



HAL
open science

Devenir et impact de nanoparticules manufacturées et issues de l'usure des freins sur la barrière épithéliale respiratoire

Chloé Puisney-Dakhli

► **To cite this version:**

Chloé Puisney-Dakhli. Devenir et impact de nanoparticules manufacturées et issues de l'usure des freins sur la barrière épithéliale respiratoire. Toxicologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC165 . tel-02416009

HAL Id: tel-02416009

<https://theses.hal.science/tel-02416009>

Submitted on 17 Dec 2019

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.

Thèse de Doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie (MTCI, ED 563)

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE

SPECIALITE : TOXICOLOGIE

Présentée et Soutenue Publiquement à Paris le 27 Septembre 2018

Par

Chloé PUISNEY

**Devenir et Impact de nanoparticules manufacturées et issues de
l'usure des freins sur la barrière épithéliale respiratoire**

dirigée par :

Pr Armelle BAEZA-SQUIBAN

Dr Jean-François BERRET

JURY

Monsieur le Docteur Yong CHEN – CNRS/Ecole Normale Supérieure de Paris

Président du Jury

Madame le Docteur Marie CARRIERE – CEA

Rapporteur

Monsieur le Docteur Sylvain BILLET – Université Littoral Côte d'Opale

Rapporteur

Madame le Docteur Caroline ROQUES – Université Paris Descartes

Examineur

Monsieur le Docteur Laurent MARTINON – Ville de Paris

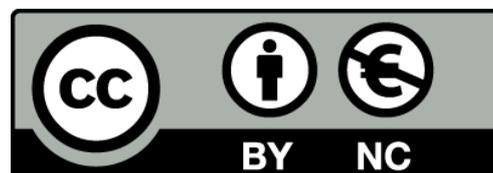
Membre invité

Madame le Professeur Armelle BAEZA-SQUIBAN – Université Paris Diderot

Directrice de thèse

Monsieur le Docteur Jean-François BERRET – CNRS

Co-directeur de thèse



« Dans la vie, rien n'est à craindre,
tout est à comprendre »

M. Skłodowska Curie

Ce projet a reçu le soutien financier
du DIM NANO-K de la Région Ile de France :



Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Marie DUPRET et Monsieur le Docteur Laurent LIMAT

Je tiens à vous remercier de m'avoir accueillie au sein des unités de recherche que vous dirigez. Monsieur le Professeur Jean-Marie DUPRET, je vous remercie de m'avoir offert une structure adaptée pour le travail pratique de ma thèse au sein de l'Unité BFA – UMR CNRS 8251 jusqu'en mars dernier. Monsieur le Docteur Laurent LIMAT, je tiens à vous remercier de m'avoir permis de rédiger ma thèse dans un environnement serein pendant les six derniers mois de ce projet au sein de l'UMR 7057 – Matière et Systèmes Complexes.

A Madame le Docteur Marie CARRIERE et Monsieur le Docteur Sylvain BILLET

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

A Monsieur le Docteur Yong CHEN

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

A Madame le Docteur Caroline ROQUES et Monsieur le Docteur Laurent MARTINON

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de juger mon travail.

A la Région Ile-de-France, DIM Nano-K

Je tiens à remercier le DIM NANO-K de la région Ile-de France du soutien financier apporté à ce projet.

Steve Jobs a dit : « *Les meilleures choses qui arrivent dans le monde de l'entreprise ne sont pas le résultat du travail d'un seul homme. C'est le travail de toute une équipe.* ». Ainsi, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

A Madame le Professeur Armelle BAEZA-SQUIBAN et Monsieur le Docteur Jean-François BERRET

Je vous remercie tous les deux de m'avoir fait confiance pour travailler sur le sujet dont vous avez assuré la co-direction.

Armelle, je vous remercie de m'avoir conseillée au long de ces trois années de travail et d'avoir cru en mes capacités en me laissant une grande liberté d'action. J'ai pu apprécier votre large éventail de connaissances et de compétences dans le domaine de la Toxicologie.

Jean-François, je vous remercie pour ces trois années de travail au cours desquelles j'ai pu apprécier tant vos qualités pédagogiques et scientifiques qu'humaines. Votre patience et vos précieux conseils m'ont permis d'apprendre de nombreuses choses au cours de ces trois années. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir permis de travailler en relation avec le domaine de la Physique. Cela m'a permis de prendre du recul sur mes résultats de Biologie et d'apprendre à communiquer avec des professionnels d'un domaine différent de ma spécialité.

Aux nombreuses personnes avec lesquelles j'ai pu interagir sur les plateformes techniques :

Sophie NOWAK, Alexandre CHEVILLOT-BIRAUD et Ludovic MOUTON, je tiens à vous remercier de l'accueil que vous m'avez réservé au sein du Laboratoire ITODYS. Votre pédagogie et votre enthousiasme m'ont permis de mener à bien les analyses de fluorescence X, thermogravimétrie et microscopie électronique à balayage.

Sandra CASALE, je tiens à te remercier de ton intérêt pour ce travail. Ton professionnalisme et ta disponibilité ont été les facteurs clés de la réussite de nos observations en TEM.

Juliette BERTIER, Xavier BAUDIN, Vincent CONTREMOULINS et Rémi LEBORGNE, je tiens à vous remercier de l'intérêt que vous avez porté à ce travail au cours des trois années. La plateforme ImagoSeine, si riche en ressource, ne serait pas la même sans votre disponibilité et vos conseils avisés. Juliette, merci de ta détermination, de ton intérêt pour ce travail et de ta bonne humeur lors des nombreuses heures passées à régler le Plein Champ.

Mickael THARAUD et Yann SIVRY, je vous suis reconnaissante pour votre patience et l'intérêt porté à ce projet lors des analyses de sp-ICP-MS. En m'ouvrant les portes de l'Institut de Physique du Globe de Paris, vous m'avez permis de répondre à une problématique clé de

mon travail, je vous adresse pour cela ma sincère gratitude. Mickael, j'ai su apprécier ta disponibilité et ton écoute afin de mener à bien ce travail.

Aux membres du Laboratoire de Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques de l'Unité BFA :

Pascal et Valentina, je vous remercie d'avoir partagé votre bureau avec moi à différents moments de ma thèse. Tout au long de ces trois années, j'ai su apprécier vos nombreux conseils en culture cellulaire et en biologie moléculaire. J'ai sincèrement apprécié de travailler avec vous tant pour vos qualités personnelles que professionnelles.

Maria et Sundjiv, je vous remercie des bons moments passés au sein du laboratoire où ailleurs durant ces 6 derniers mois. Pendant la phase de rédaction qui a sans doute été la plus compliquée pour moi, vous avez été de considérables soutiens.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux autres membres du laboratoire pour leurs conseils (**Fernando, Florent, Emile, Lihn, Jérémy, Qing, Wenchao, Justine, Stéphanie et Oliver**). J'adresse une pensée aux étudiants stagiaires et « apprentis-chercheurs » avec qui j'ai partagé de bons moments de vie au laboratoire ou ailleurs (**Alessandro, Esther, Julien, Joseph, Eléonore, Cristina, Aline, Lewis, Clara, Alice et Ridita**)

Je remercie aussi **Roselyne, Olja, Françoise et Jean-Luc** de leurs assistances respectivement technique, administrative et informatique.

Aux membres du Laboratoire Matière et Systèmes Complexes :

A **Fanny, Evi, et Sasha**, je vous exprime toute mon amitié. Cette expérience de thèse n'aurait pas été la même sans l'expérience de partage que j'ai pu vivre avec vous et que j'espère vivre encore longtemps. A **Fanny et Evi**, je vous remercie de vos nombreux conseils et des moments partagés tout au long de ces trois années au laboratoire ou en dehors. **Sasha**, nous avons vécu cette expérience en même temps, je te remercie pour ce partage de ressentis et d'idées. **Victor**, je te remercie de tes conseils avisés lors de mes présentations orales ou pour la suite de ma carrière.

A titre plus personnel, je souhaiterai remercier **ma famille** et **mes proches**.

A **mes amis**, que vous partagiez avec moi ou pas le monde de la science je vous remercie pour les moments passés à Paris, à Nancy ou ailleurs.

A **Mai-Lan**, si tu n'es plus une de mes collègues comme tu l'as été pendant 2 ans et 10 mois tu restes pour moi une amie et j'espère pour longtemps. Les plans de manips, les totems, les commandes, les livraisons de repas, les pauses cafés-cigarettes sont autant de choses que nous avons partagés mais je l'espère rien à coté de ce qu'il nous reste à partager en dehors du laboratoire.

A ma sudiste, **Soumia**, si tu savais comme je te suis reconnaissante d'encore me supporter depuis ces quelques années.

A **Marie, Saïgueck** et **Anne-Sophie**, je vous remercie de vos visites parisiennes, mais aussi de tout ce que nous avons partagé lors de mes années Nancéennes.

A **mes parents et beaux-parents, à mes frères et sœurs**, je vous remercie du soutien que vous m'avez accordé tout au long de ces huit années d'études... Ça y est, c'est enfin fini ! A **mes grand-mères**, vous avez fait de moi ce que je suis par toutes les valeurs que vous m'avez transmises, même si malheureusement l'une d'entre vous n'est plus là pour le voir. A **Dhaker**, mon mari, aucun mot n'est assez fort pour t'exprimer ma gratitude pour ton soutien, ta patience, ta gentillesse et bien d'autres choses. Tu es mon pilier, mon énergie, je ne serai certainement pas arrivée au bout de ce projet sans ton soutien, si précieux.

