}^2/10^6$ cells for 24h exposure) determined for pro-inflammatory-effects.

| LOAELs ($\text{cm}^2/10^6$ macrophages) | | Inflammation | | | | |
|---|-------|-----------------------------|------------------|---------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | | <i>In vitro</i> (cytokines) | | | <i>In vivo</i> (cytokines) | <i>In vivo</i> (Neutrophils) |
| | | ALI (3h+21h) | Subm (3h+21h) | Subm (24h) | IT | IT |
| TiO ₂ | NM105 | 7.7 | 23.1 | 184.4-368.8 | 9.2 | 9.2 |
| | NM101 | 52.8 | 158 | 1264 | 63.2 | 63.2 |
| | NM100 | 1.7-5 | >16.7 | >80 | >2 | >2 |
| CeO ₂ | NM212 | 4.5-13.5 | 45.1 | >216 | 5.4 | >5.4 |

■ significant effects allowing the determination of a LOAEL

■ no significant observed effects

Interestingly, performing this normalization had an influence on the ranking of the NMs and the NM101 was ranked with a lower toxicity than expected. We observed effects at lower doses for the NM105 and the NM212 than for the NM101, both *in vivo* and *in vitro* (Figure 4). However, it was not possible to rank the NM100 clearly as no significant effects were observed (except at the ALI). This was maybe due to the significantly lower doses (in $\text{cm}^2/10^6$ macrophages) that were tested compared to the three other NMs, due to a lower surface area.

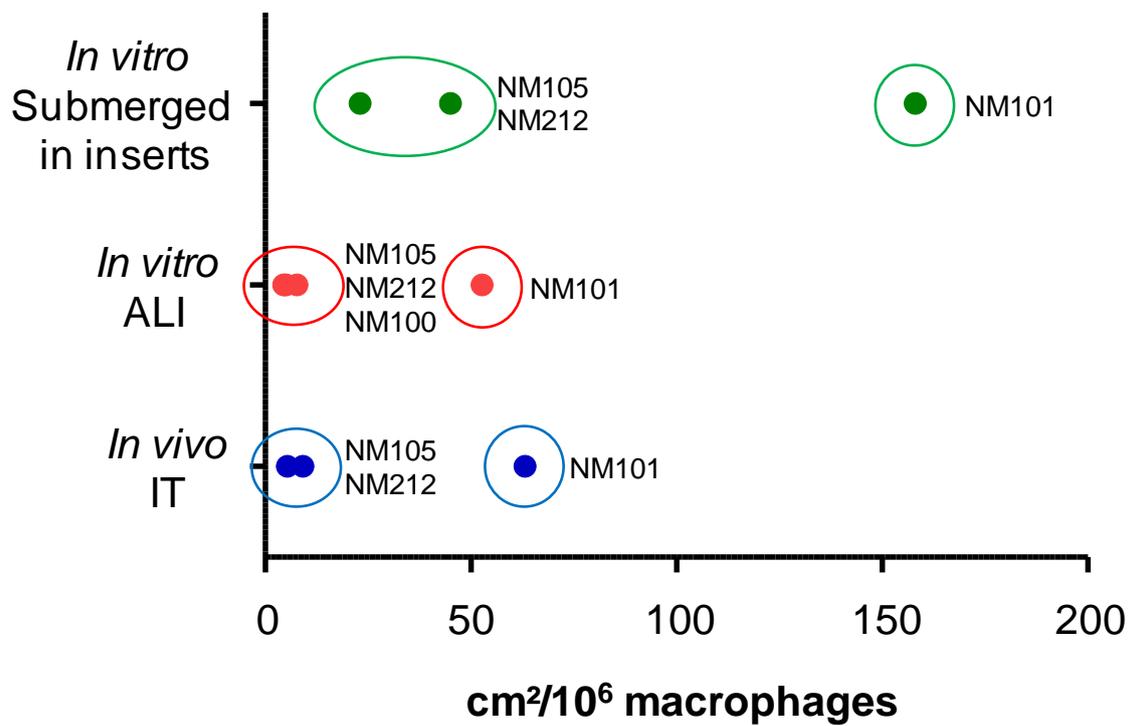


Figure 4. LOAELs (cm²/10⁶ macrophages) for pro-inflammatory responses in function of methodologies used.

Discussion

The aim of our study was to assess the ability of several *in vitro* methods, which differ in complexity, to predict the pulmonary adverse effects observed *in vivo* after acute exposure to metallic and poorly soluble NMs. *In vitro*, cells were exposed at the ALI in inserts to simulate more closely the interactions between NMs and alveolar cells occurring *in vivo*, and to avoid contamination with culture medium. The ALI exposure system used in our study (Loret et al., 2016) was selected for its ability to deposit sufficient amounts of NMs on cells to observe biological adverse effects (Kim et al., 2013, Xie et al., 2012). In parallel we also used a more classical exposure method and cells were exposed to NM suspensions in submerged conditions to assess the general impact of the culture medium surrounding poorly soluble NMs on the cell biological response. *In vivo*, rats were exposed for 24h by intratracheal instillation of NM suspensions, after hyperventilation.

The A549 alveolar epithelial cell line was selected for the ability to form a cell layer and to secrete surfactant (Blank et al., 2006, Lehnert, 1992) and the THP-1 monocyte cell line was chosen for its capacity to differentiate into macrophage-like cells with PMA (Park et al., 2007). Indeed, at the alveolar surface *in vivo*, macrophages are in close contact with alveolar epithelial cells (i.e pneumocytes), at a ratio of approximately one macrophage to ten pneumocytes (Crapo et al., 1982, Stone et al., 1992). Moreover, *in vivo*, macrophages and alveolar cells are at the ALI and covered by a thin layer of surfactant secreted at the apical side by the type 2 pneumocytes. Thus with this co-culture model, the deposited NMs become covered with surfactant before they interact with the cells, as observed in the alveoli *in vivo* (Geiser & Kreyling, 2010). Finally, this model was also selected for its increased sensibility compared to mono-cultures of alveolar epithelial cells only, both at the ALI (Loret et al., 2016) and in submerged conditions (Napierska et al., 2012, Rothen-Rutishauser et al., 2008, Wottrich et al., 2004).

Both *in vivo* and *in vitro*, exposures were performed using the same TiO₂ and CeO₂ NMs and the biological responses were assessed at 24h. However, different timings of the dose delivery were used. *In vivo* the final doses of NMs were deposited by instillation into the lungs almost instantly. At the ALI *in vitro*, NMs were deposited on the cells using a very low aerosol flow rate of 5 mL/min to prevent cell damages due to the air flux. To deposit a dose sufficient to observe biological effects, a 3h exposure time was necessary. In submerged conditions it was not possible to deposit the NMs instantly on the cells either, as the deposition kinetic depended mostly on their sedimentation rate. In inserts, we used the duration of 3h for the

dose delivery, in order to provide comparisons as accurate as possible between the two *in vitro* exposure methods. To assess how the timing of the dose delivery could influence the cell response *in vitro*, exposures in submerged conditions in plates, using classical exposure conditions and a continuous deposition of NMs on the cells for 24h, were also performed.

The biological responses were assessed after 24h of exposure to the NMs, by performing cytotoxicity, oxidative stress and inflammation assays and results were then compared between the *in vivo* and *in vitro* methodologies used in our study. Both *in vivo* and *in vitro*, we observed that inflammation was the most sensitive parameter for detection of biological responses at 24h. After NM exposure, we detected much more pro-inflammatory effects than cytotoxicity and oxidative stress effects, and generally at lower doses. For this reason, comparisons were performed mostly with inflammation as readout for NM toxicity. The markers of inflammation used in our study were selected according to their relevance in representing the pro-inflammatory acute response in the lungs after exposure to particles (Driscoll et al., 1997, Oberdorster et al., 2000). Similar pro-inflammatory cytokines were chosen *in vitro* and *in vivo*, however those significantly secreted *in vitro* were not necessarily *in vivo*. On the basis of this finding we assumed that better comparisons could be provided in our study by considering the global inflammatory response, including the neutrophil influx *in vivo* and the secretion of several cytokines both *in vivo* and *in vitro*.

To perform the comparisons, LOAELs were determined according to the significant pro-inflammatory responses observed. As the LOAELs were associated with dose metrics, the key point for performing quantitative comparisons was the selection of similar metrics *in vivo* and *in vitro*. To address this, doses in mass were first normalized to the total alveolar surface *in vivo* or to the surface of the cell layer *in vitro*. This normalization was based on the assumption that the alveolar epithelial cells may be the main target after acute exposure to NMs (EPA, 2004). Expressing results in mass/surface, we observed around ten times lower LOAELs *in vivo* than *in vitro*. The differences were a little more pronounced in submerged conditions than at the ALI when the dose was delivered in 3h (30 fold), and much more important, of an order of magnitude of around 100, when the deposition of the NMs was continuous during the 24h of *in vitro* exposure. Normalizations in mass/surface were also performed in three noteworthy studies (Jing et al., 2015, Kim et al., 2014, Teeguarden et al., 2014). In their study, Kim et al. (Kim et al., 2014) observed similar pro-inflammatory profiles when expressing the doses in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ after exposing mice by oropharyngeal aspiration and macrophages or lung slices to suspensions of TiO_2 , CeO_2 and SiO_2 NMs. Nevertheless, the real masses of NMs deposited *in vitro* and *ex vivo* were not assessed and no clear quantitative

comparisons were performed between the *in vivo* and the *in vitro*, which makes interpretation of the results from their study difficult. Jing et al. (Jing et al., 2015) compared the responses after acute exposure to Cu NPs, in mice lungs and in alveolar epithelial cells at the ALI. They observed similar responses (chemokine and LDH release) but apparently at lower doses *in vitro* compared to *in vivo*, when expressing the dose in ng/cm². Nevertheless, the responses were assessed at 2h or 4h *in vitro* and at 24h or 40h *in vivo*, which brings uncertainties towards their results. Teeguarden et al. (Teeguarden et al., 2014) exposed mice *in vivo* by inhalation or lung epithelial cells *in vitro* by using suspensions of FeO NMs for 4h with similar timings of the dose delivery, and assessed the mass and regional deposition of the NMs. When focusing on the tracheobronchal part of the lung, they observed pro-inflammatory responses with doses about 10 to 100 time lower doses *in vivo* than *in vitro*. However, they did not study the response of the alveolar part of the lung with this metric. Instead, they normalized the doses in mass by the number of alveolar macrophages *in vivo* and *in vitro*. Indeed, monocultures of murine macrophages were also exposed to suspensions in their study (Teeguarden et al., 2014). When focusing on the alveolar macrophages, they showed that pro-inflammatory responses were triggered at similar doses *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, we also observed significant effects at much closer doses *in vivo* and *in vitro* using this dose metric, and more particularly at the ALI and when the dose was deposited in submerged conditions on the cells within 3h. Although differences exist regarding the cellular and animal models and the duration of exposure between the Teeguarden study and ours, this seems to indicate that focusing on the macrophages might better explain the general acute pro-inflammatory response elicited by NPs in the alveoli, both *in vivo* and *in vitro*.

According to the metrics used in our study (mass or surface area), comparisons were performed between the four NMs tested. Interestingly, the ranking of the NMs was different according to the dose metric used. When using the mass as dose metric, the NM101 appeared as toxic as the NM105 and more toxic than the NMs 212 and 100. However, when focusing on the surface area, the NM101, which has the highest surface activity, was observed to be less toxic than expected and appeared less toxic than the NM105 and the NM212. Indeed, based on the surface reactivity theory which implies that the more the surface area of a NM is high the more it is potentially toxic (Oberdorster et al., 2005), similar toxicity response would be expected for these three NMs when normalizing the dose by the surface area. Because this was not the case, we hypothesized that the hydrophobic surface coating which surrounds the NM101 but not the NM105 and the NM212 may have contributed to reduce the toxic potential of the NM101. This is not surprising as it was shown in several studies that NM

acute toxicity was more dependent on the coating than on the core properties (Demokritou et al., 2013, Fubini et al., 2010). Nevertheless, further investigations should be performed to determine clearly why significant pro-inflammatory responses were observed at higher doses than expected with the NM101. Regarding the NM100, no clear ranking could be provided using the LOAELs normalized by the surface area, as the maximum doses tested were lower than those inducing significant biological responses with the three other NMs, due to a lower surface area. This may explain why no significant effects were observed with this NM (except at the ALI).

Finally, according to our results, it seems that the use of advanced and realistic *in vitro* methodologies allows to predict more closely the biological responses observed *in vivo*. Nevertheless, further improvements still need to be made to draw clear conclusion. First, the animals were exposed by instillation of suspensions and not by inhalation of aerosols containing NMs. The instillation method remains less physiologic than the inhalation one, especially because the dose is instantly deposited into the lungs using a bolus. This could induce a greater biological response compared to inhalation, where the final dose is generally deposited within 4h (Baisch et al., 2014). Moreover, although the instillation method allows to deposit NMs more deeply into the lungs (Wong, 2007), there was a lack of accurate dosimetry in our study as the Multiple-Path Particle Dosimetry Model (MPPD) (Anjilvel & Asgharian, 1995) could not be used. Thus, the regional deposition and more particularly the real dose distributed to the alveoli were not accurately evaluated. The second reason is that some limitations remain regarding the assessment of the dose delivery *in vitro*, more particularly in submerged conditions as the deposited dose on cells was estimated using the ISDD model and not directly measured. Nevertheless, this relative uncertainty may be low as good similarity between estimated and measured deposited dose of poorly soluble NMs were observed at 24h (Cohen et al., 2014). At 3h, the uncertainty may be higher and lead to an underestimation of the deposited dose (Cohen et al., 2014). This may contribute to increased differences between the ALI and the submerged in term of biological activation levels. The third reason is that some uncertainties exist regarding the dose metrics selected. To compare the *in vitro* to the *in vivo*, we normalized the dose *in vivo* in mass by the total alveolar surface. We decided to use the value of 4000 cm² (Ohashi et al., 1994, Stone et al., 1992), which seemed suitable for 7 weeks old male rats. Nevertheless, this may represent an overestimation as alveolar surfaces of around 2000 (Pinkerton et al., 1982), and 3400 cm² (Massaro et al., 1995) have also been calculated for 6 weeks and 60 days old rats, respectively. To normalize the dose by the number of macrophages, we used the number of counted macrophages *in vitro* and we

assumed that around 25 millions macrophages were in the alveoli *in vivo*. Although we based on two publications (Miller, 2000, Stone et al., 1992) to determine the number of alveolar macrophages *in vivo*, it remains unclear if all of them were in contact with and contributed to the biological response elicited by the NMs, more particularly as only around 8 millions of macrophages were retrieved in the BALF *in vivo*. Some uncertainty remains also regarding the use of LOAELs to perform *vitro-vivo* comparisons, more particularly *in vivo* because of a ten order of magnitude difference between the LOAELs and the no observed adverse effects. Although using intermediary doses might have enabled to determine more precisely the LOAELs, this has no impact on our general conclusions as the *in vivo* methodology remains the most sensitive one in our study, to predict potential adverse effects after acute exposure to poorly soluble NMs. Performing correlations using other criteria of comparisons like steeper slopes (Rushton et al., 2010) benchmark doses (Braakhuis et al., 2016), could also be interesting. Nevertheless, using the general pro-inflammatory responses *in vivo* and *in vitro* seemed more relevant in our study. For this reason, we did not provided such correlations, as it implied comparing endpoints with clear dose response relationship one by one.

Conclusion

In our study, quantitative comparisons between *in vitro* and *in vivo* methodologies were enabled by the selection of compatible and relevant dose metrics. Two compatible dose metrics were used and we showed better *vivo-vitro* correlations in term of biological activation levels when normalizing the mass by the number of macrophages rather than by the surface of the alveolar layer. According to these two metrics, the capacity of the different *in vitro* methods used to predict the acute biological responses *in vivo* was evaluated, using LOAELs determined for general pro-inflammatory responses. We showed that the most realistic *in vitro* exposure method: the ALI, was also the most predictive one, whatever the dose metric used. The submerged methodology, which is classically used *in vitro* to assess NM toxicity, should however not be set aside as the four poorly soluble NMs were ranked similarly both *in vivo* and *in vitro*, whatever the *in vitro* methodology used. Moreover, we showed that better correlations could be obtained by considering several methodological key points *in vitro* in submerged conditions, including the measurement of the deposited dose and the timing of the dose delivery. Interestingly, we also observed that the doses in mass can be normalized by the surface area of the NMs to explain potential differences in toxicity, both *in vivo* and *in vitro*.

In conclusions, we highlighted that considering several methodological key points *in vitro* could improve the *in vitro* predictivity, when evaluating the acute toxicity of poorly soluble NMs. This shows perspectives about using and developing more reliable *in vitro* methods. Although this study remains the first specifically designed to compare several *in vitro* exposure methods differing in complexity to the *in vivo*, uncertainties remains and further investigations are still needed to confirm our allegations.

Acknowledgments

This work was supported by the French ministry of environment (“Programme 190”) and by the EU-FP7 (NANoREG project).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

Supplementary material

Full methods and characterization of the suspensions used in the *in vivo* study (présenté en Annexe 3 du manuscrit de thèse).

References (2nd article)

- Anjilvel S, Asgharian B. 1995. A Multiple-Path Model of Particle Deposition in the Rat Lung. *Fundam Appl Toxicol* 28:41-50.
- Baisch BL, Corson NM, Wade-Mercer P, Gelein R, Kennell AJ, Oberdorster G, et al. 2014. Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. *Part Fibre Toxicol* 11.
- Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F. 2012. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 24:125-35.
- BeruBe K, Aufderheide M, Breheny D, Clothier R, Combes R, Duffin R, et al. 2009. In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 37:89-141.
- Blank F, Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Gehr P. 2006. An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *Journal of Aerosol Medicine-Deposition Clearance and Effects in the Lung* 19:392-405.
- Braakhuis HM, Cassee FR, Fokkens PHB, de la Fonteyne LJJ, Oomen AG, Krystek P, et al. 2016. Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study. *Nanotoxicology* 10:63-73.

Cohen JM, Teeguarden JG, Demokritou P. 2014. An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 11:20.

Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. 1982. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 126:332-7.

DeLoid G, Cohen JM, Darrah T, Derk R, Rojanasakul L, Pyrgiotakis G, et al. 2014. Estimating the effective density of engineered nanomaterials for in vitro dosimetry. *Nature communications* 5:3514.

Demokritou P, Gass S, Pyrgiotakis G, Cohen JM, Goldsmith W, McKinney W, et al. 2013. An in vivo and in vitro toxicological characterisation of realistic nanoscale CeO₂ inhalation exposures. *Nanotoxicology* 7:1338-50.

Driscoll KE, Carter JM, Hassenbein DG, Howard B. 1997. Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect* 105:1159-64.

Duffin R, Tran L, Brown D, Stone V, Donaldson K. 2007. Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: Highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhalation Toxicol* 19:849-56.

EPA. (2004). Air quality criteria for particulate matter. National Center for Environmental Assessment-RTP Office.

Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I. 2010. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology* 4:347-63.

Geiser M, Kreyling WG. 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 7:2.

Hinderliter PM, Minard KR, Orr G, Chrisler WB, Thrall BD, Pounds JG, et al. 2010. ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Part Fibre Toxicol* 7:36.

Jing X, Park JH, Peters TM, Thorne PS. 2015. Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air-liquid interface compared with in vivo assessment. *Toxicol In Vitro* 29:502-11.

Joris F, Manshian BB, Peynshaert K, De Smedt SC, Braeckmans K, Soenen SJ. 2013. Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. *Chem Soc Rev* 42:8339-59.

Kim JS, Peters TM, O'Shaughnessy PT, Adamcakova-Dodd A, Thorne PS. 2013. Validation of an in vitro exposure system for toxicity assessment of air-delivered nanomaterials. *Toxicol In Vitro* 27:164-73.

Kim YH, Boykin E, Stevens T, Lavrich K, Gilmour MI. 2014. Comparative lung toxicity of engineered nanomaterials utilizing in vitro, ex vivo and in vivo approaches. *J Nanobiotechnol* 12.

Lehnert BE. 1992. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. *Environ Health Perspect* 97:17-46.

Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Aguerre-Chariol O, Bressot C, le Bihan O, et al. 2016. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part Fibre Toxicol* 13:58.

Massaro GD, Mortola JP, Massaro D. 1995. Sexual Dimorphism in the Architecture of the Lungs Gas-Exchange Region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1105-7.

Miller FJ. 2000. Dosimetry of particles in laboratory animals and humans in relationship to issues surrounding lung overload and human health risk assessment: A critical review. (vol 12, pg 19, 2000). *Inhalation Toxicol* 12:1257-9.

Napierska D, Thomassen LC, Vanaudenaerde B, Luyts K, Lison D, Martens JA, et al. 2012. Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles: the role of size and surface area. *Toxicol Lett* 211:98-104.

Nel A, Xia T, Meng H, Wang X, Lin S, Ji Z, et al. 2013. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc Chem Res* 46:607-21.

Oberdorster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, et al. 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*:5-74; disc 5-86.

Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-39.

Ohashi T, Pinkerton K, Ikegami M, Jobe AH. 1994. Changes in Alveolar Surface-Area, Surfactant Protein-a, and Saturated Phosphatidylcholine with Postnatal Rat Lung Growth. *Pediatr Res* 35:685-9.

Oomen AG, Bos PM, Fernandes TF, Hund-Rinke K, Boraschi D, Byrne HJ, et al. 2014. Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment--report of the NanoSafety Cluster Working Group 10. *Nanotoxicology* 8:334-48.

Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Res* 56:45-50.

Paur HR, Cassee FR, Teeguarden J, Fissan H, Diabate S, Aufderheide M, et al. 2011. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung-A dialog between aerosol science and biology. *J Aerosol Sci* 42:668-92.

Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res* 14.

Pinkerton KE, Barry BE, Oneil JJ, Raub JA, Pratt PC, Crapo JD. 1982. Morphologic Changes in the Lung during the Lifespan of Fischer 344 Rats. *Am J Anat* 164:155-74.

Rasmussen K, Mast J, De Temmerman P-J, Verleysen E, Waegeneers N, Van Steen F, et al. 2014. Titanium dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: characterisation and physico-chemical properties. *JRC Science and Policy Reports*.

Rothen-Rutishauser B, Blank F, Muhlfeld C, Gehr P. 2008. In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:1075-89.

Rushton EK, Jiang J, Leonard SS, Eberly S, Castranova V, Biswas P, et al. 2010. Concept of Assessing Nanoparticle Hazards Considering Nanoparticle Dosemetric and Chemical/Biological Response Metrics. *J Toxicol Env Heal A* 73:445-61.

Schmid O, Stoeger T. 2016. Surface area is the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung. *J Aerosol Sci* 99:133-43.

Singh C, Friedrichs S, Ceccone G, Gibson N, Jensen K, Levin M, et al. 2014. Cerium Dioxide, NM-211, NM-212, NM-213. Characterisation and test item preparation, JRC Repository: NM-series of Representative Manufactured Nanomaterials Ispra, Italy: European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection.

Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. 1992. Allometric Relationships of Cell Numbers and Size in the Mammalian Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:235-43.

Teeguarden JG, Mikheev VB, Minard KR, Forsythe WC, Wang W, Sharma G, et al. 2014. Comparative iron oxide nanoparticle cellular dosimetry and response in mice by the inhalation and liquid cell culture exposure routes. *Part Fibre Toxicol* 11.

Wong BA. 2007. Inhalation exposure systems: Design, methods and operation. *Toxicol Pathol* 35:3-14.

Wottrich R, Diabate S, Krug HF. 2004. Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int J Hyg Environ Health* 207:353-61.

Xie YM, Williams NG, Tolic A, Chrisler WB, Teeguarden JG, Maddux BLS, et al. 2012. Aerosolized ZnO Nanoparticles Induce Toxicity in Alveolar Type II Epithelial Cells at the Air-Liquid Interface. *Toxicol Sci* 125:450-61.

Tables

Table 1. Physicochemical properties of TiO₂ and CeO₂ nanomaterials.

Table 2. LOAELs (in µg/cm²) determined *in vitro* with the pro-inflammatory effects for each exposure method used (First published in Loret et al., 2016).

Table 3. LOAELs (µg/cm²) for cytotoxicity and oxidative stress effects determined after 24h of exposure.

Table 4. LOAELs (in µg/cm² for 24h exposure) determined for pro-inflammatory effects.

Table 5. LOAELs (µg/10⁶ macrophages for 24h exposure) determined for pro-inflammatory-effects.

Table 6. LOAELs (cm²/10⁶ macrophages for 24h exposure) determined for pro-inflammatory-effects.

Figures

Figure 1. Experimental conditions used for the *vitro/vivo* comparisons (adapted from Loret et al., 2016).

Figure 2. Compatibility of the different dose metrics *in vivo* and *in vitro*.

Figure 3. Cytology and cytokines levels in BALF 24h after instillation with TiO₂ and CeO₂ NMs. Data are mean ± standard deviation (n=6) (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Figure 4. LOAELs (cm²/10⁶ macrophages) for pro-inflammatory responses according to the methodologies used.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La capacité de plusieurs modèles *in vitro* plus ou moins complexes à prédire les réponses biologiques observées *in vivo* après exposition aiguë par la voie respiratoire à des NPs métalliques faiblement solubles a été évaluée dans notre étude. Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis d'apporter des clarifications quant à la qualité générale de l'outil *in vitro* pour tester la toxicité aiguës de NPs faiblement solubles au niveau pulmonaire.

Toxicité des NPs de TiO₂ et de CeO₂ à l'ALI

Nous avons montré qu'il était possible d'évaluer la toxicité de NPs de TiO₂ et de CeO₂ sur des cellules pulmonaire à l'ALI, en mettant en place un système d'exposition permettant de modéliser *in vitro* le dépôt d'aérosols de NPs sur des cellules alvéolaires. En effet, avec notre système d'exposition, nous avons observé que la quantité de NPs déposée sur les cellules était suffisante pour observer des effets toxiques. Nous avons également montré l'importance du modèle cellulaire utilisé, puisque les effets ont été observés à l'ALI en utilisant la co-culture de cellules A549 (pneumocytes) et de THP-1 (macrophages) mais pas avec la monoculture de cellules A549. Une sensibilité accrue des co-cultures par rapport aux monocultures de cellules épithéliales avait déjà été montré dans d'autres études après exposition en submergé [159-161, 194], mais pas après exposition à l'ALI.

La toxicité des NPs faiblement solubles ayant été très peu étudiée à l'ALI (Cf. contexte, § 6.4.1), il serait à l'avenir intéressant d'évaluer leur toxicité en utilisant des systèmes d'exposition différents de celui utilisé dans notre étude (Cf. contexte, § 5.2.2.2). Cela permettrait de déterminer si, à des doses déposées similaires, la réponse toxique des cellules varie en fonction du système d'exposition à l'ALI utilisé. Différents systèmes d'exposition à l'ALI ont été utilisés au cours du projet européen NANoREG, auquel cette thèse est rattachée, et de tels résultats de comparaisons devraient être présentés dans le futur, ce qui pourrait permettre de répondre à cette question.

Comparaison des réponses toxiques *in vitro*

Les résultats de toxicité générés après exposition à l'ALI ont été comparés avec ceux obtenus après exposition à des suspensions de NPs. En submergé, plusieurs méthodologies ont été

utilisées. Les co-cultures ont tout d'abord été exposées sur des inserts avec des conditions de culture et des cinétiques de dépôt similaires à celles utilisées à l'ALI (3h de dépôt continue en dynamique + 21h d'exposition statique avec les NPs déposées sur la surface). Cela a permis d'effectuer des comparaisons précises avec pour unique facteur variant le moyen d'exposition (aérosol vs suspensions). Des expositions sur des plaques ont également été effectuées, avec un dépôt continu de NPs pendant 24h, afin de générer des résultats en utilisant la méthode classiquement utilisée *in vitro* pour évaluer la toxicité des NPs.

Après 24h d'exposition, des réponses biologiques significatives ont été observées à des doses inférieures à l'ALI par rapport à en submergé. Nous avons ainsi montré dans notre étude que les cellules semblaient plus sensibles aux NPs après exposition à l'ALI par rapport à en submergé. Nous avons par ailleurs souligné la nécessité de considérer les doses réellement déposées sur les cellules pour effectuer les comparaisons entre les deux méthodes d'exposition utilisées.

L'importance de prendre en compte le débit de dose dans les expérimentations *in vitro* a en plus été montrée dans notre étude. En effet, nous avons observé en submergé que, pour des doses déposées similaires, plus le dépôt des NPs était rapide, plus les effets à 24h étaient observés à des doses faibles. Ce constat avait été fait *in vivo*, notamment après exposition de rats par instillation et inhalation de NPs de TiO₂ [150], mais jamais *in vitro*.

Il serait dans le futur très intéressant d'évaluer pourquoi les réponses biologiques ont été observées à des doses plus faibles à l'ALI par rapport à en submergé, en caractérisant de manière plus précise les interactions cellules-NPs et en étudiant par exemple l'influence de la corona sur les réponses toxiques *in vitro*.

Comparaison des réponses toxiques *in vitro* et *in vivo*

Des rats ont été exposés par aspiration intratrachéale avec des suspensions de NPs de TiO₂ et de CeO₂ et les effets toxiques ont été mesurés à 24h. Similairement à *in vitro*, nous avons montré que, parmi les marqueurs biologiques étudiés, l'inflammation était le paramètre biologique le plus sensible pour observer des effets toxiques à 24h. Des comparaisons ont ensuite été effectuées entre les résultats *in vitro* et *in vivo*, afin d'évaluer la capacité des modèles d'exposition *in vitro* utilisés à prédire les effets toxiques observés *in vivo* chez le rat après exposition pulmonaire à des NPs métalliques faiblement solubles de TiO₂ et de CeO₂. Pour effectuer les comparaisons entre le *in vitro* et le *in vivo*, les doses ont tout d'abord été exprimées en masses déposées sur les cellules ou dans les poumons par unité de surface. Cette dose métrique a été sélectionnée car il a été montré que les NPs faiblement solubles étaient

toxiques principalement de par leur activité de surface [139]. En utilisant cette dose métrique, nous avons observé des réponses toxiques significatives (principalement inflammation) à des doses plus faibles *in vivo* comparé à *in vitro*. De plus, les effets toxiques ayant été observés à des doses inférieures à l'ALI comparé au submergé, nous avons montré que la méthode ALI semblait générer des résultats plus prédictifs du *in vivo*, en terme de niveau d'activation des réponses toxiques à 24h, lorsque les résultats étaient exprimés en masse/surface.