Cette thèse, c'est à vous que je la dédie.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Préambule.....	1
Chapitre I : Revue Bibliographique.....	4
1. Pollution atmosphérique et émissions particulières.....	4
a. Considérations générales sur la pollution de l'air.....	4
b. Les différents polluants atmosphériques liés au trafic.....	7
i. Les particules de la pollution non-liée à l'échappement.....	10
c. Les particules d'usure des freins.....	11
i. Considérations générales sur le processus de freinage.....	11
ii. Etat des recherches sur les particules d'usure des freins.....	16
2. Les spécificités des nanoparticules métalliques.....	18
a. Considérations générales sur les nanoparticules.....	18
b. Les nanoparticules d'oxyde de fer.....	22
3. Nanotoxicologie.....	23
a. Considérations générales sur l'exposition aux nanoparticules.....	23
i. Utilisation actuelle et état de recherche/réglementation.....	23
4. L'appareil respiratoire : cible des particules inhalées.....	25
a. L'appareil respiratoire : Anatomie fonctionnelle.....	25
b. Histologie des voies respiratoires.....	26
c. Facteurs déterminants de la toxicité respiratoire et toxicocinétique.....	29
i. Déposition in vitro et in vivo des particules.....	30
ii. Cytotoxicité : Mécanismes d'action.....	33
iii. Le phénomène de translocation : passage de la barrière respiratoire (cf Annexe 2 : « <i>Mechanisms of uptake and translocation of nanomaterials in the lung</i> » Puisney et al., Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles, 2018b).....	35
5. Fonctions spécifiques de l'épithélium respiratoire : mécanismes de protection et réparation épithéliale.....	38
a. Mécanismes de protection de l'épithélium respiratoire.....	38

i. Les jonctions intercellulaires.....	38
ii. L'épuration muco-ciliaire.....	43
b. Mécanismes de réparation de l'épithélium respiratoire.....	51
Objectif de l'étude.....	54
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	57
1. Objets de l'étude.....	57
a. Les particules issues du processus d'usure des freins	57
b. Les nanoparticules d'oxyde de fer.....	58
2. Modèle biologique : Cellules épithéliales bronchiques humaines de la lignée Calu-3.....	58
3. Caractérisation physico-chimique des particules d'usure des freins.....	60
a. Analyse par fluorescence X.....	60
b. Microscopie optique.....	60
c. Microscopie électronique à balayage.....	61
d. Thermogravimétrie.....	61
4. Isolement et caractérisation des nanoparticules d'usure des freins.....	61
a. Processus de sélection de la fraction nanoparticulaire.....	61
b. Caractérisation de la taille par diffusion dynamique de la lumière.....	62
c. Microscopie électronique à transmission couplée à la diffraction par rayonnement X.....	62
5. Dosimétrie.....	62
6. Caractérisation de la toxicité sur cellules Calu-3 non différenciées.....	63
a. Test de viabilité par mesure de l'activité mitochondriale (WST-1).....	63
b. Evaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène.....	64
c. Etude de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.....	65
d. Mesure d'endotoxines.....	66
7. Caractérisation de la toxicité sur la barrière épithéliale.....	66
a. Mesure de la perméabilité épithéliale.....	66
b. Etude de la viabilité cellulaire par mesure de l'intégrité membranaire.....	67
c. Etude de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.....	68
d. Immunocytochimie.....	68
8. Caractérisation du devenir des nanoparticules au niveau de la barrière respiratoire.....	69
a. Dosage de la quantité de fer par sp-ICP-MS.....	69

9. Impact des nanoparticules sur le processus de protection épithéliale.....	70
a. Traitement des cellules.....	70
b. Impact des nanoparticules sur le processus de protection épithéliale : Etude de l'expression et de la sécrétion de MUC5AC.....	70
c. Mesure de l'expression de MUC5AC par PCR quantitative.....	71
d. Etude mécanistique des voies de signalisation impliqué dans les modifications du niveau de transcrits et de protéine MUC5AC.....	72
10. Impact des nanoparticules sur le processus de réparation épithéliale après blessure	72
a. Blessure des épithéliums.....	72
b. Evaluation de la vitesse de réparation par vidéomicroscopie.....	73
c. Marquage de la prolifération cellulaire par incorporation de EdU.....	73
11. Analyse statistique.....	74
Chapitre III : Caractérisation physico-chimique et étude toxicologique des nanoparticules manufacturées (NPs- γ -Fe ₂ O ₃) et issues de l'usure des freins (NPs-usure).....	75
1. Introduction et concept.....	76
2. Article – Version complète.....	77
3. Résultats complémentaires.....	78
a. Diffraction X.....	78
b. Effet de l'incorporation de protéines sur la stabilité des particules en milieu aqueux.....	79
c. Caractérisation physico-chimique et toxicologique des nanoparticules manufacturées d'oxyde de fer.....	80
d. Mesure d'endotoxines.....	83
4. Discussion - Conclusion.....	85
Chapitre IV : Devenir des nanoparticules manufacturées (NPs- γ -Fe ₂ O ₃) et issues de l'usure des freins (NPs-usure) au niveau de l'épithélium respiratoire.....	91
I. La lignée Calu-3 en culture 3D : Modèle de barrière épithéliale bronchique.....	92
1. Introduction et concept.....	92
2. Résultats.....	93
a. Caractéristiques des cellules Calu-3 en culture 3D.....	93
b. Impact des nanoparticules sur les cellules Calu-3 en culture 3D.....	98
3. Discussion - Conclusion.....	103

II. Devenir des nanoparticules au niveau de la barrière épithéliale respiratoire.....	105
1. Concept général et méthodologies.....	105
2. Résultats.....	108
a. Analyse des signaux de sp-ICP-MS.....	108
b. Caractéristiques des nanoparticules de l'étude de translocation.....	116
c. Détermination des ratios de translocation.....	116
3. Discussion – Conclusion.....	119
Chapitre V : Impact de l'exposition aux nanoparticules sur la protection de la barrière épithéliale respiratoire.....	123
1. Introduction et concept.....	123
2. Résultats.....	125
a. Impact de l'exposition aux nanoparticules sur l'expression des transcrits du gène <i>MUC5AC</i>	125
b. Impact de l'exposition aux nanoparticules sur l'expression de la protéine <i>MUC5AC</i>	125
c. Mécanismes impliqués dans la régulation de <i>MUC5AC</i>	131
3. Discussion – Conclusion.....	136
Chapitre VI : Impact de l'exposition aux nanoparticules sur la réparation de la barrière épithéliale respiratoire.....	139
1. Introduction et concept.....	139
2. Résultats.....	140
a. Etude de la vitesse de réparation épithéliale.....	140
b. Etude de la prolifération cellulaire.....	146
3. Discussion - Conclusion.....	153
Chapitre VII : Discussion Générale – Conclusion et Perspectives.....	156
Bibliographie.....	160
Annexes et valorisation scientifique	170

Liste des figures

Chapitre I

<u>Figure I.1</u> : Evolution du nombre d'articles concernant "air pollution" de 1930 à 2017.....	5
<u>Figure I.2</u> : Répartition globale des sources de pollution en France.....	6
<u>Figure I.3</u> : Effets pulmonaires et extra-pulmonaires de la pollution sur la santé.....	7
<u>Figure I.4</u> : Représentation schématique de particules Diesel.....	9
<u>Figure I.5</u> : Origine des émissions de PM10 urbaines.....	11
<u>Figure I.6</u> : Les différents types de systèmes de freinage.....	12
<u>Figure I.7</u> : Banc d'essais des freins.....	14
<u>Figure I.8</u> : Décéléromètre.....	14
<u>Figure I.9</u> : Impacteur en cascade.....	15
<u>Figure I.10</u> : Situation de l'échelle « nano »	18
<u>Figure I.11</u> : Coupe de Lycurgue.....	19
<u>Figure I.12</u> : Domaines d'application des nanomatériaux.....	20
<u>Figure I.13</u> : Modification de la surface spécifique selon la taille.....	21
<u>Figure I.14</u> : Propriétés physico-chimiques des nanoparticules.....	21
<u>Figure I.15</u> : Applications des différents types de particules d'oxydes de fer.....	22
<u>Figure I.16</u> : Maladies potentiellement associées à l'exposition aux nanoparticules.....	25
<u>Figure I.17</u> : Anatomie respiratoire.....	26
<u>Figure I.18</u> : Structure histologique des voies respiratoires.....	27
<u>Figure I.19</u> : Epithélium de type respiratoire.....	28

<u>Figure I.20</u> : Déposition des nanoparticules au niveau respiratoire.....	30
<u>Figure I.21</u> : Différence entre la dose nominale et la dose effective.....	31
<u>Figure I.22</u> : Principe de la méthode ISDD.....	32
<u>Figure I.23</u> : Vue d'ensemble des mécanismes de cytotoxicité des nanoparticules.	33
<u>Figure I.24</u> : Aperçu des mécanismes de production d'espèces réactives de l'oxygène par les nanoparticules.	34
<u>Figure I.25</u> : Les différentes voies de translocation.....	36
<u>Figure I.26</u> : Les complexes jonctionnels.....	40
<u>Figure I.13</u> : Représentation de la coordination entre les cellules ciliées et le mucus.....	43
<u>Figure I.14</u> : Processus de sécrétion des granules de mucus.....	46
<u>Figure I.15</u> : Voies de régulation transcriptionnelle de MUC5AC.....	48
<u>Figure I.30</u> : Voies d'activation de la voie EGFR potentielle activatrice de la production de MUC5AC.....	49
<u>Figure I.31</u> : Facteurs cellulaires et moléculaires de la réparation de l'épithélium respiratoire...51	

Chapitre II

<u>Figure II.16</u> :Collecte des particules d'usure des freins.	58
<u>Figure II.1</u> : Cellules Calu-3.	59
<u>Figure II.2</u> : Dispositif <i>Transwell</i> ®.....	60
<u>Figure II.3</u> : Test WST-1.	63
<u>Figure II.4</u> : Oxydation de la sonde DCFH ₂ -DA.....	64
<u>Figure II.5</u> : Quantification de la sécrétion de cytokines par ELISA « sandwich ».	65
<u>Figure II.6</u> : Blessure épithéliale.	73

Chapitre III

<u>Figure III.17</u> : Concept général de l'étude des propriétés physico-chimiques des particules d'usure des freins et de l'évaluation de leur étude toxicité in vitro.	76
<u>Figure III.18</u> : Analyse de la poudre d'usure des freins collectée sur dynamomètre par diffraction X.....	78
<u>Figure III.19</u> : Analyse de la poudre d'usure des freins collectée sur véhicule entier par diffraction X.....	79
<u>Figure III.20</u> : Impact de l'introduction de protéines dans le milieu de suspension sur la stabilité des nanoparticules d'usure des freins.	80
<u>Figure III.21</u> : Détermination du scénario de sonication pour les NPs- γ -Fe ₂ O ₃ afin d'obtenir une suspension nanoparticulaire stable.....	81
<u>Figure III.22</u> : Etude des effets biologiques induits par les NPs- γ -Fe ₂ O ₃ sur les cellules Calu-3.	82