Les résultats ont également été exprimés en masse de NPs par rapport au nombre total de macrophages. En effet, le modèle de co-culture utilisé, constitué de 1 macrophage pour 10 pneumocytes, permet de représenter *in vitro* l'organisation cellulaire à la lumière des alvéoles (Cf.contexte, §3.1.2). De plus, Teegarden et ses collaborateurs [180] ont montré une bonne corrélation entre leurs résultats d'inflammation *vivo* et *vitro* à 4h, en normalisant les doses déposées par rapport au nombre de macrophages alvéolaires. Nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'effectuer une telle normalisation était pertinent afin de comparer les réponses pro-inflammatoire à 24h, *in vivo* au niveau des alvéoles et *in vitro* sur un modèle cellulaire représentatif de l'organisation à la lumière des alvéoles. En effectuant cette normalisation, nous avons observé des réponses pro-inflammatoires *in vitro* à 24h à des niveaux d'activation plus proches du *in vivo* qu'en normalisant par rapport à la surface totale du tapis cellulaire *in vitro* ou des alvéoles *in vivo* ; et cela plus particulièrement à l'ALI et lorsque les doses ont été déposées sur les cellules en conditions submergé en 3h. Cela démontre la pertinence d'utiliser des méthodes d'exposition *in vitro* plus réalistes. Cela souligne également l'importance d'utiliser des cinétiques de dépôt similaires *in vivo* et *in vitro* afin de comparer les réponses inflammatoires entre les deux méthodologies.

De manière générale, nous avons montré l'importance de sélectionner des référentiels de dose pertinents afin de comparer le *in vivo* et le *in vitro*. D'après nos résultats, il semblerait que normaliser les doses par rapport au nombre de macrophages permettrait une bonne corrélation entre les réponses inflammatoires à 24h, *in vivo* dans les LBA des rats et *in vitro* dans les milieux de cultures des cellules en co-cultures. Néanmoins, ces résultats restent à confirmer. Pour cela, il serait nécessaire d'effectuer des expérimentations en utilisant un panel plus important de NPs faiblement solubles. De plus, il serait intéressant d'utiliser d'autres modèles cellulaires, comme par exemple des mono-cultures de macrophages, d'autres modèles de co-cultures ou encore des modèles 3-D mettant en commun des cellules épithéliales alvéolaires et des macrophages. Cela permettrait d'évaluer l'influence du modèle cellulaire utilisé sur les corrélations. Il serait également important de pouvoir comparer nos résultats par rapport à des

expositions *in vivo* par inhalation nez uniquement ou corps entier, car cela reste la méthode la plus physiologique pour évaluer la toxicité des NPs par voie respiratoire.

Classement des NPs en fonction des effets toxiques observés

En exprimant les doses en masse par unité de surface ou en masse par rapport au nombre total de macrophages, nous avons classé les NPs en fonction des niveaux d'activation des réponses toxiques à 24h. De manière intéressante, nous avons classé les NPs similairement *in vitro*, quelle que soit la méthode d'exposition utilisée. Les TiO₂ NM101 et NM105 sont apparus plus toxiques *in vitro* que le CeO₂ NM212 et le TiO₂ NM100. Par ailleurs, le CeO₂ NM212 a semblé légèrement plus toxique que le NM100. *In vivo*, nous avons pu établir un classement similaire, en distinguant néanmoins de manière plus prononcée qu'*in vitro* le NM212 et le NM100. Après 24h d'exposition, nous avons établi le classement suivant en fonction des doses minimum nécessaires pour induire une réponse pro-inflammatoire *in vivo* et *in vitro* : NM105=NM101>NM212>NM100. Nous avons ainsi montré qu'il était possible d'établir un classement assez fiable de plusieurs NPs faiblement solubles et possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes grâce aux expérimentations *in vitro*.

Pour expliquer les différences observées entre les différentes NPs utilisées dans notre étude, nous avons choisi de normaliser les doses par rapport à la surface spécifique occupée par chaque NP. Cette normalisation a été effectuée car il a été montré dans plusieurs études que les NPs faiblement solubles étaient toxiques principalement de par leur activité de surface [139, 145, 195]. En effectuant cette normalisation, nous avons observé que le NM101 était déclassé sur le plan de sa toxicité. Du fait de sa très petite taille et possédant donc une activité de surface plus importante, celui-ci aurait pu être potentiellement le plus toxique. Néanmoins, lorsque les doses en masse/cm² ou /macrophages ont été normalisées par rapport à la surface réactive de chaque NP, ce qui permet de supprimer indirectement l'influence du facteur taille pour comparer la toxicité des NPs, le NM101 est apparu moins toxique que le NM105 et le NM212. Il n'a cependant pas été possible de conclure quant à la toxicité relative du NM100, du fait de doses maximales testées plus faibles lorsque la surface active a été utilisée comme métrique de dose. En revanche, au vu des caractéristiques physico-chimiques du NM101, nous avons émis l'hypothèse que celui-ci pourrait être relativement moins toxique de par la présence d'un coating hydrophobe autour de la NP, qui n'est pas présent autour des trois autres NPs testées. Cela souligne l'importance de considérer la surface active des NPs dans le but de les classer en fonction de leur relative toxicité. Cela montre également l'influence que peut

avoir le coating sur la toxicité potentielle des NPs. Cela suggère ainsi des perspectives quant au développement de NPs dites "safer by design".

Conclusion et perspectives générales

Les outils utilisés dans notre étude ont été choisis dans le but de comparer les effets observés *in vitro* et *in vivo* après exposition aiguë. Notre approche nous a permis de mieux évaluer le fossé existant entre le *in vivo* et le *in vitro*. Nos résultats soulignent l'intérêt d'avoir recours à des méthodes *in vitro* plus complexes et plus proche de la physiologie humaine, dans le but de modéliser les potentiels effets indésirables des NPs pour l'Homme. Cela ouvre des perspectives quant à l'utilisation et au développement de modèles et de méthodologies *in vitro* de plus en plus représentatifs du *in vivo*.

En revanche, la capacité des modèles *in vitro* à prédire de potentiels effets *in vivo* au plus long terme n'a pas été évaluée dans notre étude. Il serait pour ces raisons important d'apporter à l'avenir des clarifications quant à la capacité du *in vitro* à prédire les effets *in vivo* après exposition chronique. Utiliser des modèles cellulaires et des marqueurs d'effets représentatifs de potentiels effets au long terme pourraient permettre cela. Notamment, des modèles d'épithélium reconstitués *in vitro* (C.f contexte 5.2.1.4) pourraient être exposés de manière chronique à des NPs. L'usage de ce type de modèles est d'autant plus pertinent qu'ils peuvent être exposés à l'ALI directement à des aérosols de NPs. Des potentiels effets pro-fibrotiques pourraient par ailleurs être évalués en incluant des cellules de type fibroblaste dans notre modèle cellulaire. Rechercher une potentielle atteinte de l'ADN après exposition chronique *in vitro* serait également pertinent afin de prédire de potentiels effets mutagènes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Nowack B, Ranville JF, Diamond S, Gallego-Urrea JA, Metcalfe C, Rose J, et al. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environ Toxicol Chem.* 2012;31(1):50-9.
2. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):823-39.
3. Yokel RA, Macphail RC. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *J Occup Med Toxicol.* 2011;6:7.
4. Johnston H, Pojana G, Zuin S, Jacobsen NR, Moller P, Loft S, et al. Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: potential solutions to current and future challenges. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(1):1-20.
5. Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol.* 2012;24(2):125-35.
6. Holden PA, Klaessig F, Turco RF, Priester JH, Rico CM, Avila-Arias H, et al. Evaluation of exposure concentrations used in assessing manufactured nanomaterial environmental hazards: are they relevant? *Environ Sci Technol.* 2014;48(18):10541-51.
7. Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(4):1376-83.
8. Laden F, Neas LM, Dockery DW, Schwartz J. Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. *Environ Health Perspect.* 2000;108(10):941-7.
9. Schulz H, Harder V, Ibalid-Mulli A, Khandoga A, Koenig W, Krombach F, et al. Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles. *J Aerosol Med.* 2005;18(1):1-22.
10. Ruckerl R, Schneider A, Breitner S, Cyrus J, Peters A. Health effects of particulate air pollution: A review of epidemiological evidence. *Inhalation Toxicol.* 2011;23(10):555-92.
11. Frohlich E, Salar-Behzadi S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):4795-822.
12. Clift MJ, Gehr P, Rothen-Rutishauser B. Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative. *Arch Toxicol.* 2011;85(7):723-31.
13. Oomen AG, Bos PM, Fernandes TF, Hund-Rinke K, Boraschi D, Byrne HJ, et al. Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment--report of the NanoSafety Cluster Working Group 10. *Nanotoxicology.* 2014;8(3):334-48.
14. Landsiedel R, Sauer UG, Ma-Hock L, Schnekenburger J, Wiemann M. Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(16):2557-85.
15. Nel A, Xia T, Meng H, Wang X, Lin S, Ji Z, et al. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc Chem Res.* 2013;46(3):607-21.
16. Londahl J, Moller W, Pagels JH, Kreyling WG, Swietlicki E, Schmid O. Measurement techniques for respiratory tract deposition of airborne nanoparticles: a critical review. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2014;27(4):229-54.
17. Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:2.
18. Donnelly LE. Airway Epithelial Cells (Primaries vs Cell Lines). *Methods Mol Med.* 2001;56:127-36.

19. Choi HS, Ashitate Y, Lee JH, Kim SH, Matsui A, Insin N, et al. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol.* 2010;28(12):1300-3.
20. Elder A, Vidyasagar S, DeLouise L. Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009;1(4):434-50.
21. Boland S, Hussain S, Baeza-Squiban A. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2014;6(6):641-52.
22. Braakhuis HM, Park MV, Gosens I, De Jong WH, Cassee FR. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:18.
23. Stone V, Johnston H, Schins RP. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol.* 2009;39(7):613-26.
24. Joris F, Manshian BB, Peynshaert K, De Smedt SC, Braeckmans K, Soenen SJ. Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. *Chem Soc Rev.* 2013;42(21):8339-59.
25. Paur HR, Cassee FR, Teeguarden J, Fissan H, Diabate S, Aufderheide M, et al. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung-A dialog between aerosol science and biology. *J Aerosol Sci.* 2011;42(10):668-92.
26. Schrurs F, Lison D. Focusing the research efforts. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(9):546-8.
27. Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA, Aberg C. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J Am Chem Soc.* 2013;135(4):1438-44.
28. Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, et al. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2011;133(8):2525-34.
29. Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggard T, Flanagan MB, Lynch I, et al. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS nano.* 2011;5(9):7503-9.
30. Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(12):779-86.
31. Cohen J, Deloid G, Pyrgiotakis G, Demokritou P. Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry. *Nanotoxicology.* 2013;7(4):417-31.
32. Cohen JM, Teeguarden JG, Demokritou P. An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:20.
33. Hinderliter PM, Minard KR, Orr G, Chrisler WB, Thrall BD, Pounds JG, et al. ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7(1):36.
34. Klein SG, Serchi T, Hoffmann L, Blomeke B, Gutleb AC. An improved 3D tetra-culture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10.
35. Bakand S, Hayes A. Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61(2):76-85.
36. Klein SG, Hennen J, Serchi T, Blomeke B, Gutleb AC. Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicol In Vitro.* 2011;25(8):1516-34.
37. European Commission. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official J Eur Union L.* 2011;275:38-40.

38. ISO. 2015. Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle nanIT.
39. Hansen SF, Michelson ES, Kamper A, Borling P, Stuer-Lauridsen F, Baun A. Categorization framework to aid exposure assessment of nanomaterials in consumer products. *Ecotoxicology*. 2008;17(5):438-47.
40. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Jr., Rejeski D, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol*. 2015;6:1769-80.
41. Dekali, S. (2013). Développement de modèles in vitro de la barrière alvéolo-capillaire pour l'étude de la toxicité et du passage des nanoparticules (Thèse de doctorat, Paris 5).
42. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res*. 2012;14(9).
43. Aspects juridiques et réglementaires des nanotechnologies : La déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire : analyse réglementaire et technique d'un régime en construction. *Micro et Nanotechnologies : Avancées, tendances et perspectives*; 2013.
44. Hendren CO, Mesnard X, Droge J, Wiesner MR. Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment. *Environ Sci Technol*. 2011;45(7):2562-9.
45. Rasmussen K MJ, De Temmerman P-J, Verleysen E, Waegeneers N, Van Steen F, et al. Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: characterisation and physico-chemical properties. EUR - scientific and technical research reports Luxembourg: JRC and IHCP, EUR 26637 EN Contract No: JRC 86291 2014. 2014.
46. Landmann M, Rauls E, Schmidt WG. The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO₂. *J Phys Condens Matter*. 2012;24(19):195503.
47. Honnert B, et Vincent, R. (2007). Production et utilisation industrielle des particules nanostructurées. *Hygiène et sécurité du travail*, 209.
48. Banerjee S, Gopal J, Muraleedharan P, Tyagi AK, Rai B. Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide: Visualization of bactericidal activity using atomic force microscopy. *Curr Sci*. 2006;90(10):1378-83.
49. Cassee FR, van Balen EC, Singh C, Green D, Muijser H, Weinstein J, et al. Exposure, health and ecological effects review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive. *Crit Rev Toxicol*. 2011;41(3):213-29.
50. Gottschalk F, Sun TY, Nowack B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environ Pollut*. 2013;181:287-300.
51. Liu HH, Cohen Y. Multimedia Environmental Distribution of Engineered Nanomaterials. *Environ Sci Technol*. 2014;48(6):3281-92.
52. Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanopart Res*. 2013;15(6).
53. Sun TY, Gottschalk F, Hungerbuhler K, Nowack B. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ Pollut*. 2014;185:69-76.
54. Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*. 2008;17(5):326-43.
55. Grass RN, Limbach LK, Athanassiou EK, Stark WJ. Exposure of aerosols and nanoparticle dispersions to in vitro cell cultures: A review on the dose relevance of size, mass, surface and concentration. *J Aerosol Sci*. 2010;41(12):1123-42.
56. Nowack B, Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut*. 2007;150(1):5-22.

57. Schulze C, Kroll A, Lehr CM, Schafer UF, Becker K, Schnekenburger J, et al. Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*. 2008;2(2):51-U17.
58. Ding Y, Kuhlbusch TA, Van Tongeren M, Jimenez AS, Tuinman I, Chen R, et al. Airborne engineered nanomaterials in the workplace-a review of release and worker exposure during nanomaterial production and handling processes. *J Hazard Mater*. 2016.
59. Nowack B, Brouwer C, Geertsma RE, Heugens EHW, Ross BL, Toufektsian MC, et al. Analysis of the occupational, consumer and environmental exposure to engineered nanomaterials used in 10 technology sectors. *Nanotoxicology*. 2013;7(6):1152-6.
60. Roco MC, Mirkin CA, Hersam MC. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: summary of international study. *J Nanopart Res*. 2011;13(3):897-919.
61. Maynard AD, Kuempel ED. Airborne nanostructured particles and occupational health. *J Nanopart Res*. 2005;7(6):587-614.
62. BeruBe K, Aufderheide M, Breheny D, Clothier R, Combes R, Duffin R, et al. In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Altern Lab Anim*. 2009;37(1):89-141.
63. Proud D. The pulmonary epithelium in health and disease. John Wiley and Sons Ltd2008.
64. Gehr P, Schurch S, Berthiaume Y, ImHof V, Geiser M. Particle retention in airways by surfactant. *J Aerosol Med*. 1990. 3;27-43.
65. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis*. 1982;126(2):332-7.
66. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*. 2001;2(1):33-52.
67. Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1408(2-3):79-89.
68. Wright JR, Clements JA. Metabolism and Turnover of Lung Surfactant. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136(2):426-44.
69. Crouch. Basement membranes. The lung: Scientific Foundations. J. B. W. e. a. R.G. Crystal. New-York. Raven Press. 1991. 1; 301-312.
70. Simionescu. Lung Endothelium: Structure-Function Correlates. The lung: Scientific Foundations. J. B. W. e. a. R.G. Crystal. New-York. Raven Press. 1991. 1; 301-312
71. Witschger O, Fabriès JF. Particules ultra-fines et santé au travail. Caractéristiques et effets sur la santé. *Hygiène et sécurité au travail*. 2005; ND 2227 (199): 21-35.
72. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils in Lung Defense and Injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(2):471-501.
73. Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7.
74. Cho WS, Duffin R, Thielbeer F, Bradley M, Megson IL, MacNee W, et al. Zeta Potential and Solubility to Toxic Ions as Mechanisms of Lung Inflammation Caused by Metal/Metal Oxide Nanoparticles. *Toxicol Sci*. 2012;126(2):469-77.
75. Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11:11.
76. Oberdorster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med*. 2010;267(1):89-105.
77. Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, van Ravenzwaay B, et al. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol*. 2009;21(2):102-18.

78. Husain M, Wu DM, Saber AT, Decan N, Jacobsen NR, Williams A, et al. Intratracheally instilled titanium dioxide nanoparticles translocate to heart and liver and activate complement cascade in the heart of C57BL/6 mice. *Nanotoxicology*. 2015;9(8):1013-22.
79. Zhang JC, Li B, Zhang Y, Li AG, Yu XH, Huang Q, et al. Synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis of biodistribution and pulmonary toxicity of nanoscale titanium dioxide in mice. *Analyst*. 2013;138(21):6511-6.
80. Shinohara N, Oshima Y, Kobayashi T, Imatanaka N, Nakai M, Ichinose T, et al. Pulmonary clearance kinetics and extrapulmonary translocation of seven titanium dioxide nano- and submicron materials following intratracheal administration in rats. *Nanotoxicology*. 2015;9(8):1050-8.
81. Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, Vippola M, Jensen KA, Miettinen M, et al. Airway Exposure to Silica-Coated TiO₂ Nanoparticles Induces Pulmonary Neutrophilia in Mice. *Toxicol Sci*. 2010;113(2):422-33.
82. Liang GY, Pu YP, Yin LH, Liu R, Ye B, Su YY, et al. Influence of Different Sizes of Titanium Dioxide Nanoparticles on Hepatic and Renal Functions in Rats with Correlation to Oxidative Stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*. 2009;72(11-12):740-5.
83. Nemmar A, Melghit K, Al-Salam S, Zia S, Dhanasekaran S, Attoub S, et al. Acute respiratory and systemic toxicity of pulmonary exposure to rutile Fe-doped TiO₂ nanorods. *Toxicology*. 2011;279(1-3):167-75.
84. Wu WT, Liao HY, Chung YT, Li WF, Tsou TC, Li LA, et al. Effect of nanoparticles exposure on fractional exhaled nitric oxide (FENO) in workers exposed to nanomaterials. *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):878-94.
85. Pelclova D, Zdimal V, Fenclova Z, Vlckova S, Turci F, Corazzari I, et al. Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO₂ (nano) particles. *Occup Environ Med*. 2016;73(2):110-8.
86. Pelclova D, Zdimal V, Kacer P, Fenclova Z, Vlckova S, Syslova K, et al. Oxidative stress markers are elevated in exhaled breath condensate of workers exposed to nanoparticles during iron oxide pigment production. *Journal of Breath Research*. 2016;10(1).
87. Lee JS, Choi YC, Shin JH, Lee JH, Lee Y, Park SY, et al. Health surveillance study of workers who manufacture multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*. 2015;9(6):802-11.
88. Liou SH, Tsou TC, Wang SL, Li LA, Chiang HC, Li WF, et al. Epidemiological study of health hazards among workers handling engineered nanomaterials. *J Nanopart Res*. 2012;14(8).
89. Liao HY, Chung YT, Lai CH, Wang SL, Chiang HC, Li LA, et al. Six-month follow-up study of health markers of nanomaterials among workers handling engineered nanomaterials. *Nanotoxicology*. 2014;8:100-10.
90. Liao HY, Chung YT, Lai CH, Lin MH, Liou SH. Sneezing and Allergic Dermatitis were Increased in Engineered Nanomaterial Handling Workers. *Ind Health*. 2014;52(3):199-215.
91. ANSES. (2010). Valeurs toxicologiques de référence (VTR), ANSES 2010. www.anses.fr/fr/documents/CHIM2003etAS03Ra-2.pdf.
92. Fischer HC, Chan WCW. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18(6):565-71.
93. Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. Allometric Relationships of Cell Numbers and Size in the Mammalian Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6(2):235-43.
94. Pass D FG. The rat. *Anzccart News*. 1993; 6: 1-4.

95. OCDE. ENV/JM/MONO(2012)14.
96. Cassee FR, Muijser H, Duistermaat E, Freijer JJ, Geerse KB, Marijnissen JCM, et al. Particle size-dependent total mass deposition in lungs determines inhalation toxicity of cadmium chloride aerosols in rats. Application of a multiple path dosimetry model. *Arch Toxicol.* 2002;76(5-6):277-86.
97. Wong BA. Inhalation exposure systems: Design, methods and operation. *Toxicol Pathol.* 2007;35(1):3-14.
98. Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, et al. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci.* 2000;55(1):24-35.
99. Osier M, Oberdorster G. Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol.* 1997;40(2):220-7.
100. King LS, Agre P. Man Is not a rodent: aquaporins in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(3):221-3.
101. Rothen-Rutishauser BM, Kiama SG, Gehr P. A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(4):281-9.
102. Blank F, Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Gehr P. An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *Journal of Aerosol Medicine-Deposition Clearance and Effects in the Lung.* 2006;19(3):392-405.
103. Dekali S, Gamez C, Kortulewski T, Blazy K, Rat P, Lacroix G. Assessment of an in vitro model of pulmonary barrier to study the translocation of nanoparticles. *Toxicology Reports.* 2014;1:157-71.
104. Anderson SE, Khurshid SS, Meade BJ, Lukomska E, Wells JR. Toxicological analysis of limonene reaction products using an in vitro exposure system. *Toxicol In Vitro.* 2013;27(2):721-30.
105. Boublil L, Assemat E, Borot MC, Boland S, Martinon L, Sciare J, et al. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol In Vitro.* 2013;27(2):533-42.
106. Chortarea S, Clift MJD, Vanhecke D, Endes C, Wick P, Petri-Fink A, et al. Repeated exposure to carbon nanotube-based aerosols does not affect the functional properties of a 3D human epithelial airway model. *Nanotoxicology.* 2015;9(8):983-93.
107. Clippinger AJ, Ahluwalia A, Allen D, Bonner JC, Casey W, Castranova V, et al. Expert consensus on an in vitro approach to assess pulmonary fibrogenic potential of aerosolized nanomaterials. *Arch Toxicol.* 2016;90(7):1769-83.
108. Sharma M, Nikota J, Halappanavar S, Castranova V, Rothen-Rutishauser B, Clippinger AJ. Predicting pulmonary fibrosis in humans after exposure to multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). *Arch Toxicol.* 2016;90(7):1605-22.
109. Loret T. Impact du formaldéhyde sur la réponse inflammatoire de modèles d'épithéliums de nez humains. (Thèse de pharmacie, Paris 11). 2016.
110. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology.* 2013;11:26.
111. Gasser M, Wick P, Clift MJ, Blank F, Diener L, Yan B, et al. Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential in vitro. *Part Fibre Toxicol.* 2012;9:17.
112. DeLoid G, Cohen JM, Darrach T, Derk R, Rojanasakul L, Pyrgiotakis G, et al. Estimating the effective density of engineered nanomaterials for in vitro dosimetry. *Nat Commun.* 2014;5:3514.

113. Pal AK, Bello D, Cohen J, Demokritou P. Implications of in vitro dosimetry on toxicological ranking of low aspect ratio engineered nanomaterials. *Nanotoxicology*. 2015;9(7):871-85.
114. Aufderheide M. Direct exposure methods for testing native atmospheres. *Exp Toxicol Pathol*. 2005;57:213-26.
115. Aufderheide M. An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60(2-3):163-80.
116. Schmoll LH, Elzey S, Grassian VH, O'Shaughnessy PT. Nanoparticle aerosol generation methods from bulk powders for inhalation exposure studies. *Nanotoxicology*. 2009;3(4):265-75.
117. Thorne PS. Experimental Grain Dust Atmospheres Generated by Wet and Dry Aerosolization Techniques. *Am J Ind Med*. 1994;25(1):109-12.
118. Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, et al. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci*. 2004;77(2):347-57.
119. Cosnier F BS, Grossmann S, Nunge H, Brochard C, Viton S, Payet R, Witschger O, Gaté L. Design and Characterization of an Inhalation System to Expose Rodents to Nanoaerosols. *Aerosol and Air Quality Research*. 2016.
120. Morgeneyer M, Le Bihan O, Ustache A, Aguerre-Chariol O. Experimental study of the aerosolization of fine alumina particles from bulk by a vortex shaker. *Powder Technol*. 2013;246:583-9.
121. Frohlich E, Bonstingl G, Hofler A, Meindl C, Leitinger G, Pieber TR, et al. Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicol In Vitro*. 2013;27(1):409-17.
122. Lenz AG, Karg E, Lentner B, Dittrich V, Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, et al. A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6.
123. Kim JS, Peters TM, O'Shaughnessy PT, Adamcakova-Dodd A, Thorne PS. Validation of an in vitro exposure system for toxicity assessment of air-delivered nanomaterials. *Toxicol In Vitro*. 2013;27(1):164-73.
124. Xie YM, Williams NG, Tolic A, Chrisler WB, Teeguarden JG, Maddux BLS, et al. Aerosolized ZnO Nanoparticles Induce Toxicity in Alveolar Type II Epithelial Cells at the Air-Liquid Interface. *Toxicol Sci*. 2012;125(2):450-61.
125. Jeannet N, Fierz M, Kalberer M, Burtscher H, Geiser M. Nano aerosol chamber for in-vitro toxicity (NACIVT) studies. *Nanotoxicology*. 2015;9(1):34-42.
126. Savi M, Kalberer M, Lang D, Ryser M, Fierz M, Gaschen A, et al. A novel exposure system for the efficient and controlled deposition of aerosol particles onto cell cultures. *Environ Sci Technol*. 2008;42(15):5667-74.
127. Brossell D, Troller S, Dziurawicz N, Plitzko S, Linsel G, Asbach C, et al. A thermal precipitator for the deposition of airborne nanoparticles onto living cells-Rationale and development. *J Aerosol Sci*. 2013;63:75-86.
128. Guide_méthologique_CEA_INERIS_INRS. Recommandations en matière de caractérisation des potentiels d'émission et d'exposition professionnelle aux aérosols lors d'opérations mettant en oeuvre des nanomatériaux. Guide méthodologique. 2011.
129. INERIS. Exposition par inhalation aux aérosols. Principes et méthodes de mesures. 2004.
130. Witschger O, Fabriès JF. Particules ultra-fines et santé au travail. Sources et caractérisation de l'exposition. *Hygiène et sécurité au travail*. 2005; ND 2228 (199): 37-54.
131. Amodeo T, Dutouquet C, Le Bihan O, Attoui M, Frejafon E. On-line determination of nanometric and sub-micrometric particle physicochemical characteristics using spectral

- imaging-aided Laser-Induced Breakdown Spectroscopy coupled with a Scanning Mobility Particle Sizer. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*. 2009;64(10):1141-52.
132. Elihn K, Cronholm P, Karlsson HL, Midander K, Wallinder IO, Moller L. Cellular Dose of Partly Soluble Cu Particle Aerosols at the Air-Liquid Interface Using an In Vitro Lung Cell Exposure System. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2013;26(2):84-93.
133. Comouth A, Saathoff H, Naumann KH, Muelhopt S, Paur HR, Leisner T. Modelling and measurement of particle deposition for cell exposure at the air-liquid interface. *J Aerosol Sci*. 2013;63:103-14.
134. Bitterle E, Karg E, Schroepel A, Kreyling WG, Tippe A, Ferron GA, et al. Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere*. 2006;65(10):1784-90.
135. Endes C, Schmid O, Kinnear C, Mueller S, Camarero-Espinosa S, Vanhecke D, et al. An in vitro testing strategy towards mimicking the inhalation of high aspect ratio nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11.
136. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311(5761):622-7.
137. Wang JX, Fan YB. Lung Injury Induced by TiO₂ Nanoparticles Depends on Their Structural Features: Size, Shape, Crystal Phases, and Surface Coating. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(12):22258-78.
138. Sager TM, Kommineni C, Castranova V. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol*. 2008;5.
139. Duffin R, Tran L, Brown D, Stone V, Donaldson K. Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: Highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhalation Toxicol*. 2007;19(10):849-56.
140. Scherbart AM, Langer J, Bushmelev A, van Berlo D, Haberzettl P, van Schooten FJ, et al. Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. *Part Fibre Toxicol*. 2011;8.
141. Donaldson K, Poland CA. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(4):724-34.
142. Xia T, Kovochich M, Liang M, Madler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano*. 2008;2(10):2121-34.
143. Cho WS, Duffin R, Poland CA, Howie SEM, MacNee W, Bradley M, et al. Metal Oxide Nanoparticles Induce Unique Inflammatory Footprints in the Lung: Important Implications for Nanoparticle Testing. *Environ Health Perspect*. 2010;118(12):1699-706.
144. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. Nanotoxicology. *Occup Environ Med*. 2004;61(9):727-8.
145. Schmid O, Stoeger T. Surface area is the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung. *J Aerosol Sci*. 2016;99:133-43.
146. Demokritou P, Gass S, Pyrgiotakis G, Cohen JM, Goldsmith W, McKinney W, et al. An in vivo and in vitro toxicological characterisation of realistic nanoscale CeO₂ inhalation exposures. *Nanotoxicology*. 2013;7(8):1338-50.
147. Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*. 2010;4(4):347-63.
148. Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Bergamaschi A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(5):481-508.