Chapitre IV

<u>Figure IV.23</u> : Concept général de modélisation de la barrière épithéliale respiratoire.....	93
<u>Figure IV.24</u> : Suivi de la mise en place de la barrière épithéliale avec les cellules Calu-3 pendant 14 jours de culture en <i>Transwell</i> ® par deux méthodes.....	94
<u>Figure IV.3</u> : Etude des caractéristiques de différenciation des cellules Calu-3 après 14 jours de culture en <i>Transwell</i> ® par microscopie électronique.....	95
<u>Figure IV.4</u> : Immunodétection de protéines caractéristiques de la différenciation épithéliale après 14 jours de culture des cellules Calu-3 en <i>Transwell</i> ®.....	97
<u>Figure IV.5</u> : Etude de la cytotoxicité des NPs- γ -Fe ₂ O ₃ et NPs-usure pour les cellules Calu-3 après 24 heures d'exposition.....	98

<u>Figure IV.6</u> : Etude de la réponse pro-inflammatoire des cellules Calu-3 après 24 heures d'exposition aux NPs- γ -Fe ₂ O ₃ et NPs-usure.....	99
<u>Figure IV.7</u> : Etude de l'impact de 24 heures d'exposition aux NPs- γ -Fe ₂ O ₃ (A) et NPs usure (B) sur les complexes jonctionnels des cellules Calu-3 cultivées en <i>Transwell</i> ®.....	100
<u>Figure IV.8</u> : Immunodétection des composants du cytosquelette et des jonctions intercellulaires des cellules Calu-3 en culture 3D après exposition aux NPs- γ -Fe ₂ O ₃ (A) et aux NPs-usure.....	102
<u>Figure IV.9</u> : Modélisation expérimentale pour l'étude de la translocation de particules inhalées.....	105
<u>Figure IV.10</u> : Représentation schématique du principe technique l'analyse en sp-ICP-MS...	106
<u>Figure IV.11</u> : Signal type obtenu lors de l'analyse en sp-ICP-MS.....	109
<u>Figure IV.12</u> : Intensité intégrée en fonction de la concentration en NPs- γ -Fe ₂ O ₃ dans le milieu de culture.....	110
<u>Figure IV.13</u> : Visualisation de l'échelle de différence entre les intensités apicales et basales.....	112
<u>Figure IV.254</u> : Relation entre la concentration mesurée par sp-ICP-MS et la concentration théorique appliquée au niveau apical.....	113
<u>Figure IV.15</u> : Visualisation de l'échelle de différence entre les intensités apicales et basales.....	114
<u>Figure IV.16</u> : Relation entre la concentration mesurée par sp-ICP-MS et la concentration théorique appliquée au niveau apical.....	115
<u>Figure IV.267</u> : Translocation des NPs- γ -Fe ₂ O ₃	117
<u>Figure IV.18</u> : Translocation des NPs-usure.....	118

Chapitre V

<u>Figure V.27</u> : Effets de l'exposition aux nanoparticules sur production de mucus par l'épithélium respiratoire humain.....	119
--	-----

<u>Figure V.28</u> : Niveau d'expression du gène MUC5AC au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition à différentes concentrations de NPs- γ -Fe ₂ O ₃	126
<u>Figure V.29</u> : Niveau d'expression du gène MUC5AC au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition à différentes concentrations de NPs-usure.....	127
<u>Figure V.30</u> : Immunodétection de la protéine MUC5AC au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition aux NPs- γ -Fe ₂ O ₃	128
<u>Figure V.31</u> : Immunodétection de la protéine MUC5AC au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition aux NPs-usure.....	130
<u>Figure V.32</u> : Dosage par ELISA des quantités de TGF α (A) et d'amphiréguline (B) relarguées dans les surnageants apicaux de cellules Calu-3 exposées pendant 24h aux NPs- γ -Fe ₂ O ₃	132
<u>Figure V.33</u> : Dosage par ELISA des quantités de TGF α (A) et d'amphiréguline (B) relarguées dans les surnageants apicaux de cellules Calu-3 exposées pendant 24h aux NPs- γ -Fe ₂ O ₃	133
<u>Figure V.34</u> : La voie de signalisation du récepteur à l'EGF (EGFR) et les outils d'étude des modalités de son activation.....	134
<u>Figure V.35</u> : Niveau d'expression des transcrits (A) et de la protéine MUC5AC (B) au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition aux NPs- γ -Fe ₂ O ₃ et NPs-usure.	136

Chapitre VI

<u>Figure VI.36</u> : Effets de l'exposition aux nanoparticules sur la réparation de l'épithélium respiratoire humain.....	140
<u>Figure VI.37</u> : Stratégie expérimentale mise en œuvre pour les observations en vidéomicroscopie.....	142
<u>Figure VI.38</u> : Détermination de la vitesse de réparation épithéliale.....	143
<u>Figure VI.39</u> : Etude de la vitesse de réparation épithéliale des épithéliums Calu-3 préalablement exposés à différentes doses de NPs- γ -Fe ₂ O ₃ (A,C) et NPs-usure (B,D).	145

<u>Figure VI.40</u> : Représentation schématique des zones épithéliales étudiées.	146
<u>Figure VI.41</u> : Etude du phénomène de division cellulaire par incorporation de BrdU lors de la réparation d'épithéliums de cellules Calu-3 après blessure.	148
<u>Figure VI.42</u> : Etude du phénomène de division cellulaire par incorporation de BrdU lors de la réparation d'épithéliums de cellules Calu-3 après blessure précédée de 24h d'exposition à différentes doses de NPs- γ -Fe ₂ O ₃	150
<u>Figure VI.43</u> : Etude du phénomène de division cellulaire par incorporation de BrdU lors de la réparation d'épithéliums de cellules Calu-3 après blessure.....	152

Chapitre VII

<u>Figure VII.44</u> : Synthèse des résultats acquis au cours de cette thèse sur le devenir et l'impact de nanoparticules manufacturées ou issues de processus d'usure sur la barrière épithéliale respiratoire.....	157
--	-----

Liste des tableaux

Chapitre I

<u>Tableau I.1</u> : Facteurs altérant les jonctions serrées.....	41
<u>Tableau I.2</u> : Mécanismes de dysfonction de la fonction de barrière par des agents pathogènes.....	42
<u>Tableau I.3</u> : Pathologies associées à une dysfonction des jonctions serrées.....	42
<u>Tableau I.4</u> : Médiateurs impliqués dans l'hypersécrétion muqueuse.....	50
<u>Tableau I.5</u> : Facteurs intervenants dans la régénération de l'épithélium respiratoire.....	52

Chapitre II

<u>Tableau II.1</u> : Anticorps utilisés pour l'immunomarquage lors de l'étude de l'intégrité de la barrière épithéliale respiratoire.....	69
<u>Tableau II.2</u> : Anticorps utilisés pour l'immunomarquage lors de l'étude de la fonction de protection de l'épithélium respiratoire.....	70

Chapitre III

<u>Tableau III.3</u> : Dosage des endotoxines présentes dans les poudres testées.....	83
<u>Tableau III.4</u> : Inventaire des études in vitro réalisées sur les particules d'usure des freins.....	90

Liste des abréviations

ADN : Acide **D**éoxyribo**N**ucléique

ARN : Acide **R**ibo**N**ucléique

BPCO : Broncho**P**neumopathie **O**bstructive **C**hronique

COV : Composés **O**rganiques **V**olatils

DLS : Dynamic **L**ight **S**cattering

ELISA : Enzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay

ERO : Espèces **R**éactives de l'**O**xygène

EGFR : Epithelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor

HIV : **H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus

LDH : Lactate **D**és**H**ydrogénase

LY : Lucifer **Y**ellow

MEB : Microscopie **E**lectronique à **B**alayage

MET : Microscopie **E**lectronique à **T**ransmission

NO_x : **O**xyde d'azote

NPs : Nano**P**articules

PIB : Produit **I**ntérieur **B**rut

SP-ICP-MS : Single **P**article **I**nductively **C**oupled **P**lasma **M**ass **S**pectrometry

TEER : Trans-**E**pithelial **E**lectric **R**esistance

TW : Trans**W**ell®

Préambule

La **qualité de l'air** s'inscrit aujourd'hui comme un véritable défi sociétal dans le monde. En effet, une étude menée par l'INSEE en 2015, met en évidence que si l'on pose à un Français la question suivante « *Parmi les problèmes liés à la dégradation de l'environnement, quel est celui qui vous paraît le plus pré-occupant?* », la pollution de l'air arrive en deuxième position derrière le réchauffement climatique mais bien avant la disparition d'espèces végétales ou animales et la survenue de catastrophes naturelles (Etude « Camme », Insee, Novembre 2015). La préoccupation du grand public pour la **pollution de l'air** est assez facile à comprendre, puisque chaque jour nous y sommes quasiment tous exposés. En effet, les 15000 litres d'air que nous respirons quotidiennement pour subvenir aux besoins de notre organisme contiennent des substances chimiques et particulaires diverses. Nous sommes donc tous tributaires de ce phénomène.

Parmi les polluants atmosphériques, les particules font l'objet d'une attention particulière. Elles constituent un mélange hétérogène en taille et en composition avec une grande variabilité spatio-temporelle liée à la diversité de leurs sources qu'elles soient anthropogéniques ou naturelles. Leurs effets sur la santé cardiorespiratoire sont maintenant clairement établis et on suspecte de plus en plus leur implication dans d'autres pathologies comme le diabète de type II par exemple (Brook *et al.* 2010 ; OMS, bilan annuel 2017, *The Lancet Planetary Health*). L'exposition répétée aux particules qui s'accumulent dans le poumon et leur capacité à passer dans la circulation sanguine contribuent à expliquer cette diversité d'effets sanitaires. C'est la fraction la plus fine de l'aérosol (les particules ultrafines au diamètre aérodynamique inférieur à 0.1 μm) qui est particulièrement suspectée d'être responsable des effets extrapulmonaires ce qui vient d'amener l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) à préconiser « un « suivi renforcé » des particules ultrafines, compte tenu de leurs enjeux potentiels en termes d'impacts sanitaires » (Avis et Rapport de l'Anses relatif à l'identification, la catégorisation et la hiérarchisation de polluants actuellement non réglementés pour la surveillance de la qualité de l'air). En effet à ce jour seules les PM_{10} et $\text{PM}_{2.5}$ (particules au diamètre aérodynamique inférieur à 10 μm et 2,5 μm respectivement) sont réglementées. Les particules ultrafines sont des **nanoparticules** qui ont pour source d'émission majeure le trafic routier en milieu urbain. Elles sont émises à l'échappement à cause de la combustion

incomplète du carburant mais également par l'usure de certaines pièces automobiles comme les freins.