149. Schinwald A, Murphy FA, Prina-Mello A, Poland CA, Byrne F, Movia D, et al. The Threshold Length for Fiber-Induced Acute Pleural Inflammation: Shedding Light on the Early Events in Asbestos-Induced Mesothelioma. *Toxicol Sci.* 2012;128(2):461-70.
150. Baisch BL, Corson NM, Wade-Mercer P, Gelein R, Kennell AJ, Oberdorster G, et al. Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11.
151. Silva RM, TeeSy C, Franzi L, Weir A, Westerhoff P, Evans JE, et al. Biological Response to Nano-Scale Titanium Dioxide (TiO₂): Role of Particle Dose, Shape, and Retention. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues.* 2013;76(16):953-72.
152. Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, Hahn D, Schnekenburger J, Wiench K, et al. Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Adv Mater.* 2010;22(24):2601-27.
153. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:15.
154. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 93, Carbon black, Titanium Dioxide and Talc. (2010). WHO Press.
155. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan W, El Ghissassi F, Coglianò V, et al. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol.* 2006;7(4):295-6.
156. Panas A, Marquardt C, Nalcaci O, Bockhorn H, Baumann W, Paur HR, et al. Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology.* 2013;7(3):259-73.
157. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, et al. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6.
158. Prasad RY, Wallace K, Daniel KM, Tennant AH, Zucker RM, Strickland J, et al. Effect of treatment media on the agglomeration of titanium dioxide nanoparticles: impact on genotoxicity, cellular interaction, and cell cycle. *ACS nano.* 2013;7(3):1929-42.
159. Dekali S, Divetain A, Kortulewski T, Vanbaelinghem J, Gamez C, Rogerieux F, et al. Cell cooperation and role of the P2X(7) receptor in pulmonary inflammation induced by nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2013;7(8):1302-14.
160. Wottrich R, Diabate S, Krug HF. Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int J Hyg Environ Health.* 2004;207(4):353-61.
161. Napierska D, Thomassen LC, Vanaudenaerde B, Luyts K, Lison D, Martens JA, et al. Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles: the role of size and surface area. *Toxicol Lett.* 2012;211(2):98-104.
162. Guadagnini R, Halamoda Kenzaoui B, Walker L, Pojana G, Magdolenova Z, Bilanicova D, et al. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology.* 2015;9 Suppl 1:13-24.
163. 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 1:115-22.
164. Yokel RA, Hussain S, Garantziotis S, Demokritou P, Castranova V, Cassee FR. The Yin: An adverse health perspective of nanoceria: uptake, distribution, accumulation, and mechanisms of its toxicity. *Environ Sci Nano.* 2014;1(5):406-28.

165. Ma JY, Zhao H, Mercer RR, Barger M, Rao M, Meighan T, et al. Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. *Nanotoxicology*. 2011;5(3):312-25.
166. Srinivas A, Rao PJ, Selvam G, Murthy PB, Reddy PN. Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicol Lett*. 2011;205(2):105-15.
167. Dunnick KM, Morris AM, Badding MA, Barger M, Stefaniak AB, Sabolsky EM, et al. Evaluation of the effect of valence state on cerium oxide nanoparticle toxicity following intratracheal instillation in rats. *Nanotoxicology*. 2016;10(7):992-1000.
168. Aalapati S, Ganapathy S, Manapuram S, Anumolu G, Prakya BM. Toxicity and bio-accumulation of inhaled cerium oxide nanoparticles in CD1 mice. *Nanotoxicology*. 2014;8(7):786-98.
169. Keller J, Wohlleben W, Ma-Hock L, Strauss V, Groters S, Kuttler K, et al. Time course of lung retention and toxicity of inhaled particles: short-term exposure to nano-Ceria. *Arch Toxicol*. 2014;88(11):2033-59.
170. Gosens I, Mathijssen LE, Bokkers BG, Muijser H, Cassee FR. Comparative hazard identification of nano- and micro-sized cerium oxide particles based on 28-day inhalation studies in rats. *Nanotoxicology*. 2014;8(6):643-53.
171. Ma JY, Mercer RR, Barger M, Schwegler-Berry D, Scabilloni J, Ma JK, et al. Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;262(3):255-64.
172. Keller J. Biokinetics and Inhalation Toxicity of Cerium Dioxide and Barium Sulfate Nanoparticles after 1, 4, 13 and 52 Weeks of Exposure. Doctoral thesis, faculty of veterinary medicine Justus Liebig University of Gießen, Germany. 2015.
173. Kroll A, Dierker C, Rommel C, Hahn D, Wohlleben W, Schulze-Isfort C, et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part Fibre Toxicol*. 2011;8:9.
174. Mittal S, Pandey AK. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:891934.
175. Lin W, Huang YW, Zhou XD, Ma Y. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol*. 2006;25(6):451-7.
176. Landsiedel R, Ma-Hock L, Hofmann T, Wiemann M, Strauss V, Treumann S, et al. Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11.
177. Morrow PE, Haseman JK, Hobbs CH, Driscoll KE, Vu V, Oberdorster G. The maximum tolerated dose for inhalation bioassays: Toxicity vs overload. *Fundam Appl Toxicol*. 1996;29(2):155-67.
178. Borm P, Cassee FR, Oberdorster G. Lung particle overload: old school - new insights? *Part Fibre Toxicol*. 2015;12.
179. Borm PYA, Costa D, Castranova V, Donaldson K, Driscoll K, Dungworth D, et al. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: A workshop consensus report. *Inhalation Toxicol*. 2000;12(1-2):1-17.
180. Teeguarden JG, Mikheev VB, Minard KR, Forsythe WC, Wang W, Sharma G, et al. Comparative iron oxide nanoparticle cellular dosimetry and response in mice by the inhalation and liquid cell culture exposure routes. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11.
181. Stoeger T, Schmid O, Takenaka S, Schulz H. Inflammatory response to TiO₂ and Carbonaceous particles scales best with BET surface area. *Environ Health Perspect*. 2007;115(6):A290-A1.
182. Schmid O, Stoeger T. Surface area is the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung *J Aerosol Sci*. 2016;In press.

183. Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci.* 2007;97(1):163-80.
184. Rushton EK, Jiang J, Leonard SS, Eberly S, Castranova V, Biswas P, et al. Concept of Assessing Nanoparticle Hazards Considering Nanoparticle Dosemetric and Chemical/Biological Response Metrics. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues.* 2010;73(5-6):445-61.
185. Kim YH, Boykin E, Stevens T, Lavrich K, Gilmour MI. Comparative lung toxicity of engineered nanomaterials utilizing in vitro, ex vivo and in vivo approaches. *J Nanobiotechnol.* 2014;12.
186. Donaldson K, Borm PJA, Oberdorster G, Pinkerton KE, Stone V, Tran CL. Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: The key role of the proximal alveolar region. *Inhalation Toxicol.* 2008;20(1):53-62.
187. Rach J, Budde J, Mohle N, Aufderheide M. Direct exposure at the air-liquid interface: evaluation of an in vitro approach for simulating inhalation of airborne substances. *J Appl Toxicol.* 2014;34(5):506-15.
188. Steinritz D, Mohle N, Pohl C, Papritz M, Stenger B, Schmidt A, et al. Use of the Cultex (R) Radial Flow System as an in vitro exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility. *Chem-Biol Interact.* 2013;206(3):479-90.
189. Panas A, Comouth A, Saathoff H, Leisner T, Al-Rawi M, Simon M, et al. Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein Journal of Nanotechnology.* 2014;5:1590-602.
190. Herzog F, Loza K, Balog S, Clift MJD, Epple M, Gehr P, et al. Mimicking exposures to acute and lifetime concentrations of inhaled silver nanoparticles by two different in vitro approaches. *Beilstein Journal of Nanotechnology.* 2014;5:1357-70.
191. Lenz AG, Karg E, Brendel E, Hinze-Heyn H, Maier KL, Eickelberg O, et al. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. *Biomed Res Int.* 2013;2013:652632.
192. Singh C FS, Ceccone G, Gibson N, Jensen KA, Levin M, Infante HG., Carlander D, Rasmussen K. Cerium dioxide, NM-211, NM-212, NM-213: characterisation and test item preparation. EUR - scientific and technical research reports Luxembourg: JRC and ICHP, EUR 26649 EN Contract No: JRC89825. 2014.
193. Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Aguerre-Chariol O, Bressot C, le Bihan O, et al. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13(1):58.
194. Rothen-Rutishauser B, Blank F, Muhlfeld C, Gehr P. In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(8):1075-89.
195. Braakhuis HM, Cassee FR, Fokkens PHB, de la Fonteyne LJJ, Oomen AG, Krystek P, et al. Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study. *Nanotoxicology.* 2016;10(1):63-73.
196. Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment - issues and recommendations. *Nanotoxicology.* 2011;5(4):711-29.

ANNEXES

Annexe 1

Article 1

Estimation of the energy delivered to the NM suspensions using a sonicator equipped with a cup horn.

Methods

To estimate the energy delivered to the NM suspensions using a cup horn sonicator, we measured the cooling rate of a sample of Milli-Q water, in the cup of a cup horn connected to a 4°C ice bath. After reaching 19°C, the temperature of the sample was recorded every 15 s for 1 min (n=3) in the absence of or with sonication (1 min, amplitude 100). We assumed that a decrease in the cooling rate was caused by the energy delivered to the sample through sonication. Once the cooling rate became linear (at around 14°C), we measured the difference in temperature between sonicated and non-sonicated samples and plotted the differential cooling rate on a graph and measured the slope. We then used the equation proposed by Taurozzi et al. [196] to measure the power delivered to the sample:

Power = differential cooling rate slope (K/s) * mass of liquid (g) * specific heat of the liquid (4.18 J/g*K for water)

Results

The differential cooling rate curve was plotted and we obtained a linear fit ($R^2 = 0.99$). The slope of the curve was determined (0.0322 K/s). According to the mass of liquid in the sample (6 g) and the specific heat of the liquid (4.18 J/g*K), the power delivered to the sample was calculated (0.81 J/s). Then, the total energy delivered to the sample (97 J) was calculated according to the time of sonication (120 s).

Annexe 2

Article 1

Tables of results

Table S1. Alamar blue results expressed in percentage of functionality compared to control.

| Exposure method | Cell model | Dose | NM105 | | | NM101 | | | NM100 | | | NM212 | | |
|-------------------------|-----------------|------------------------------|----------|-------|---|--------|-------|---|--------|------|---|---------|------|---|
| | | | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n |
| ALI | A549 | 0 | 100.00 | 1.43 | 8 | 100.00 | 1.23 | 9 | 100.00 | 1.83 | 9 | 100.00 | 1.03 | 9 |
| | | 3 (µg/cm ²) | 97.87 | 5.00 | 8 | 100.40 | 1.35 | 9 | 93.42 | 5.77 | 9 | 99.72 | 1.04 | 9 |
| | | incubator | 99.94 | 3.51 | 9 | 100.40 | 1.35 | 9 | 102.10 | 2.33 | 9 | 100.50 | 2.07 | 9 |
| | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 4.42 | 9 | 100.00 | 4.65 | 9 | 100.00 | 2.02 | 9 | 100.00 | 3.05 | 9 |
| | | 0.1 (µg/cm ²) | 105.20 | 11.56 | 9 | 103.70 | 3.99 | 9 | 98.63 | 2.27 | 9 | 100.60 | 3.13 | 9 |
| | | incubator | 109.60 | 8.49 | 9 | 103.40 | 3.84 | 6 | 99.96 | 2.59 | 9 | 103.20 | 4.43 | 9 |
| | | 0 | 100.00 | 4.90 | 9 | 100.00 | 5.79 | 9 | 100.00 | 0.46 | 9 | 100.00 | 2.40 | 9 |
| | | 1 (µg/cm ²) | 98.20 | 4.75 | 9 | 111.40 | 12.49 | 9 | 98.70 | 4.12 | 9 | 101.80 | 1.68 | 9 |
| | | incubator | 103.60 | 1.96 | 9 | 111.20 | 13.35 | 9 | 101.10 | 2.00 | 9 | 103.10 | 3.44 | 9 |
| | | 0 | 100.00 | 5.296 | 9 | 100.00 | 8.20 | 9 | 100.00 | 5.72 | 9 | 100.00 | 3.17 | 9 |
| | | 3 (µg/cm ²) | 97.59 | 9.44 | 9 | 105.10 | 10.48 | 9 | 103.70 | 4.45 | 9 | 96.82 | 5.00 | 9 |
| | | incubator | 109.80 | 12.80 | 8 | 108.70 | 7.09 | 9 | 108.70 | 9.30 | 9 | 103.90 | 3.85 | 9 |
| Submerged in inserts | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 1.48 | 9 | 100.00 | 1.33 | 9 | 100.00 | 2.09 | 9 | 100.00 | 1.37 | 9 |
| | | 1 (µg/cm ²) | 99.01 | 1.92 | 9 | 100.70 | 0.76 | 9 | 98.55 | 2.10 | 9 | 100.00 | 1.40 | 9 |
| | | 3 (µg/cm ²) | 98.99 | 2.42 | 9 | 99.94 | 1.36 | 9 | 98.96 | 0.74 | 9 | 98.99 | 1.87 | 9 |
| | | 10 (µg/cm ²) | 94.74** | 3.43 | 9 | 99.23 | 0.87 | 9 | 98.25 | 0.96 | 9 | 96.74** | 3.04 | 9 |
| Submerged in plates | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 0.41 | 9 | 100.00 | 0.81 | 9 | 100.00 | 1.62 | 9 | 100.00 | 4.75 | 9 |
| | | 1 (µg/cm ²) | 98.49 | 2.48 | 9 | 100.70 | 3.64 | 9 | 97.35 | 4.91 | 9 | 102.20 | 5.12 | 9 |
| | | 3 (µg/cm ²) | 96.06* | 2.04 | 9 | 98.47 | 2.51 | 9 | 101.00 | 8.70 | 9 | 98.28 | 2.77 | 9 |
| | | 10 (µg/cm ²) | 93.59*** | 3.10 | 9 | 97.58 | 2.55 | 9 | 97.88 | 8.52 | 9 | 95.99* | 3.81 | 9 |
| | | 20 (µg/cm ²) | 89.86*** | 5.51 | 9 | 96.87* | 2.17 | 9 | 99.43 | 9.12 | 9 | 97.87 | 2.60 | 9 |

Table S2. LDH results expressed in percentage of integrity compared to control.