L'objectif de cette thèse a été de se focaliser sur les particules d'usure des freins qui ne font à ce jour l'objet d'aucune réglementation car leur contribution à des effets sanitaires reste mal comprise. Cette préoccupation émergente a valu que la thèse soit financée par le **Domaine d'Intérêt Majeur Nano-K** suite à son appel d'offre qui privilégiait les projets de recherche menés autour de l'Air, thématique sélectionnée par le **Conseil Régional d'Ile-de-France** en 2015. Nous avons centré notre recherche sur la fraction nanométrique des particules d'usure des freins car étant la plus à même à interagir et franchir la première barrière tissulaire qu'elles rencontrent dans l'organisme, à savoir la barrière respiratoire. Ces particules ayant une composante métallique importante, nous avons étudié en parallèle des nanoparticules d'oxyde de fer. Il s'agissait non seulement d'évaluer la contribution de cet élément métallique aux effets observés mais également d'étudier les effets de nanoparticules manufacturées dont la production et les usages se multiplient avec l'essor des nanotechnologies. Les propriétés nouvelles de la matière acquises à l'échelle nanométrique engendrent une réactivité de surface susceptible d'affecter les systèmes biologiques.

Dans ce contexte, nous proposons par l'intermédiaire de cette étude de :

- **Décrire les particules d'usure des freins et leur fraction nanométrique**
- **Caractériser leur devenir et leurs impacts au niveau de la barrière épithéliale respiratoire**

Ce manuscrit est divisé en sept parties. Dans un premier temps, une « **Revue bibliographique** » permettra d'établir l'état des connaissances sur i) les émissions particulaires et plus spécifiquement les nanoparticules issues de processus d'usure, ii) la toxicité des nanoparticules iii) l'appareil respiratoire et ses mécanismes de protection contre les particules. Les méthodes utilisées seront présentées dans la section « **Matériels et Méthodes** ». Les **résultats** obtenus au cours de ce travail de thèse seront présentés selon quatre chapitres qui reprendront successivement, i) la caractérisation physico-chimique et toxicologique des nanoparticules d'usure de freins, ii) le devenir des nanoparticules au niveau de la barrière épithéliale respiratoire en se focalisant sur leur capacité à traverser cette barrière iii) l'impact de l'exposition nanoparticulaire sur les fonctions de protection et iv) de réparation de l'épithélium respiratoire. L'ensemble des résultats seront confrontés dans le Chapitre VII « **Discussion générale & Conclusion – Perspectives** ». Enfin, la dernière partie « **Annexes** » fait figurer la liste des travaux réalisés lors de cette thèse parmi lesquels figure

Préambule

l'article « *Mechanisms of Uptake and Translocation of Nanomaterials in the Lung* » publié en février 2018 dans le livre « *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles* ».

Chapitre I :

Revue bibliographique

1. Pollution atmosphérique et émissions particulières

a. Considérations générales sur la pollution de l'air

Dans sa déclaration de Mars 1968, le Conseil de l'Europe définit la **pollution de l'atmosphère** comme « la présence d'une substance étrangère ou une variation importante dans la proportion de ses composants susceptible de provoquer un effet nocif, compte tenu des connaissances scientifiques du moment, ou de créer ou une nuisance ou une gêne ». Mais, la pollution de l'air a aussi été définie dans la Loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie de 1996 comme « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives ». Dans ces deux définitions, l'idée de « nuisance » et « d'effets nocifs » est commune et est illustrée par les principaux chiffres liés à la pollution de l'air (Landrigan *et al.* 2018) présentés ci-après.

- **92% de la population mondiale** : C'est la proportion de personnes qui, selon un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) datant de 2014 (basé sur une étude de 4000 sites), sont exposés à des niveaux importants de PM_{2.5} (particules fines dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 2,5 microns) ;
- **7 millions de personnes** : C'est le nombre de décès prématurés imputables à la pollution atmosphérique chaque année. Ce qui en fait le quatrième facteur de décès dans le monde après les maladies métaboliques, les risques liés à l'alimentation et le tabagisme (OMS, Bilan Annuel 2017) ;
- **225 milliards de dollars** : c'est le coût de la pollution atmosphérique et de ses conséquences à l'échelle mondiale chaque année ;
- **1% de PIB mondial** : c'est le coût que pourrait représenter à l'échelle mondiale les conséquences de la pollution de l'air à l'horizon 2060 si aucune mesure n'est mise en place.

Au regard de ces chiffres, il est donc incontestable que la pollution atmosphérique représente un problème de santé publique majeur qui fait l'objet de plus en plus d'études ces dernières années. Les premières études scientifiques ont été initiées dès les années 60 ; mais elles ont pris une plus grande ampleur depuis le début des années 2000 car la pollution est devenue un sujet de préoccupation majeur notamment auprès des autorités gouvernementales (Figure I.1). Divers types d'études sont réalisés, allant de la caractérisation des polluants et de leur source à leur impact sur la santé par étude toxicologique ou épidémiologique, afin que tous les champs liés à la qualité de l'air soient couverts.

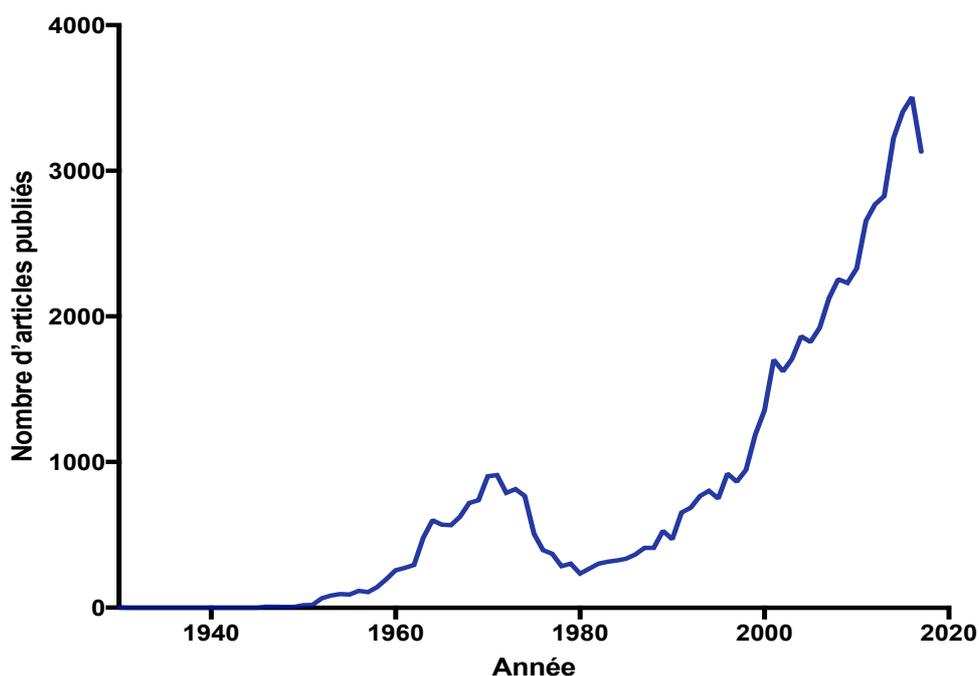


Figure I.1 : Evolution du nombre d'articles concernant "air pollution" de 1930 à 2017. Si l'intérêt porté à la pollution de l'air commence au début des années 60, ce dernier n'a pas cessé d'augmenter depuis. (Figure réalisée à partir de la base de données « Pubmed » accessible à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; consultation : Juin 2018)

La thématique de la qualité de l'air renferme de multiples questionnements en lien direct avec la complexité des sources de pollution à travers le monde. En France, le Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique (CITEPA) réalise annuellement des inventaires d'émissions qui permettent d'évaluer les activités responsables de l'émission de polluants atmosphériques. Ainsi on observe que si l'industrie française est responsable de la plus grande part de pollution de l'air émise, le trafic routier représente une part non négligeable et c'est ce dernier qui est en majeure partie responsable de la pollution de l'air de nos agglomérations (Rapport CITEPA, Avril 2013).

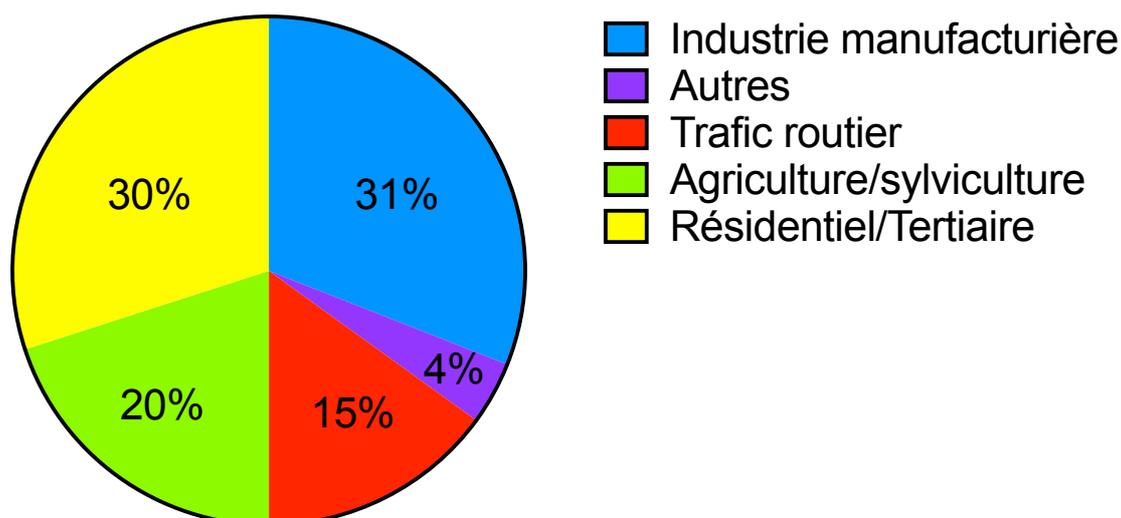


Figure I.2 : Répartition globale des sources de pollution en France Les sources de pollution en France sont nombreuses, parmi ces dernières le trafic routier est responsable de 15% de la pollution. (Figure adaptée du rapport CITEPA, Avril 2013)

Nous sommes donc chaque jour exposés, au sein même de nos agglomérations, à la pollution de l'air qui selon l'OMS peut avoir divers **effets à court et long terme sur la santé**. En effet, elle est reconnue comme accroissant considérablement le risque de maladies respiratoires et cardiovasculaires aiguës et chroniques. De plus, si toute la population est concernée, les effets les plus graves sont observés chez les populations les plus sensibles : enfants, personnes âgées, personnes à la santé fragile et les ménages à faibles revenus qui sont plus vulnérables car ayant un accès limité au système de soins et vivant souvent près de grands axes routiers (OMS, Bilan Annuel, 2017).