| Exposure method | Cell model | Dose | NM105 | | | NM101 | | | NM100 | | | NM212 | | | |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---------|------|----------|--------|------|----------|--------|------|--------|--------|------|---|
| | | | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | |
| ALI | A549 | 0 | 100.00 | 1.78 | 8 | 100.00 | 0.592 | 9 | 100.00 | 3.43 | 9 | 100.00 | 0.38 | 9 | |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 100.90 | 2.63 | 8 | 99.95 | 0.43 | 9 | 90.04 | 14.65 | 9 | 100.3 | 0.54 | 9 | |
| | | incubator | 100.5 | 12.04 | 9 | 99.95 | 0.43 | 9 | 100.1 | 5.33 | 9 | 99.3 | 1.58 | 9 | |
| | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 1.58 | 9 | 100.00 | 1.39 | 9 | 100.00 | 0.95 | 9 | 100.00 | 1.03 | 9 | |
| | | 0.1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 98.86 | 3.90 | 9 | 99.85 | 2.33 | 9 | 98.60 | 2.20 | 9 | 100.3 | 0.68 | 9 | |
| | | incubator | 103 | 2.54 | 9 | 99.05 | 5.96 | 9 | 99.39 | 3.59 | 9 | 97.07 | 5.08 | 9 | |
| | | 0 | 100 | 1.439 | 9 | 100.00 | 1.39 | 9 | 100.00 | 0.92 | 9 | 100.00 | 1.25 | 9 | |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 97.71* | 2.821 | 9 | 99.97 | 1.24 | 9 | 99.04 | 2.33 | 9 | 103.5 | 4.59 | 9 | |
| | | incubator | 99.89 | 0.95 | 9 | 96.65 | 7.32 | 9 | 99.80 | 3.72 | 9 | 103.40 | 5.84 | 9 | |
| | Submerged in inserts | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 0.67 | 9 | 100.00 | 0.34 | 9 | 100.00 | 0.84 | 9 | 100.00 | 0.90 | 9 |
| | | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 97.09 | 2.40 | 8 | 98.93 | 2.33 | 9 | 99.09 | 0.91 | 9 | 99.86 | 0.94 | 9 |
| | | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 95.38** | 1.76 | 9 | 97.04* | 1.76 | 9 | 98.77 | 0.91 | 9 | 99.43 | 1.32 | 9 |
| 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | | | 66.92*** | 3.79 | 9 | 88.06*** | 4.38 | 9 | 95.62*** | 2.61 | 9 | 97.9** | 1.07 | 9 | |
| Submerged in plates | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 0.25 | 9 | 100.00 | 0.45 | 9 | 100.00 | 0.43 | 9 | 100.00 | 0.84 | 9 | |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 100.1 | 0.75 | 9 | 99.62 | 1.37 | 9 | 99.21 | 1.30 | 9 | 99.93 | 1.05 | 9 | |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 99.66 | 0.50 | 9 | 99.2 | 0.66 | 9 | 100.5 | 0.57 | 9 | 98.58 | 1.54 | 9 | |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 96.87** | 2.22 | 9 | 97.79** | 1.04 | 9 | 99.9 | 1.06 | 9 | 98.73 | 1.64 | 9 | |
| | | 20 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 88.68*** | 10.74 | 9 | 96.21*** | 0.72 | 9 | 99.86 | 0.35 | 9 | 98.99 | 1.71 | 9 | |
| | | incubator | | | | | | | | | | | | | |

Table S3. DCF results expressed in percentage of intracellular ROS compared to control.

| Exposure method | Cell model | Dose | NM105 | | | NM101 | | | NM100 | | | NM212 | | |
|-------------------------|-----------------|--------------------------------------|----------|------|---|----------|------|------|----------|------|---|----------|-------|---|
| | | | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n |
| ALI | A549 | 0 | 100.00 | 3.80 | 8 | 100.00 | 2.52 | 9.00 | 100.00 | 6.88 | 9 | 100.00 | 6.10 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 99.8 | 12.6 | 8 | 104.20 | 2.5 | 9 | 94.5 | 10.8 | 9 | 94.2 | 3.3 | 9 |
| | | H ₂ O ₂ | 176.2** | 16.0 | 9 | 129.8*** | 15.6 | 6 | 131.9** | 14.5 | 6 | 163.8* | 14.5 | 6 |
| | A549 + THP-1 | 0 | 100.0 | 4.0 | 9 | 100.0 | 7.1 | 9 | 100.0 | 10.5 | 9 | 100.0 | 9.7 | 9 |
| | | 0.1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 107.5 | 9.6 | 9 | 102.5 | 7.6 | 9 | 98.6 | 3.4 | 9 | 93.7 | 9.7 | 9 |
| | | H ₂ O ₂ | 197.9*** | 22.5 | 6 | 147.3** | 42.1 | 6 | 157.7*** | 19.0 | 6 | 166.7** | 22.2 | 6 |
| | | 0 | 100.0 | 5.8 | 9 | 100.0 | 4.4 | 9 | 100.0 | 4.4 | 9 | 100.0 | 3.5 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 106.4 | 11.6 | 9 | 112.1* | 8.1 | 9 | 100.0 | 4.6 | 9 | 101.0 | 7.4 | 9 |
| | | H ₂ O ₂ | 215.4*** | 45.4 | 9 | 170.9*** | 11.2 | 4 | 142.8** | 11.1 | 6 | 203.5** | 76.2 | 6 |
| | | 0 | 100.0 | 6.1 | 9 | 100.0 | 6.9 | 9 | 100.0 | 9.9 | 9 | 100.0 | 6.3 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 116.7 | 31.3 | 9 | 122.8** | 14.9 | 9 | 97.2 | 20.3 | 9 | 112.6 | 13.0 | 9 |
| | | H ₂ O ₂ | 195.8** | 39.9 | 3 | 133.1** | 27.2 | 6 | 187.9** | 56.3 | 6 | 247.8*** | 125.8 | 7 |
| Submerged in inserts | A549 + THP-1 | 0 | 100.0 | 2.3 | 9 | 100.0 | 2.1 | 9 | 100.0 | 3.0 | 9 | 100.0 | 4.5 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 106.6 | 7.9 | 8 | 102.9 | 5.8 | 9 | 104.1 | 6.4 | 9 | 96.4 | 4.4 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 112.4 | 12.2 | 9 | 111.0 | 18.1 | 9 | 111.1 | 12.1 | 9 | 95.2 | 8.0 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 116.4* | 9.7 | 9 | 111.5 | 20.7 | 9 | 113.7* | 8.7 | 9 | 93.6 | 4.3 | 9 |
| | | H ₂ O ₂ | 180.1*** | 11.1 | 8 | 180.1*** | 11.1 | 8 | 180.1*** | 11.1 | 8 | 180.1 | 11.1 | 8 |
| Submerged in plates | A549 + THP-1 | 0 | 100.0 | 6.4 | 9 | 100.0 | 9.9 | 9 | 100.0 | 10.5 | 9 | 100.0 | 4.6 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 96.2 | 11.4 | 9 | 99.5 | 13.8 | 9 | 84.4 | 11.7 | 9 | 91.9 | 10.1 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 113.4 | 17.6 | 9 | 111.3 | 19.7 | 9 | 90.4 | 17.0 | 9 | 96.4 | 10.2 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 150** | 12.5 | 9 | 112.0 | 33.2 | 9 | 94.3 | 13.2 | 9 | 98.3 | 20.6 | 9 |
| | | 20 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 172.2*** | 43.7 | 9 | 143.3 | 55.7 | 9 | 113.6 | 22.4 | 9 | 105.1 | 21.0 | 9 |
| | | H ₂ O ₂ | 155.9** | 13.8 | 7 | 129.4 | 15.0 | 3 | 174.2* | 23.8 | 7 | 151.2* | 16.0 | 7 |

Table S4. IL-1 β results expressed in percentage compared to control.

| Exposure method | Cell model | Dose | NM105 | | | NM101 | | | NM100 | | | NM212 | | |
|--|--------------|--------------------------------------|----------|---------|---|----------|---------|---|----------|---------|---|----------|---------|---|
| | | | Mean | SD | n |
| ALI. secretion in Basal side | A549 | 0 | 100.00 | 8.28 | 9 | 100.00 | 20.48 | 9 | 100.00 | 20.25 | 9 | 100.00 | 9.46 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 106.30 | 15.01 | 9 | 93.96 | 18.06 | 9 | 103.80 | 28.36 | 9 | 99.42 | 26.82 | 9 |
| | | LPS | 150** | 20.28 | 6 | 139.2* | 34.65 | 6 | 142.1** | 9.78 | 6 | 155.4* | 17.33 | 5 |
| | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 9.45 | 9 | 100.00 | 16.70 | 9 | 100.00 | 37.69 | 9 | 100.00 | 64.13 | 9 |
| | | 0.1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 101.50 | 10.59 | 8 | 95.13 | 47.84 | 9 | 126.30 | 30.00 | 9 | 96.76 | 33.28 | 9 |
| | | LPS | 828*** | 153.70 | 9 | 1037.00 | 1063.00 | 4 | 384.8* | 115.60 | 4 | 1469** | 146.80 | 6 |
| | | 0 | 100.00 | 20.84 | 9 | 100.00 | 33.85 | 9 | 100.00 | 48.39 | 9 | 100.00 | 29.48 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 269.2* | 141.90 | 9 | 535.1** | 130.80 | 9 | 159.40 | 22.41 | 9 | 105.80 | 17.58 | 9 |
| | | LPS | 1231*** | 571.60 | 6 | 1625*** | 776.40 | 6 | 718.5*** | 237.90 | 6 | 991.1** | 477.40 | 5 |
| | | 0 | 100.00 | 13.31 | 9 | 100.00 | 26.31 | 9 | 100.00 | 8.68 | 9 | 100.00 | 42.19 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 292.4** | 146.60 | 9 | 153.50 | 51.72 | 9 | 333.80 | 202.10 | 9 | 208.8* | 67.11 | 9 |
| | | LPS | 1558*** | 565.20 | 5 | 1395*** | 491.80 | 5 | 1880*** | 147.00 | 6 | 730.5*** | 149.40 | 6 |
| Submerged in inserts. secretion in Basal side | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 8.87 | 9 | 100.00 | 9.09 | 9 | 100.00 | 8.90 | 9 | 100.00 | 15.48 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 122.30 | 26.71 | 9 | 112.00 | 25.12 | 9 | 95.54 | 10.15 | 9 | 103.70 | 10.71 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 148.00 | 18.84 | 9 | 123.20 | 19.94 | 9 | 94.08 | 18.07 | 9 | 93.31 | 11.89 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 241.4*** | 68.80 | 9 | 159.7** | 45.70 | 9 | 122.70 | 32.64 | 9 | 118.20 | 24.36 | 9 |
| | | LPS | 826.7*** | 454 | 9 | 826.7*** | 454 | 9 | 826.7** | 454 | 9 | 826.7*** | 454.00 | 9 |
| Submerged in inserts. secretion in Apical side | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 11.21 | 9 | 100.00 | 7.41 | 9 | 100.00 | 8.20 | 9 | 100.00 | 10.64 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 135.90 | 31.82 | 9 | 107.40 | 10.42 | 9 | 101.60 | 15.43 | 9 | 103.70 | 11.74 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 163.1*** | 24.48 | 9 | 123.20 | 11.36 | 9 | 117.40 | 14.53 | 9 | 107.20 | 23.05 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 323.8*** | 94.47 | 9 | 194.8*** | 42.67 | 9 | 132.40 | 32.18 | 9 | 137.30 | 28.33 | 9 |
| | | LPS | 2443*** | 1597.00 | 9 | 2443*** | 1597.00 | 9 | 2443*** | 1597.00 | 9 | 2443*** | 1597.00 | 9 |
| Submerged in plates | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 8.43 | 9 | 100.00 | 12.69 | 9 | 100.00 | 10.88 | 9 | 100.00 | 12.01 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 160.30 | 128.20 | 9 | 101.70 | 10.53 | 9 | 102.10 | 95.20 | 9 | 94.64 | 18.85 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 131.30 | 32.07 | 9 | 152.50 | 29.58 | 9 | 87.23 | 39.81 | 9 | 192.50 | 160.10 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 160.6* | 48.46 | 9 | 249.2** | 78.65 | 9 | 66.49 | 35.25 | 9 | 200.30 | 154.80 | 9 |
| | | 20 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 221.7*** | 39.83 | 9 | 371.6*** | 190.30 | 9 | 123.30 | 32.50 | 9 | 268.90 | 243.30 | 9 |
| | | LPS | 1559*** | 2208.00 | 8 | 2216*** | 1706.00 | 6 | 1675.00 | 1273.00 | 4 | 2406*** | 2849.00 | 9 |

Table S5. IL-6 results expressed in percentage compared to control.

| Exposure method | Cell model | Dose | NM105 | | | NM101 | | | NM100 | | | NM212 | | |
|--|--------------|--------------------------------------|----------|---------|---|----------|---------|---|----------|---------|---|----------|---------|---|
| | | | Mean | SD | n |
| ALI. secretion in Basal side | A549 | 0 | 100.00 | 13.09 | 9 | 100.00 | 11.56 | 9 | 100.00 | 27.99 | 9 | 100.00 | 17.08 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 113.00 | 30.30 | 9 | 98.47 | 15.11 | 9 | 108.60 | 34.36 | 9 | 112.10 | 61.55 | 9 |
| | | LPS | 297.5*** | 145.50 | 6 | 237.3** | 34.86 | 6 | 209.9*** | 39.64 | 6 | 292.4** | 65.62 | 6 |
| | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 5.70 | 9 | 100.00 | 24.41 | 9 | 100.00 | 41.92 | 9 | 100.00 | 61.17 | 9 |
| | | 0.1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 105.30 | 33.96 | 8 | 96.41 | 75.82 | 9 | 103.30 | 31.84 | 9 | 123.10 | 48.41 | 9 |
| | | LPS | 5342** | 2229.00 | 9 | 2334* | 2418.00 | 4 | 260.5* | 113.60 | 4 | 1262*** | 498.60 | 6 |
| | | 0 | 100.00 | 29.64 | 9 | 100.00 | 25.97 | 9 | 100.00 | 65.32 | 9 | 100.00 | 21.69 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 327.8* | 120.90 | 9 | 331** | 104.50 | 9 | 205.00 | 49.54 | 9 | 109.20 | 26.14 | 9 |
| | | LPS | 1436*** | 383.30 | 6 | 981.5*** | 522.60 | 6 | 1133*** | 230.60 | 6 | 1549** | 1168.00 | 6 |
| | | 0 | 100.00 | 20.65 | 9 | 100.00 | 24.11 | 9 | 100.00 | 27.50 | 9 | 100.00 | 38.07 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 668*** | 467.70 | 9 | 164.9* | 39.00 | 9 | 447.4* | 328.40 | 9 | 206.7* | 69.10 | 9 |
| | | LPS | 7606*** | 3019.00 | 5 | 1805*** | 518.30 | 6 | 4896*** | 1758.00 | 6 | 641.1*** | 97.49 | 6 |
| Submerged in inserts. secretion in Basal side | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 11.11 | 9 | 100.00 | 9.97 | 9 | 100.00 | 8.02 | 9 | 100.00 | 17.09 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 163.20 | 60.43 | 9 | 113.70 | 16.96 | 9 | 124.40 | 20.95 | 6 | 91.86 | 16.34 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 209.10 | 59.40 | 9 | 120.00 | 15.53 | 9 | 116.10 | 21.70 | 9 | 108.10 | 37.09 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 591** | 305.40 | 9 | 229.1** | 89.85 | 9 | 142.50 | 39.95 | 9 | 128.70 | 37.00 | 9 |
| | | LPS | 1527*** | 399.1 | 9 | 1527*** | 399.1 | 9 | 1527*** | 399.1 | 9 | 1527*** | 399.10 | 9 |
| Submerged in inserts. secretion in Apical side | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 10.70 | 9 | 100.00 | 6.54 | 9 | 100.00 | 13.62 | 9 | 100.00 | 14.28 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 181.80 | 67.35 | 9 | 129.30 | 13.38 | 9 | 111.80 | 25.17 | 6 | 102.70 | 22.66 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 279.30 | 55.65 | 9 | 169.1* | 23.74 | 9 | 123.80 | 21.45 | 9 | 96.16 | 19.28 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 1323*** | 751.50 | 9 | 458.5*** | 84.88 | 9 | 183.2** | 64.49 | 9 | 161.00 | 58.01 | 9 |
| | | LPS | 10225*** | 3998.00 | 9 | 10225*** | 3998.00 | 9 | 10225*** | 3998.00 | 9 | 10225*** | 3998.00 | 9 |
| Submerged in plates | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 7.44 | 9 | 100.00 | 12.16 | 9 | 100.00 | 14.63 | 9 | 100.00 | 7.15 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 110.80 | 19.58 | 9 | 109.00 | 11.02 | 9 | 80.35 | 7.10 | 6 | 125.30 | 86.97 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 107.10 | 34.89 | 9 | 104.00 | 13.25 | 9 | 97.97 | 46.50 | 9 | 136.40 | 65.47 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 142.80 | 41.68 | 9 | 135.8* | 25.52 | 9 | 90.15 | 22.75 | 9 | 147.70 | 61.34 | 9 |
| | | 20 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 174.8*** | 32.65 | 9 | 152.5*** | 24.83 | 9 | 106.00 | 27.86 | 9 | 151.80 | 83.45 | 9 |
| | | LPS | 241.1** | 171.50 | 7 | 180.7*** | 14.04 | 8 | 137.00 | 45.49 | 4 | 204.9** | 97.46 | 9 |