En se concentrant sur le **trafic routier**, nous allons alors nous pencher sur l'impact épidémiologique de la pollution atmosphérique engendrée par le trafic routier.

Pollution de l'air liée au trafic urbain et effets sur la santé

Le premier **épisode majeur de pollution** qui a amené les instances de santé à se préoccuper des effets sanitaires de la pollution est le « **Grand Smog de Londres** » survenu en 1952. En effet, un pic de pollution atmosphérique historique fut enregistré le 9 décembre 1952 à Londres, à la suite duquel la mort de 12000 personnes et l'hospitalisation de plusieurs milliers de personnes pour des bronchites aiguës ou broncho-pneumonies ont été enregistrées (Bates *et al.* 1992). Durant les deux dernières décennies de nombreuses études ont confirmé la **contribution de la pollution de l'air extérieur à la mortalité et la morbidité**. Cependant, il est important de noter que les effets à long terme et court-terme doivent être différenciés à

mesure que leur contribution à ses phénomènes est différente (Figure I.3). Les mécanismes d'incidence de la pollution sur la morbidité et la mortalité ne sont cependant pas encore complètement élucidés, même si un nombre important de rapports épidémiologiques font état de l'association cohérente entre la pollution atmosphérique et de nombreux phénomènes (par exemple symptômes respiratoire, réduction de la fonction respiratoire, bronchite chronique et mortalité - Stegeman *et al.* 2002).



Figure I.3 : Effets pulmonaires et extra-pulmonaires de la pollution sur la santé Les émissions polluantes sont responsables d'effets pulmonaires et extrapulmonaires. Pour certains troubles métaboliques, la causalité reste à démontrer. (Source : Rapport de la banque mondiale "Le coût de la pollution de l'air" Sept 2016/Programme de surveillance air et santé InVs 2014)

b. Les différents polluants atmosphériques liés au trafic

Le trafic urbain occupe une place non négligeable dans la pollution de l'air dans les grandes agglomérations. En effet, un rapport de la Mairie de Paris estime, par exemple, que les sources de pollution atmosphérique proviennent essentiellement du trafic routier. Ce dernier, est par exemple à l'origine de 55% des émissions de NO₂ et des 2/3 des émissions particulaires (Mairie de Paris, 2015).

Le **trafic routier** entraîne l'émission de **différentes espèces polluantes** de nature gazeuse et particulaire et d'origine primaire ou secondaire. Les polluants primaires sont directement issus de la pollution tandis que les polluants secondaires résultent de réactions (photo)chimiques entre les polluants primaires mais aussi des composés biogéniques mais

sont pas directement émis dans l'atmosphère. Les principaux types de polluants émis sont présentés ci-après

- **Les oxydes de carbone (CO et CO₂)** : Le CO toxique est capable de bloquer la fixation de l'oxygène par l'hémoglobine et est émis lors de la combustion incomplète des hydrocarbures. Le CO₂, lui, est émis dès lors qu'il y a combustion d'hydrocarbures mais si cette combustion est incomplète un nouvel atome de carbone peut s'ajouter à la molécule de CO₂ et former dans des conditions de pression et températures adéquates du CO. (Schütz *et al.*, 1995)

- **Les oxydes d'azote (NO_x)** : Dans des conditions de hautes températures et haute pression des moteurs, la réaction entre l'oxygène et l'azote permet de former de l'oxyde d'azote. Ce dernier peut se condenser en NO₂ en présence accrue d'oxygène (oxydation dans l'atmosphère par exemple). C'est ce dernier, le NO₂, qui est responsable, en action conjointe avec les poussières des couches brunâtres d'air pollué situées en altitude des villes polluées et qui intervient dans la formation de l'ozone. (Zhang *et al.* 2014)

- **Les composés organiques volatils (COV)** : Les COV regroupe une multitude de substances parmi lesquelles on retrouve le carbone et ses combinaisons avec l'hydrogène mais aussi les composés carbonés et carboxylés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les polychlorobiphényles, les chlorofluorocarbures, *etc.* Mal définis, ils sont émis dans les gaz d'échappement, par évaporation au niveau du carburateur et par perte. (Che *et al.* 2009)

- **Le dioxyde de soufre (SO₂)** : Il est émis lors de la combustion incomplète de combustibles fossiles soufrés. Cependant, ce composé est de moins en moins émis en raison des normes de plus en plus sévères sur les teneurs en soufre des carburants (Sunyer *et al.* 2003)

- **Les particules (Figure I.4)** : Elles sont principalement émises à partir des échappements et de l'usure des matériaux. Il est d'intérêt de prendre en compte que les particules sont à la fois émises et remises en suspension lors du passage des véhicules. Elles sont de tailles et de compositions variées selon leur origine de production. Les particules Diesel, par exemple, sont constituées d'un squelette carboné recouvert d'une couche de composés organiques dont des HAP plus ou moins volatils selon leur poids moléculaire (Figure I.4). Ces particules de petite taille ont la capacité de pénétrer profondément dans l'arbre respiratoire. (Pant et Harrison 2013)

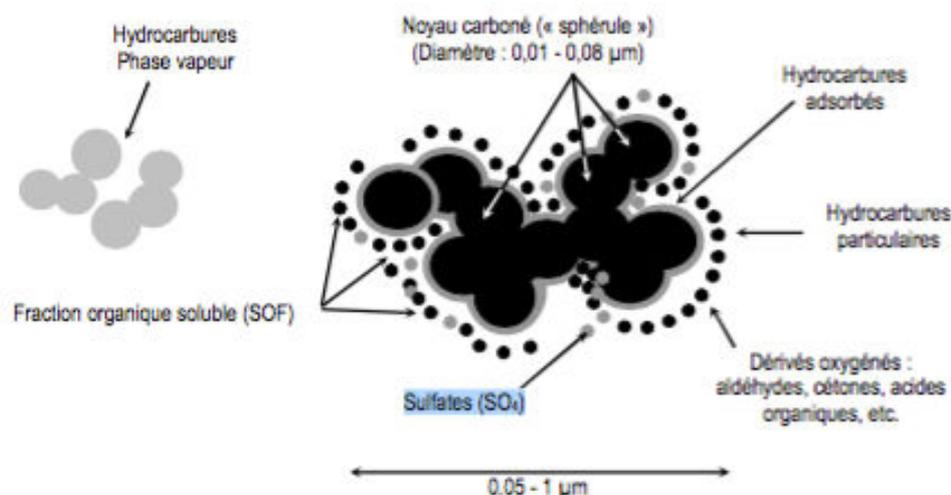


Figure I.4 : Représentation schématique de particules Diesel. Les particules issues des émissions liées à l'échappement proviennent de processus de combustion incomplète. Elles ont une structure complexe constituée de carbone élémentaire constituant le cœur carboné et de carbone organique adsorbé constitué d'une grande diversité de composés dont des HAP. (Source : Delatrax 2002)

- **Les métaux lourds :** Ils sont émis la plupart du temps sous forme particulaire. On compte parmi eux le manganèse, le cuivre, le zinc, le cadmium qui sont issus de l'usure mécanique de certaines pièces et également des métaux précieux comme le platine, le palladium, le rhodium, et le cérium qui sont utilisés dans les pots catalytiques et enfin du nickel et du chrome mais en faible quantité. A cette liste on peut ajouter le magnésium, l'aluminium, le fer, le molybdène (huiles de graissage et usure mécanique de pièces), le baryum et le cobalt (lubrifiants), le sélénium, l'arsenic et le chrome (composants des systèmes de freinage et d'embrayage, transmissions automatiques, etc.) (Malbreil *et al.* 1997)

- **L'ozone troposphérique :** L'ozone est un polluant secondaire dont la formation est due à la présence de NO_x et de COV. Ce dernier est associée à l'altération de la troposphère, directement liée à ses propriétés oxydantes, au niveau environnemental. (Académie des sciences, 1993)

Ces différentes espèces de polluants sont émises selon quatre types d'émissions liées au trafic urbain, au regard de leur origine, présentées ci-après :

- **La pollution liée à l'échappement :** Ce sont les émissions liées au fonctionnement d'un moteur à explosion et aux phénomènes chimiques qui y sont associés. Il faut différencier au sein de ces émissions les surémissions lorsque le moteur est froid et les émissions du moteur chaud. En effet, lorsque le moteur ne fonctionne pas à son rendement optimal les

émissions liées au processus de combustion peuvent être supérieures à la normale. On attribue ces émissions au mode d'utilisation du véhicule mais aussi aux systèmes de motorisation, carburants, huiles et dispositifs anti-pollution ;

- **La pollution par évaporation de carburant** : Il existe trois types d'évaporations (les évaporations lors du déplacement, celles lors du refroidissement du véhicule et celles à température ambiante). Ce sont les véhicules à essence qui sont les plus concernés par ce type de pollution en raison notamment de la perméation du carburant au travers des composants plastiques. Les véhicules « Diesel » sont moins concernés en raison de la présence d'hydrocarbures plus lourds qui entraînent une pression de vapeur du carburant plus faible ;

- **La pollution liée à l'usure** des composants automobiles et de leur environnement : Ces émissions incluent surtout des particules, des métaux lourds et des gaz et sont dues principalement aux modes d'utilisation du véhicule ;

- **La pollution liée à la resuspension des particules** : ces émissions sont entièrement dues à la remise en suspension de particules précédemment émises et déposées soit sur la surface de la route soit sur les différents composants du véhicule.

La pollution liée à l'échappement et à l'évaporation des carburants a fait l'objet de nombreuses études car elle concerne des composés dont les effets sanitaires sont pour beaucoup établis. Cependant, **les émissions non-liées à l'échappement** font l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années. Ces émissions constituées globalement de métaux lourds recondensés en particules et de particules intrinsèques seront l'objet de la prochaine partie.

i. Les particules de la pollution non-liée à l'échappement

Même si, pour l'instant, les études en relation avec les émissions non liées à l'échappement sont peu nombreuses, leur utilité est croissante. En effet, au regard des prévisions statuées par Hooftman *et al.* en 2016, la part non-liée à l'échappement de l'émission de PM₁₀ en milieu urbain est plus importante que celle liée à l'échappement depuis quelques années et tend à s'accroître comme l'illustre la Figure I.5. En effet, si de nombreuses réglementations relatives aux émissions liées à la combustion incomplète des carburants, lors du processus d'échappement, ont vu le jour ces dernières années **aucune mesure** ne statue sur les

émissions non-liées à l'échappement. Pourtant, ces dernières ont une part de plus en plus importante dans l'aérosol de nos villes.

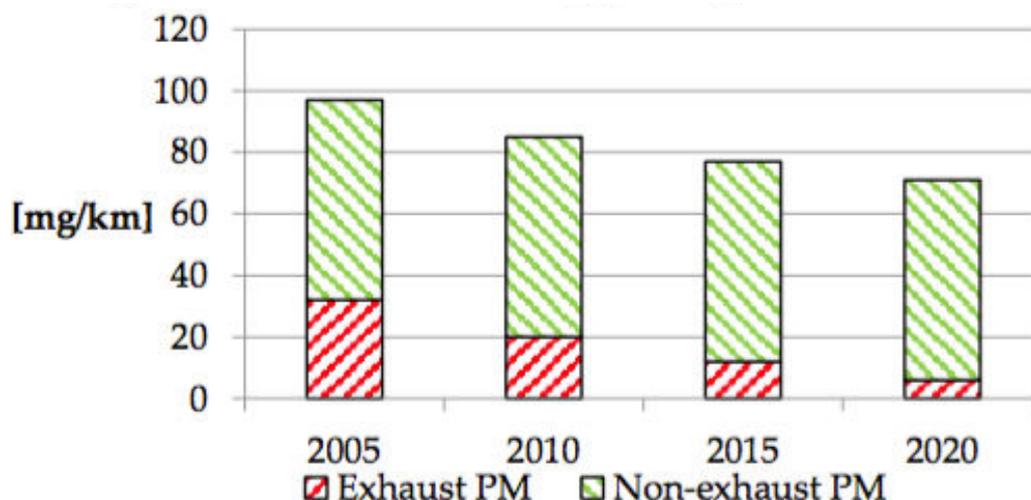


Figure I.5 : Origine des émissions de PM₁₀ urbaines Les PM₁₀ urbaines, majoritairement issues du trafic routier peuvent trouver leur origine dans deux types d'émissions liées au trafic routier : les émissions liées à l'échappement et les émissions non liées à l'échappement. Ce sont ces dernières qui représenteront à l'avenir la majeure partie des émissions liées au trafic routier. (exhaust : échappement ; non-exhaust non échappement, Source : Hooftman *et al.* 2016)

Les **émissions non-liées à l'échappement** correspondent en fait à l'usure de différents composants du véhicule et à l'usure de la route. En effet, **les pneus et les freins** sont des équipements renouvelés souvent sur les automobiles et si ces derniers sont renouvelés c'est parce qu'ils sont usés, régulièrement abrasés par les frottements encourus. Il est d'ailleurs recommandé de changer les plaquettes de freins tous les 10 000 kilomètres alors qu'on remplace les pneumatiques tous les 40 000 à 50 000 km. D'autres composants s'usent également tels que la carrosserie ou encore l'embrayage du fait de l'érosion quotidienne.

c. Les particules d'usure des freins

i. Considérations générales sur le processus de freinage

Il existe **différents types de système de freinage** présentés schématiquement en Figure I.6. Cependant, le principe de freinage reste le même : il consiste à réduire la vitesse du véhicule en convertissant l'énergie cinétique en chaleur. Pour les **freins à disque**, l'action de freinage consiste à pincer un disque en acier, fonte ou carbone céramique à l'aide d'un étrier renfermant deux plaquettes. Pour le **frein à tambour**, c'est un système de ressort qui entraîne le déploiement des garnitures de freins contre le tambour. Dans les deux cas, les forces de

frictions réduisent l'énergie cinétique et ralentissent alors le véhicule. Le mouvement de freinage est actionné par transmission hydraulique via une pédale située sous le pied du conducteur.

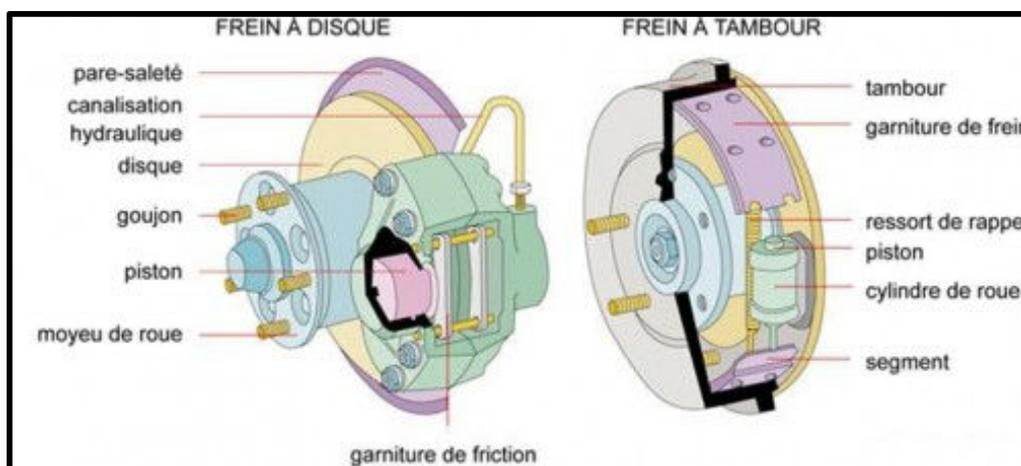


Figure I.6 : Les différents types de systèmes de freinage Il existe différents types de systèmes de freinage qui sont employés en accord avec les caractéristiques du véhicule. (Source : www.infovisual.com)

La **composition des systèmes de freinage** est très complexe puisqu'ils peuvent contenir jusqu'à plus d'une trentaine de constituants de nature métallique, minérale, organique, céramique *etc.*

Cependant au regard de leur composition, il est possible de classer les freins en trois familles différentes (Sanders *et al.* 2013) :

- Les **freins organiques** sans amiante. Ils descendent des freins qui contenaient précédemment de l'amiante qui a dû être remplacée par d'autres fibres et notamment des fibres de titanate de potassium
- Les **freins faiblement métalliques** ayant une teneur élevée en abrasif permettant une performance optimale
- Les **freins semi-métalliques** constitués surtout de fibres d'acier et de poudre de fer

Une étude exhaustive des éléments de garnitures a été réalisée par Thorpe et Harrison (Thorpe et Harrison 2008) permettant de distinguer différents sous-types de composants du matériel de freinage :

- **Les fibres** qui offrent une résistance mécanique sont composées de métaux divers, de carbone, de verre, de kevlar, de céramiques et de minéraux. Ils représentent 6 à 35% du volume du frein selon les modèles

- **Les lubrifiants** qui aident à la stabilisation des propriétés de frottement en particulier à des températures élevées, sont composés de graphite et de sulfures métalliques (tels que Sb_2S_3). Ils représentent 5 à 30% du volume du frein selon les modèles
- **Les charges** qui sont incorporées pour réduire les coûts de fabrication et améliorer la manufacturabilité. Il s'agit en général de barytine ($BaSO_4$), de calcite ($CaCO_3$) ou encore de mica (groupe minéral de silicates). Elles représentent 25 à 70% du frein en volume selon les modèles
- **Les liants** qui sont importants pour le maintien de l'intégrité structurale des garnitures soumises aux contraintes mécaniques et thermiques. Ils sont essentiellement sous forme de résine phénolique mais leur nature est largement dictée par les performances voulues du produit final. Elles représentent 20 à 40% du volume du frein selon les modèles.

Lors du **processus de freinage**, la température élevée et l'abrasion violente consécutive à la friction conduisent à une altération des matériaux et à la modification de leur chimie de surface favorable à la **génération de particules**.

Deux méthodes d'échantillonnage peuvent être recensées dans la littérature pour la collection de particules d'usure des freins : **l'échantillonnage sur banc d'essai** et **l'échantillonnage sur véhicule roulant**.

Le **banc d'essai des freins** (Figure I.7) aussi appelé banc dynamométrique permet de travailler sur des scénarii de freinage préétablis informatiquement. Il s'agit d'un dispositif sur lequel on fixe un système de freinage. Ce système est beaucoup utilisé pour caractériser la dynamique de génération de particules d'usure des freins selon divers scénarii (variations de vitesse, de température, freinage doux à brusque). Ce type de dispositif présente l'avantage de relier des émissions particulières à des scénarii de conduite précis cependant il ne prend pas en compte les paramètres extérieurs au véhicule. Ce dispositif a été utilisé par un de nos fournisseurs.

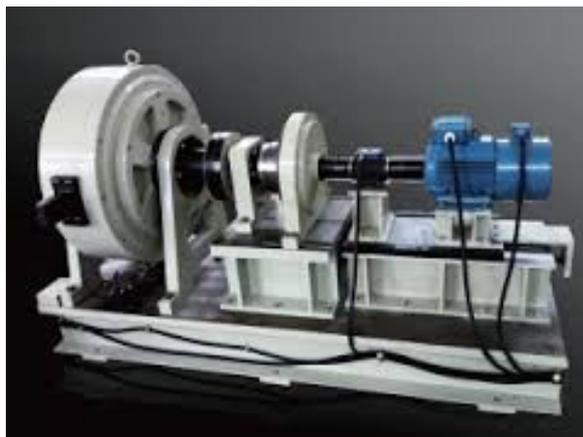


Figure I.7 : Banc d'essais des freins Le banc d'essais des freins constitue un système permettant le test de différents éléments du système de freinage. Mais il s'agit aussi d'un dispositif permettant de produire des particules selon des scénarii de freinage contrôlés. (Source : <http://qy-machine.fr/11-magnetic-dynamometer.html/164260/>)

Il est également possible de réaliser des collectes de particules d'usure des freins sur **véhicule roulant** qui subira des phases de freinage soient contrôlées soient représentatives d'un cycle de conduite réaliste. Dans ce cas, plusieurs possibilités sont disponibles pour organiser une campagne de génération de particules.