Table S6. IL-8 results expressed in percentage compared to control.

| Exposure method | Cell model | Dose | NM105 | | | NM101 | | | NM100 | | | NM212 | | |
|--|--------------|--------------------------------------|----------|--------|---|----------|-------|---|----------|--------|---|----------|-------|---|
| | | | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n |
| ALI. secretion in Basal side | A549 | 0 | 100.00 | 21.50 | 9 | 100.00 | 38.21 | 9 | 100.00 | 44.02 | 9 | 100.00 | 18.42 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 105.30 | 51.23 | 9 | 83.32 | 49.39 | 9 | 137.20 | 103.20 | 9 | 119.30 | 33.07 | 9 |
| | | LPS | 494** | 166.30 | 6 | 577.7** | 84.83 | 6 | 391.10 | 228.80 | 6 | 667.1*** | 93.70 | 6 |
| | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 18.65 | 9 | 100.00 | 12.32 | 9 | 100.00 | 49.47 | 9 | 100.00 | 31.65 | 9 |
| | | 0.1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 104.70 | 44.52 | 8 | 98.17 | 54.11 | 9 | 88.04 | 48.59 | 9 | 108.10 | 25.13 | 9 |
| | | LPS | 1143*** | 412.20 | 9 | 84.17 | 8.55 | 4 | 44.33* | 6.91 | 4 | 15.42** | 1.66 | 6 |
| | | 0 | 100.00 | 35.19 | 9 | 100.00 | 8.20 | 9 | 100.00 | 49.45 | 9 | 100.00 | 9.15 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 245.5** | 64.38 | 9 | 67.08** | 23.60 | 9 | 171.10 | 32.91 | 9 | 111.80 | 20.60 | 9 |
| | | LPS | 485.7*** | 210.50 | 6 | 43.18*** | 17.77 | 6 | 141.5** | 15.04 | 4 | 20.87* | 5.72 | 6 |
| | | 0 | 100.00 | 21.11 | 9 | 100.00 | 5.80 | 9 | 100.00 | 18.28 | 9 | 100.00 | 9.69 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 303.1** | 125.10 | 9 | 121.1* | 14.54 | 9 | 254.4*** | 136.70 | 9 | 66.08* | 19.05 | 9 |
| | | LPS | 416.7* | 334.30 | 5 | 51.90 | 25.56 | 6 | 130.80 | 17.78 | 6 | 18.68*** | 4.55 | 6 |
| Submerged in inserts. secretion in Basal side | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 10.01 | 9 | 100.00 | 5.65 | 9 | 100.00 | 7.85 | 9 | 100.00 | 12.68 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 142.20 | 41.50 | 9 | 115.90 | 16.35 | 9 | 103.10 | 17.10 | 9 | 99.63 | 6.45 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 191.4** | 34.43 | 9 | 127.4* | 11.11 | 9 | 98.64 | 16.78 | 9 | 100.50 | 13.16 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 283.8*** | 68.79 | 9 | 183*** | 41.30 | 9 | 126.50 | 37.59 | 9 | 141.0** | 25.56 | 9 |
| | | LPS | 143.1 | 44.19 | 9 | 143.1** | 44.19 | 9 | 143.1* | 44.19 | 9 | 143.1* | 44.19 | 9 |
| Submerged in inserts. secretion in Apical side | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 8.75 | 9 | 100.00 | 4.51 | 9 | 100.00 | 6.39 | 9 | 100.00 | 7.89 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 134.60 | 25.78 | 9 | 128.90 | 18.12 | 9 | 102.00 | 11.80 | 9 | 98.89 | 8.25 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 159.9* | 29.80 | 9 | 144.8* | 9.73 | 9 | 107.00 | 6.13 | 9 | 97.60 | 12.60 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 141.60 | 85.69 | 9 | 167.2*** | 25.40 | 9 | 138.7** | 32.07 | 9 | 118.00 | 7.11 | 9 |
| | | LPS | 24.67 | 11.33 | 9 | 24.67 | 11.33 | 9 | 24.67 | 11.33 | 9 | 24.67** | 11.33 | 9 |
| Submerged in plates | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 11.45 | 9 | 100.00 | 8.85 | 9 | 100.00 | 7.99 | 9 | 100.00 | 7.13 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 118.50 | 34.81 | 9 | 114.40 | 18.63 | 9 | 145.00 | 53.32 | 9 | 99.17 | 22.23 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 110.00 | 30.53 | 9 | 85.42 | 17.56 | 9 | 128.90 | 42.86 | 9 | 92.89 | 29.56 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 99.63 | 24.30 | 9 | 99.43 | 24.54 | 9 | 142.80 | 59.39 | 9 | 88.26 | 29.99 | 9 |
| | | 20 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 75.57 | 17.17 | 9 | 110.20 | 12.26 | 9 | 96.68 | 14.39 | 9 | 81.90 | 28.13 | 9 |
| | | LPS | 443.9** | 65.93 | 7 | 48.05** | 21.03 | 6 | 47.97 | 19.48 | 4 | 53.79* | 21.61 | 9 |

Table S7. TNF- α results expressed in percentage compared to control.

| Exposure method | Cell model | Dose | NM105 | | | NM101 | | | NM100 | | | NM212 | | |
|--|--------------|-----------------------------------|----------|---------|---|----------|--------|---|----------|--------|---|----------|---------|---|
| | | | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n |
| ALI. secretion in Basal side | A549 | 0 | 100.00 | 8.49 | 9 | 100.00 | 11.80 | 9 | 100.00 | 23.90 | 9 | 100.00 | 16.81 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 108.50 | 21.70 | 9 | 97.08 | 9.27 | 9 | 101.60 | 29.30 | 9 | 115.20 | 26.82 | 9 |
| | | LPS | 205** | 36.91 | 5 | 168.1** | 20.08 | 6 | 184*** | 36.72 | 7 | 185.7*** | 19.55 | 6 |
| | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 7.66 | 9 | 100.00 | 13.40 | 9 | 100.00 | 6.99 | 9 | 100.00 | 30.08 | 9 |
| | | 0.1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 100.40 | 16.54 | 8 | 90.21 | 30.02 | 9 | 91.64 | 25.91 | 9 | 96.62 | 18.83 | 9 |
| | | LPS | 756.9** | 150.90 | 9 | 212.80 | 101.60 | 4 | 182.70 | 71.25 | 4 | 277.2** | 40.91 | 6 |
| | | 0 | 100.00 | 28.03 | 9 | 100.00 | 24.80 | 9 | 100.00 | 45.98 | 9 | 100.00 | 11.60 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 254.1* | 87.29 | 9 | 186.9* | 32.64 | 9 | 150.40 | 30.39 | 9 | 114.10 | 18.34 | 9 |
| | | LPS | 2828*** | 2377.00 | 6 | 307.8*** | 58.22 | 6 | 194.8* | 72.72 | 6 | 164.2** | 61.84 | 6 |
| | | 0 | 100.00 | 13.84 | 9 | 100.00 | 10.80 | 9 | 100.00 | 18.24 | 9 | 100.00 | 15.84 | 9 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 308.4** | 181.20 | 9 | 143.9* | 40.83 | 9 | 251.80 | 147.90 | 9 | 89.87 | 15.76 | 9 |
| | | LPS | 1099*** | 694.60 | 5 | 392.3*** | 140.60 | 6 | 481.9*** | 87.95 | 6 | 227.6* | 53.88 | 6 |
| Submerged in inserts. secretion in Basal side | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 9.59 | 9 | 100.00 | 12.33 | 9 | 100.00 | 5.75 | 9 | 100.00 | 14.48 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 127.00 | 30.56 | 9 | 105.40 | 17.55 | 9 | 103.20 | 11.33 | 9 | 114.00 | 24.36 | 8 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 167* | 29.14 | 9 | 131.70 | 45.21 | 9 | 96.86 | 14.54 | 9 | 103.80 | 10.46 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 264.8*** | 55.14 | 9 | 154.4** | 26.08 | 9 | 117.30 | 21.53 | 9 | 129.90 | 27.22 | 9 |
| | | LPS | 179.6** | 33.32 | 9 | 179.6*** | 33.32 | 9 | 179.6*** | 33.32 | 9 | 179.6*** | 33.32 | 9 |
| Submerged in inserts. secretion in Apical side | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 5.88 | 9 | 100.00 | 5.13 | 9 | 100.00 | 14.82 | 9 | 100.00 | 9.31 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 139.40 | 28.89 | 9 | 126.90 | 25.34 | 9 | 95.95 | 14.61 | 9 | 106.00 | 21.58 | 8 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 173** | 31.59 | 9 | 152.2* | 15.84 | 9 | 106.00 | 17.87 | 9 | 91.59 | 16.73 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 172.6* | 65.73 | 9 | 197.8*** | 17.04 | 9 | 134.40 | 28.00 | 9 | 110.10 | 19.33 | 9 |
| | | LPS | 243*** | 44.67 | 9 | 243.0*** | 44.67 | 9 | 243*** | 44.67 | 9 | 243.0** | 44.67 | 9 |
| Submerged in plates | A549 + THP-1 | 0 | 100.00 | 8.21 | 9 | 100.00 | 6.81 | 9 | 100.00 | 5.37 | 9 | 100.00 | 10.00 | 9 |
| | | 1 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 121.40 | 29.52 | 9 | 99.91 | 4.20 | 9 | 102.50 | 34.63 | 9 | 100.00 | 12.41 | 8 |
| | | 3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 109.40 | 39.40 | 9 | 113.00 | 9.44 | 9 | 117.90 | 59.98 | 9 | 138.70 | 63.93 | 9 |
| | | 10 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 150.90 | 48.71 | 9 | 147.7** | 24.38 | 9 | 86.54 | 26.00 | 9 | 139.00 | 50.13 | 9 |
| | | 20 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | 188** | 39.25 | 9 | 183.6*** | 23.49 | 9 | 169.80 | 98.06 | 9 | 162.10 | 79.67 | 9 |
| | | LPS | 389.5*** | 182.20 | 6 | 1781*** | 815.80 | 6 | 450** | 75.01 | 4 | 2208*** | 1040.00 | 9 |

Table S8. IL-1 β levels at the basal and apical sides after stimulation with LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

| | | | values in pg/mL | | | | | | Values in %/control | | | | | |
|-----------------|--------------|-----------------------------------|-----------------|------|---|--------|------|---|---------------------|------|---|--------|------|---|
| | | | Basal | | | Apical | | | Basal | | | Apical | | |
| Exposure method | Cell model | treatment | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n |
| Submerged | A549 + THP-1 | 0 | 9.273 | 1.84 | 9 | 14.46 | 5.17 | 9 | 100 | 15.5 | 9 | 100 | 8.12 | 9 |
| | | LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 81.77 | 54.9 | 9 | 445.7 | 425 | 9 | 826.7 | 454 | 9 | 3982 | 4137 | 9 |
| ALI | A549 + THP-1 | 0 | 36.3 | 17.7 | 9 | 61.06 | 20.7 | 9 | 100 | 34.1 | 9 | 100 | 23 | 9 |
| | | LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 444.8 | 114 | 6 | 269.4 | 147 | 6 | 1357 | 615 | 6 | 415.9 | 154 | 6 |

Table S9. IL-6 levels at the basal and apical sides after stimulation with LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

| | | | values in pg/mL | | | | | | Values in %/control | | | | | |
|-----------------|--------------|-----------------------------------|-----------------|------|---|--------|------|---|---------------------|------|---|--------|-------|---|
| | | | Basal | | | Apical | | | Basal | | | Apical | | |
| Exposure method | Cell model | treatment | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n |
| Submerged | A549 + THP-1 | 0 | 39.96 | 15.7 | 9 | 98.38 | 79 | 9 | 100 | 17.1 | 9 | 100 | 13.9 | 9 |
| | | LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 591.2 | 204 | 9 | 9267 | 5386 | 9 | 1527 | 399 | 9 | 16324 | 12978 | 9 |
| ALI | A549 + THP-1 | 0 | 138.1 | 36.4 | 9 | 635 | 274 | 9 | 100 | 23.5 | 9 | 100 | 22.2 | 9 |
| | | LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 1059 | 636 | 6 | 1278 | 666 | 6 | 790.9 | 539 | 6 | 195.9 | 47.8 | 6 |

Table S10. IL-8 levels at the basal and apical sides after stimulation with LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

| | | | values in pg/mL | | | | | | Values in %/control | | | | | |
|-----------------|--------------|-----------------------------------|-----------------|------|---|--------|------|---|---------------------|-------|---|--------|-------|---|
| | | | Basal | | | Apical | | | Basal | | | Apical | | |
| Exposure method | Cell model | treatment | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n |
| Submerged | A549 + THP-1 | 0 | 15723 | 4471 | 9 | 25190 | 9546 | 9 | 100 | 12.68 | 9 | 100 | 7.887 | 9 |
| | | LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 22184 | 7156 | 9 | 5172 | 1535 | 9 | 143.1 | 44.19 | 9 | 23.64 | 12.27 | 9 |
| ALI | A549 + THP-1 | 0 | 39245 | 4436 | 9 | 14024 | 3257 | 9 | 100 | 8.2 | 9 | 100 | 21.67 | 9 |
| | | LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 16978 | 6978 | 6 | 8660 | 3096 | 6 | 43.18 | 17.77 | 6 | 60.63 | 15.43 | 6 |

Table S11. TNF- α levels at the basal and apical sides after stimulation with LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

| | | | values in pg/mL | | | | | | Values in %/control | | | | | |
|-----------------|--------------|-----------------------------------|-----------------|-------|---|--------|-------|---|---------------------|-------|---|--------|-------|---|
| | | | Basal | | | Apical | | | Basal | | | Apical | | |
| Exposure method | Cell model | treatment | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n | Mean | SD | n |
| Submerged | A549 + THP-1 | 0 | 57.44 | 23.11 | 9 | 75.4 | 9.314 | 9 | 100 | 14.48 | 9 | 100 | 5.51 | 9 |
| | | LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 105.8 | 23.98 | 9 | 200.7 | 64.56 | 9 | 196.3 | 43.13 | 9 | 260.6 | 61.47 | 9 |
| ALI | A549 + THP-1 | 0 | 98.43 | 24.49 | 9 | 110.1 | 70.82 | 9 | 100 | 23.12 | 9 | 100 | 24.82 | 9 |
| | | LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 251.5 | 43.04 | 6 | 230.9 | 158 | 6 | 259 | 56.97 | 6 | 210 | 45.94 | 6 |

Annexe 3

Article 2 : Supplementary material

Methods

In vivo study

Animals

Pathogens free 7 weeks old male rats (WISTAR RjHan:WI, JANVIER LABS, France ; 250 g), were housed in polycarbonate cages, in a temperature and humidity controlled room, and had free access to food and water ad libitum. All the *in vivo* experiments were approved by the “Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Picardie” (CREMEAP) (C2EA – 96).

Preparation of NM suspensions

Suspensions of TiO₂ (NM105, NM101, NM100) and CeO₂ (NM212) at 10 mg/mL in Mili-Q water were prepared and then sonicated at amplitude 100 during 2 min (1min on, 1 min off, 1 min on) using a cuphorn sonicator (QSONICA, Q700). Dilution in Milli-Q water at 5; 0.5 and 0.05 mg/mL were performed to exposed rats to 500; 50 and 5 µg/animal, respectively. According to the lung alveolar surface (4000 cm²) or the number of alveolar macrophages (25 million), this corresponds to theoretical deposited doses in lungs of around 0.1; 0.01; 0.001 µg/cm² or 20; 2; 0.2 µg/10⁶ macrophages, respectively.

Characterization of NM suspensions

For each NM, DLS measurements were performed (Malvern, Zetasizer Nano S) on NM suspensions (2,56 mg/mL) to measure the hydrodynamic diameter and to assess the size distribution of the particles in suspensions.

Intratracheal instillation

Rats were anesthetized (0.5 mg/kg ketamine hydrochloride, 0.1 mg/kg atropine and 1 mg/kg xylazine), endotracheal intubation was performed using a cannula and animals were connected to a respirator (Harvard Apparatus, ventilator model 683) for 30 s to create a hyperventilation. Rats were disconnected from the apparatus, 100 µL of NMs suspension in water or vehicle (Mili-Q water) was added in the cannula and suspensions were directly aerosolized into rat lungs by physiological aspiration. It was chosen to disperse NMs in Mili-Q water and not in

physiological saline buffer to enhance NN stability in suspension. This choice was made since it was shown that intratracheal instillation of distilled water in rats, like physiological saline, did not induce significant inflammatory responses at 24h [184].

Dosing and biodistribution analysis

After instillation, rats were sacrificed 3h after instillation to evaluate the lung burden (n=2). Mass of NM was measured in collected lungs by ICP-MS analysis.

Assessment of biological activity

Animals (n=6) were sacrificed 24h after instillation and bronchoalveolar lavages were performed with PBS. Collected BALFs were centrifuged at 350 g for 10 min and 4°C, to separate the cells from the supernatant. The supernatants were aliquoted in eppendorf tubes and stored at -80°C until analysis.

Cell counting

After centrifugation, the cell pellets were resuspended in 5 mL of RPMI medium (Gibco, 61870), 20 µL of cell suspension were mixed with 20 µL of propidium iodide containing accridine solution and the cells were counted using a cell counter equipped with a fluorometer (Nexcelom, Cellometer® Auto 2000), to differentiate the dead cells and the erythrocytes from the pulmonary cells.

BALF cytology

After counting, the cells were diluted in RMPI, seeded on slides at 300 000 cells/spots using a cytospin (300 g, 5 min) (Shandon, cytospin2) and then fixated and coloured in May-Grunwald Giemsa (MGG). Briefly, the slides were fixated in MG pure for 3 min followed by 2 min in MG diluted at 50% in mili-Q water, rinsed 2 times with MiliQ water for 20 min and then coloured in Giemsa. The percentage of the different cell types (macrophages, neutrophils, eosinophil) in BALF was then determined using optical microscopy.

Intracellular ROS levels (DCF assay)

After counting, the BALF cells were seeded at 1×10^6 cells/mL in 24 well plates (Falcon, 353047) (in RMPI supplemented with 10% of SVF: 0,5 mL/well), and were then incubated for 18h at 37°C and with 5% of CO₂ to let the cells (mostly macrophages) to adhere on the plate. The cells were then rinsed with PBS and incubated for 35 min with 10 µM of 5-(and-6)-

chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA) probe (Life technologies, C6827) in PBS (0.5 mL/well). After 30 min of incubation, the probe was removed in some control wells, 1 mM of H₂O₂ in PBS was added and the cells were incubated for 5 min, to serve as positive control. After incubation, the cells were washed with PBS and incubated for 5 min in 90% of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, D2438) in PBS (0.5 mL/well). The cells were then scraped using scrapers (TPP, 99002), the well contents were retrieved in tubes (Eppendorf, 3810X) and the tubes were centrifuged at 10 000 g and 4°C for 5 min, to eliminate the dead cells and to remove the remnants particles. The tube contents were transferred in 96 well black plate (150 µL/well) (Greiner Bio-one, 655076) and the fluorescence of the samples was read (excitation: 488 nm, emission: 530 nm) using a spectrophotometer (TECAN, infinite 2000). The value of each sample was expressed in percentage of intracellular ROS compared to the control.

Pro-inflammatory release in BALF supernatant

IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α releases were measured in collected supernatants using a commercial available ELISA multiplex kit (Mesoscale discovery, Proinflammatory Panel 2, N05059A-1) and a multiplex reader (Mesoscale discovery, Sector Imager 24000) according to supplier recommendations.

LDH release and protein levels in BALF supernatants

LDH release were quantified in BALF using a commercially available kit (Promega, CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity assay). Proteins levels were measured in BALF using a Bradford assay (Biorad, protein assay kit)

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) (n=6). Statistical analyses were performed using Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Results were analyzed by a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by dunn's post-hoc test to compare the different treated groups to the non exposed control.

Results

Size distribution of the NMs in suspension

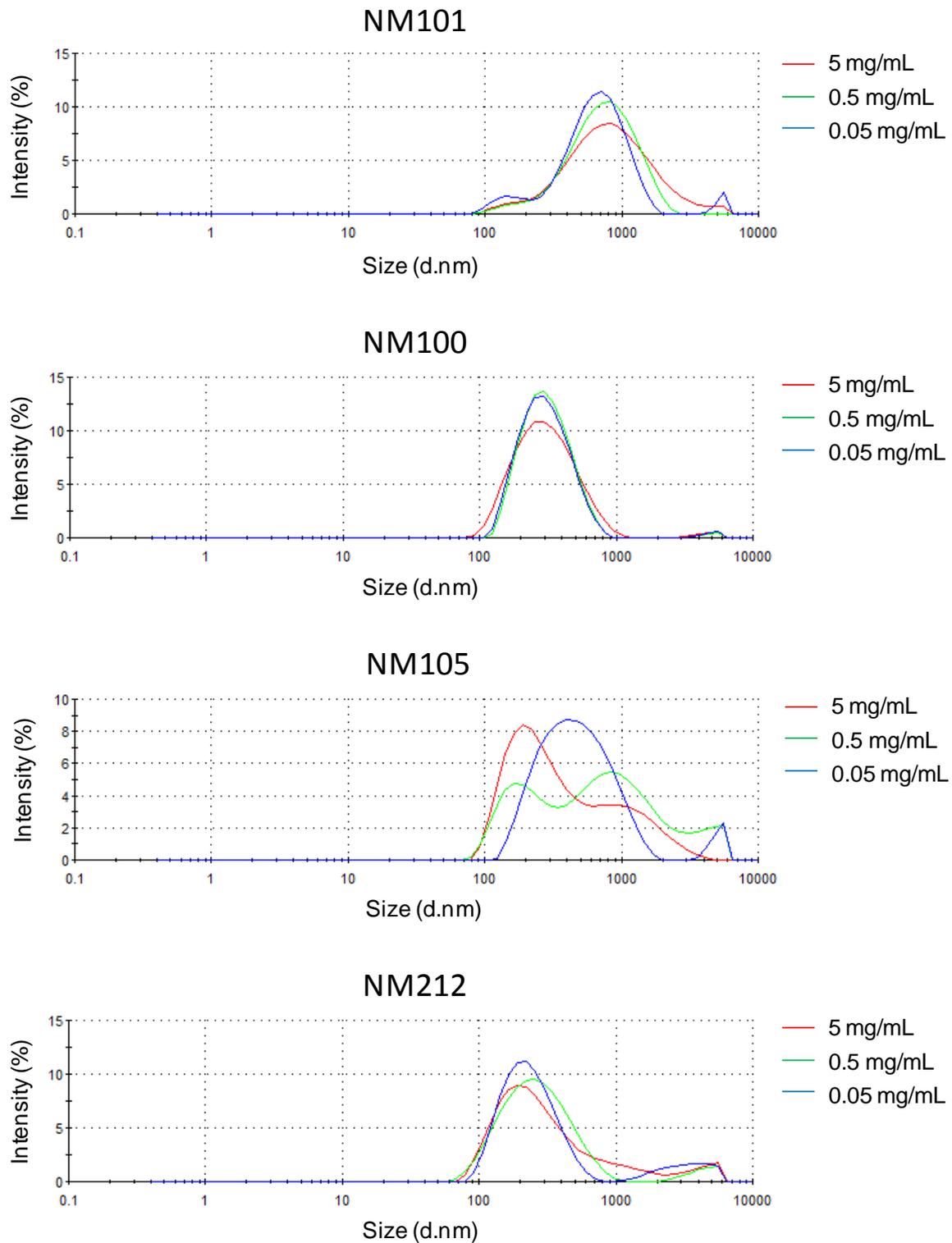


Figure S1: Size distribution of the NMs in the suspensions used to instill the animals.

Abstract

Nanoparticles (NPs) represent a potential danger for workers and public, especially after inhalation. When a NP is shown toxic for the lungs *in vivo* in animals, this can incite regulators to implement measures to reduce human exposure risks. The *in vivo* studies are thus of utmost importance in reducing the potential health risks for humans. However, in a context of a diminution in the number of animals used in experimentations and considering the high number of NPs used and their physicochemical diversity, there is an urgent need for alternative methods, like the *in vitro*, which could be used to predict the potential health effects of NPs in human. Many progresses have been made recently to develop more physiological cell models and exposure methods simulating the inhalation of NPs *in vitro*. Nevertheless, uncertainties remain regarding the capacity of these new *in vitro* methods to predict the biological responses observed *in vivo* into the lungs after exposure to NPs.

In this context, the aim of our study was to assess the ability of several *in vitro* methods, differing in complexity, to predict the adverse responses observed *in vivo* in rat lungs after acute exposure (24h) to several metallic and poorly soluble TiO₂ and CeO₂ NPs. For this, *in vitro* experimentations were first performed to assess if exposing alveolar cells in monoculture or in co-culture at the ALI interface to aerosols of NPs, generated different results compared to classic exposure in submerged conditions to suspensions. In a second step, rats were exposed by intratracheal aspiration of NP suspensions to compare the biological responses *in vitro* to those obtained *in vivo*. To compare the pulmonary responses *in vivo* and *in vitro*, similar dose metrics were selected, including the mass per surface unit or per macrophage.

After 24h of exposure, significant biological responses (mostly inflammation) were observed at lower doses at the ALI compared to in submerged conditions. Moreover, we highlighted the necessity to take into account the deposited dose on the cells and the timing of the dose delivery in order to compare the two exposure methods used *in vitro*. When we compared the responses *in vitro* to those observed *in vivo*, we noticed that the ALI methods generated more predictive results than the submerged one, in term of biological activation levels after 24h of exposure. Finally, a ranking of the four NPs used in our study was provided and the NPs were ranked similarly both *in vivo* and *in vitro* and whatever the exposure method used *in vitro*. We also showed the importance of the surface area when ranking the poorly soluble NPs.

In conclusion, the gap existing between the *in vivo* and the *in vitro* has been evaluated in our study. Our results highlighted the relevance of using more realistic *in vitro* exposure methods to model the potential adverse effects of NPs for human. This brings perspectives about using and developing *in vitro* methods mimicking more closely the *in vivo* exposure conditions.

Key words: Nanoparticles, pulmonary toxicity, *in vitro*, *in vivo*, alternative to animal experimentation, air-liquid interface

Résumé

Les nanoparticules (NPs) représentent un danger potentiel pour la santé des travailleurs et du grand public, notamment en cas d'exposition par voie respiratoire. Si une NP est évaluée *in vivo* comme toxique chez l'animal, cela peut inciter à prendre des mesures pour réduire l'exposition de l'Homme à celle-ci, avant qu'il y ait des conséquences sanitaires graves. Les études *in vivo* sont donc d'une importance capitale afin de diminuer les potentiels risques sanitaires des NPs pour l'Homme. Néanmoins, dans un contexte de réduction du nombre d'animaux utilisés et compte tenu du nombre important de NPs existantes et de leur grande diversité physico-chimique, la toxicologie a besoin de modèles alternatifs, comme le *in vitro*, permettant de prédire de manière fiable les potentiels effets pulmonaires chez l'Homme. Des progrès importants ont été faits pour développer des modèles *in vitro* pulmonaires plus physiologiques et des méthodes d'exposition permettant de simuler l'inhalation de NPs *in vitro*. Cependant, des incertitudes existent quant à la capacité de ces nouveaux modèles *in vitro* à prédire les réponses observées *in vivo* dans les poumons après exposition à des NPs.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'évaluer la capacité de plusieurs méthodes *in vitro*, de complexité différente, à prédire les effets toxiques observés *in vivo* chez le rat après exposition aiguë (24h) pulmonaire à des NPs métalliques faiblement solubles de TiO₂ et de CeO₂. Dans un premier temps, des expérimentations *in vitro* ont été effectuées afin d'évaluer si exposer des cellules alvéolaires à l'interface air-liquide (ALI) à des aérosols de NPs de TiO₂ et de CeO₂, génère des résultats différents par rapport à des expositions classiques à des suspensions en submergé. Dans un second temps, des expérimentations *in vivo* par aspiration intratrachéale ont été réalisées afin de comparer les réponses toxiques pulmonaires *in vitro* avec celles obtenues *in vivo*. Pour comparer les réponses pulmonaires *in vivo* et *in vitro*, des référentiels de dose similaires, notamment la masse par unité de surface ou par macrophage, ont été utilisés.

Après 24h d'exposition, des réponses biologiques significatives (inflammation principalement) ont été observées *in vitro* à des doses inférieures à l'ALI par rapport au submergé. Nous avons par ailleurs souligné la nécessité de prendre en compte les doses réellement déposées sur les cellules ainsi que le débit de dose pour effectuer les comparaisons entre les deux méthodes d'exposition *in vitro* utilisées. Nous avons ensuite comparé les résultats *in vitro* avec ceux obtenus *in vivo*. Nous avons constaté que la méthode ALI génère des résultats plus prédictifs du *in vivo*, en termes de niveau d'activation des réponses toxiques à 24h. Finalement, nous avons établi un classement des quatre NPs utilisées dans notre étude et celles-ci ont été classées similairement *in vivo et in vitro* et quelle que soit la méthode utilisée *in vitro*. Nous avons par ailleurs montré l'importance de considérer la surface active des NPs pour établir ce classement.

En conclusion, notre approche nous a permis de mieux évaluer le fossé existant entre le *in vivo* et le *in vitro*. Nos résultats soulignent l'intérêt d'utiliser des méthodes *in vitro* plus réalistes et plus proches de la physiologie humaine dans le but de modéliser les potentiels effets indésirables des NPs pour l'Homme. Cela ouvre des perspectives quant à l'utilisation et au développement de méthodologies *in vitro* de plus en plus représentatives des conditions d'exposition *in vivo*.

Mots clés : Nanoparticules, toxicité respiratoire, *in vitro*, *in vivo*, alternative à l'expérimentation animale, interface air-liquide