En conditions contrôlées, le véhicule est positionné sur un **décéléromètre** (Figure I.8). Ce dispositif est communément utilisé pour vérifier le système de freinage lors du contrôle technique des véhicules légers de particuliers. Il permet d'imposer différents scénarii de freinage au véhicule entier permettant la génération de particules en prenant en compte différents paramètres qui peuvent affecter la génération des particules tels que le poids du véhicule.



Figure I.8 : Décéléromètre Le décéléromètre est un dispositif qui permet de mimer le freinage d'une voiture en appliquant une vitesse donnée et un scénario de freinage précis au système de roulement sur une plateforme fixe. (Source : <http://www.equipgaragefrance.fr>)

Le véhicule peut aussi subir un roulage en conditions réelles de circulation afin de générer des particules sur différents scénarii de conduite courante ce qui entraîne la génération de particules plus représentatives de celles rencontrées dans l'air de nos villes. Un de nos centres de collecte utilise ce procédé. Au sein de ce dernier, différents types de composants automobiles sont testés ce qui implique la réalisation de scénarii de conduite divers et variés comme retrouvés en routine.

Afin de **collecter les particules**, plusieurs stratégies peuvent être mises en œuvre. Il est possible de démonter le système de freinage afin de collecter les particules par **effleurement** des composés du système de freinage ; il y aura alors une collecte de particules toutes tailles confondues à la fois « âgées » et produites plus récemment donc considérées « fraîches ». Il est aussi possible d'installer des **impacteurs** (Figure I.9) à proximité du lieu de production des particules si ce lieu de production est fixe comme un dynamomètre ou un banc de test. L'impacteur est un système dans lequel l'air ambiant entre et les particules sont collectées selon leur taille par l'intermédiaire de différents filtres. Les filtres retenant les particules sont ensuite collectés.



Figure I.9 : Impacteur en cascade : Il existe différentes formes d'impacteurs, dispositifs communément utilisés pour le prélèvement de particules en fonction de leur taille. (Source : <https://lcpa.univ-littoral.fr/equipements/prelevements-et-analyse-des-aerosols-inorganiques/>)

ii. Etat des recherches sur les particules d'usure des freins

L'étude des **particules liées à l'usure des freins** dérive des études liées à l'amiante, puisque les garnitures de freins pouvaient autrefois contenir de l'amiante. Les particules liées à l'usure des freins sont des particules fines constituant une source non négligeable de pollution liée au trafic urbain (Adachi et Tainosho 2004, Mosleh *et al.* 2004). En effet, les **freins à tambour** émettent des particules à hauteur de **30 mg/km/véhicule** (Kukutschova *et al.* 2009) et les **freins à disques** émettent **9 mg/km/véhicule** de particules (Garg *et al.* 2000). Divers paramètres influencent la quantité de particules produites : la fréquence de freinage, la densité du trafic, la distance d'arrêt, les conditions climatiques, *etc.* (Zhao *et al.* 2015).

La poussière de frein peut représenter jusqu'à **55% des émissions en masse non liées à l'échappement** (Kukutschova *et al.* 2011) ; en masse, 35% à 50% de la plaquette devient aéroportée sous forme de PM₁₀ (jusqu'à 83%), PM_{2,5} (jusqu'à 63%), PM_{0,1} (jusqu'à 33%). (Garg *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2015).

La sédimentation des particules produites est lente ainsi les particules de freinage peuvent être transportées jusqu'à plusieurs centaines de kilomètres de leur lieu de production. (Grigoratos *et al.* 2015).

Taille des particules émises lors de l'usure des freins

La **taille des particules issue de l'usure des freins** est **très variable**, de quelques nm à plusieurs microns (Thorpe et Harrison 2008). Cette dernière est affecté par la discontinuité/continuité du freinage et son intensité : plus le freinage est répété et plus les particules seront petites (Mosleh *et al.* 2004). La température de friction est aussi un élément déterminant : plus la température est élevée et plus les particules sont fines (Kukutschova *et al.* 2011). Mais d'autres paramètres peuvent intervenir comme le poids et la vitesse du véhicule. La distribution en taille est souvent bimodale avec des nanoparticules d'une part et des particules micrométriques d'autre part suspectées d'être des agrégats de particules nanométriques (Thorpe et Harrison 2008).

Composition des particules émises lors de l'usure des freins

L'élément majoritaire des particules émises lors de l'usure des freins est le **fer**. Il est présent à hauteur de 1 à 3 mg/m³ (Gasser *et al.* 2009). La présence élevée en fer s'explique par le fait que l'hématite (α -Fe₂O₃) et la magnétite (Fe₃O₄) soient fréquemment utilisés comme abrasifs (Zhao *et al.* 2015).

Le **cuivre** est le second élément le plus représenté à hauteur de 33 à 163 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de poussière émise lors de l'usure des freins (Thorpe et Harrison 2008). Par ailleurs, une étude a estimé que 50 à 99% du cuivre issu de la pollution atmosphérique trouvait son origine dans l'usure des freins (Thorpe et Harrison 2008).

Dans certains systèmes de freinage, il est possible de constater la présence d'**antimoine**. L'enrichissement en antimoine entraîne dans ce cas une pollution atmosphérique à hauteur de 32 $\mu\text{g}/\text{frein}/\text{voiture}$ de PM_{10} et 22 $\mu\text{g}/\text{frein}/\text{voiture}$ de $\text{PM}_{2,5}$. (Iijima *et al.* 2007) La détection d'antimoine dans l'air ambiant est spécifiquement liée au freinage car il n'y a pas d'autre source connue. La toxicité de ce composé n'est pas clairement établie et serait dépendante de la forme. L'INERIS (Institut National de l'Environnement industriel et des RISques) insiste sur le fait que cette substance peut être cancérogène (Bisson *et al.* 2007). L'Agence de Protection Environnementale (EPA) aux Etats-Unis a fixé une limite d'exposition en cas d'inhalation chronique à 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ d'air.

D'autres composants plus minoritaires peuvent être retrouvés tels que le **manganèse** présent à hauteur de 9 à 28 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ou encore le **carbone** sous forme organique à hauteur de 120 à 258 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; ou élémentaire à hauteur de 12 à 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Gasser *et al.* 2009 ; Grigoratos *et al.* 2015).

2. Les spécificités des nanoparticules métalliques

a. Considérations générales sur les nanoparticules

Le terme **nanoparticule** est utilisé pour définir une particule ayant au moins une dimension inférieure à 100 nm (Norme ISO TS/27687).

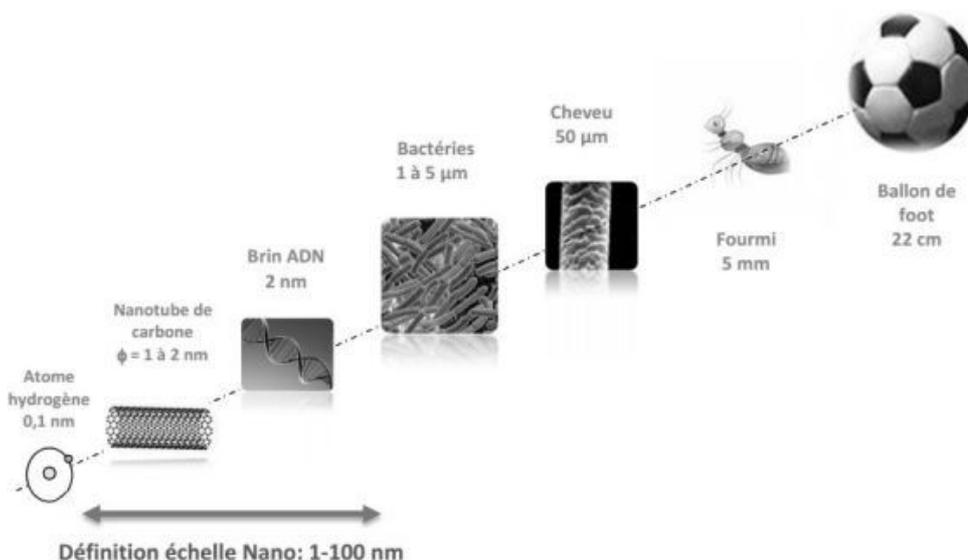


Figure I.10 : Situation de l'échelle « nano ». Si les nanomatériaux sont 10^6 fois plus petit qu'une fourmi, il est aussi possible de rappeler qu'il existe le même rapport de taille entre une nanoparticule et une orange et entre une orange et la Terre. (Source : <http://veillenanos.fr/>)

Le **nanomonde** fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années en lien avec l'impact économique de l'utilisation des nanoparticules directement lié à leurs potentielles applications attribuées aux propriétés spécifiques développées par la matière à l'**échelle nanométrique**. Pourtant, ces dernières ont toujours existé. En effet, des nanoparticules organiques et inorganiques peuvent être naturellement produites lors d'éruptions volcaniques, de feux de forêt ou de processus microbiologiques. Mais ce sont les propriétés spécifiques des matériaux à l'échelle nanométrique qui en font leur intérêt.

Ces propriétés ont d'ailleurs été déjà mises à profit **depuis des centaines d'années**. En effet, au 4^{ème} siècle, les Romains se sont servis des propriétés optiques uniques des nanoparticules d'argent et d'or pour colorer une coupe en verre, sans connaissances spécifiques à cette époque. Selon que la lumière traverse ou non le verre ce dernier aura une couleur différente.



Figure I.11 : Coupe de Lycurgue. Les nanoparticules d'argent et d'or insérées dans la coupe lui donne une couleur verte qui devient rouge lorsque de la lumière est insérée à l'intérieure de la coupe. (Source : British Museum)

Sources d'émission et domaines d'application des nanoparticules

Les nanoparticules peuvent être émises intentionnellement ou non-intentionnellement à partir de **différentes sources**. Les nanoparticules produites de manière non-intentionnelle peuvent être produites **naturellement** (lors des feux de forêts et éruption volcaniques) mais aussi être d'**origine anthropogénique** (gaz d'échappement et autres processus de pollution). Par ailleurs, les nanoparticules **produites intentionnellement** peuvent l'être selon deux approches : l'approche « **top down** » qui consiste à fragmenter un matériau pré-existant en nanomatériaux et l'approche « **bottom-up** » qui consiste à façonner la matière à l'échelle nanométrique afin de lui donner des propriétés nouvelles. Dans ce sens, il est facile de comprendre l'intérêt économique des nanomatériaux.

Les nanomatériaux trouvent leur intérêt dans de nombreux domaines d'application comme repris par la Figure I.12. En effet, ces derniers, de part les nouvelles propriétés de la matière à l'échelle « nano », permettent de nombreuses applications permettant de créer de nouveaux produits ou de booster les performances de ceux existant déjà.

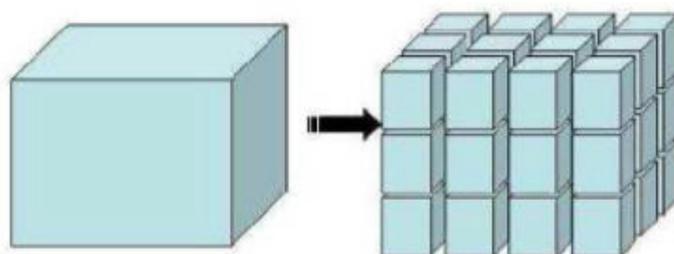


Figure I.13 : Modification de la surface spécifique selon la taille. Si l'on prend l'exemple d'une particule micrométrique cubique de 1 μm de côté, la surface cumulée de l'ensemble de ses faces est de 6 μm^2 et son volume est de 1 μm^3 soit 10^3 nm^3 . Par contre si l'on divise cette microparticule en petites nanoparticules d'1nm de côté, le volume cumulé devient alors 10^9 nm^3 et la surface cumulée atteindra $6 \times 10^9 \mu\text{m}^2$. Ainsi, à volume égal, une microparticule et une nanoparticule peuvent avoir un rapport de surface de 10^3 . (Source : Pailleux *et al.* 2012 adapté de Zeyons *et al.* 2008)

Par ailleurs, à l'échelle nanométrique, les particules ont une réactivité biologique accrue comme le présente la Figure I.14. En effet, selon leur taille, leur forme, leur composition, leur instabilité en surface, les nanoparticules peuvent avoir des interactions différentes avec l'environnement biologique auquel ces dernières sont soumises. Enfin, ce comportement est prédictif à la fois de l'impact mais aussi du devenir de ces nanoparticules (Nel *et al.* 2009).

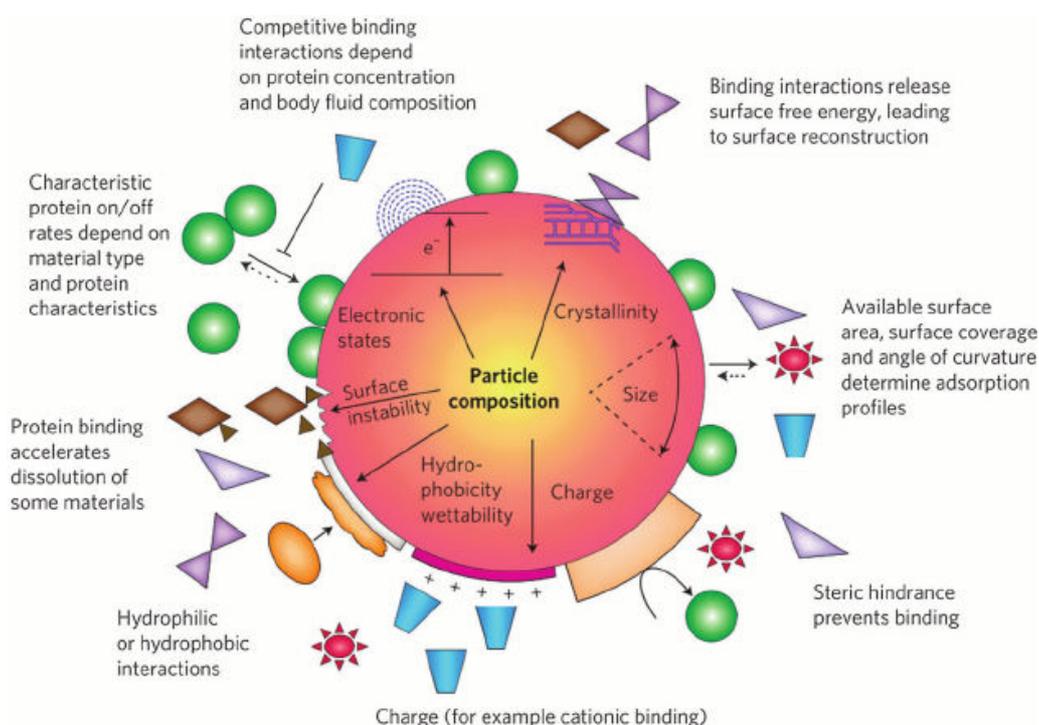


Figure I.14 : Propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules dictent les interactions biologiques de ces dernières. La forme, la surface, la taille et la cristallinité sont autant de paramètres pouvant influencer sur le comportement des nanoparticules. (Nel *et al.* 2009)

b. Les nanoparticules d'oxyde de fer

Une nanoparticule d'oxyde de fer est un objet composé de **fer et d'oxygène** dont au moins une des trois dimensions est inférieure à 100 nm.

Il existe **14 types d'oxydes de fer**, hydroxydes et oxydes/hydroxydes divisés en trois grands groupes et listés ci-après (Cornell et Schwertmann, 2000) :

- **Oxydes** : oxyde de fer II (wüstite, FeO), oxyde de fer II/III (magnétite, Fe₃O₄), oxyde de fer III (alpha-phase : hématite α -Fe₂O₃ ; beta-phase β -Fe₂O₃ ; gamma-phase : maghémite γ -Fe₂O₃ ; epsilon phase : ϵ - Fe₂O₃)
- **Hydroxydes** : hydroxyde de fer II (Fe(OH)₂), hydroxyde de fer III (bernalite Fe(OH)₃)
- **Oxydes/hydroxydes** : goethite (α -FeOOH), akaganéite (β -FeOOH), lepidocrocite (γ -FeOOH), feroxyhyte (γ -FeOOH), ferrihydrite, schwertmannite

Les différents types de dérivés du fer sont utilisés dans différents domaines comme représenté sur le schéma ci-après (Figure I.15).

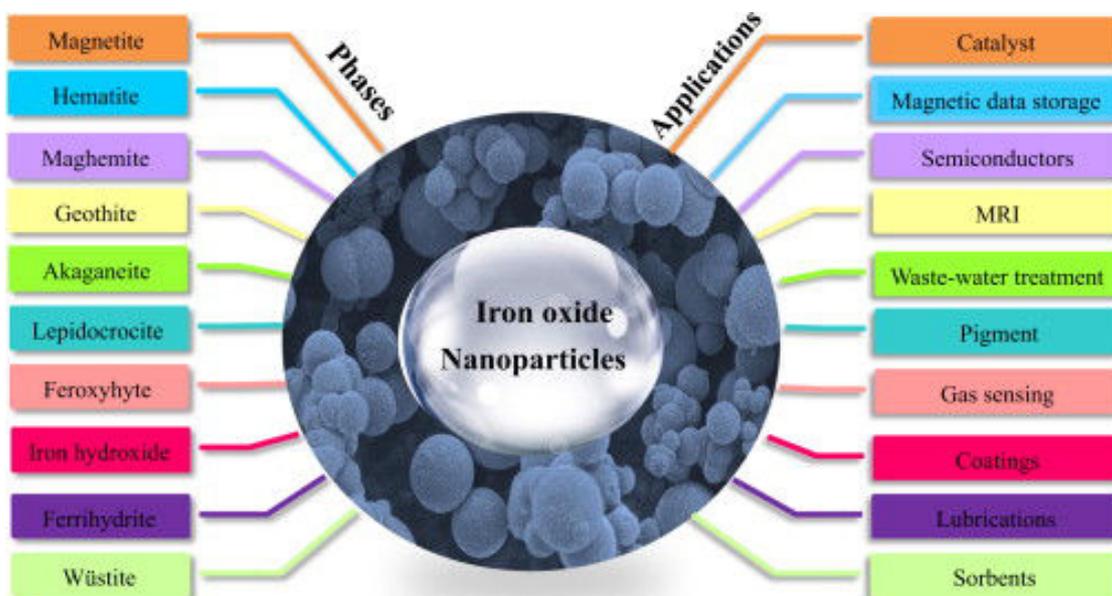


Figure I.15 : Applications des différents types de particules d'oxydes de fer. Les nanoparticules de fer font partie les nanomatériaux les plus étudiés et les plus utilisés en raison de leur potentialité importante dans une grande variété de domaines. (Source : Ramimoghadam *et al.* 2014)

L'oxyde de fer le plus représenté est l'oxyde de fer III ayant comme formule Fe₂O₃. **L'hématite minérale (α -Fe₂O₃)** est la source principale de fer pour la fabrication industrielle de l'acier. Elle est de couleur brun rougeâtre, sensible aux acides et a des propriétés

paramagnétiques ; elle est plus souvent connue sous le nom de rouille. (Rahman *et al.* 2011). Les substances paramagnétiques comme l'hématite sont attirées en direction d'un champ magnétique. En effet, elles contiennent des électrons non appariés qui sont aléatoirement alignés sur différents atomes qui peuvent chacun être envisagés comme étant de petits aimants. En utilisant un champ magnétique, il est possible de guider l'orientation de ces aimants parallèlement au champ magnétique (Bozhinova *et al.* 2004). La susceptibilité magnétique des matériaux paramagnétiques est dépendante de la température, positive mais faible ($<0,01$). Son comportement est régi par la loi Weiss-Curie (Ramimoghadam *et al.* 2014). Les nanoparticules d'hématite sont principalement synthétisées par synthèse hydrothermale qui consiste à cristalliser des substances à partir de solutions aqueuses de Fer à haute température et à de hautes pressions (Rahman *et al.* 2011).

La magnétite (Fe_3O_4) est un minéral ubiquiste commun ferromagnétique. Mais, dans notre étude, nous utilisons des nanoparticules de **maghémite** ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Il s'agit d'une espèce minérale formée par thermolyse de la lépidocrocite. Cette dernière doit son nom à la **contraction de maghémite et hématite** puisqu'elle possède une structure cristalline comparable à la première mais une composition chimique identique à la seconde (Cudennec *et al.* 2005).

3. Nanotoxicologie

a. Considérations générales sur l'exposition aux nanoparticules

La production et l'utilisation croissante de nanoparticules manufacturées a initié la prise de conscience par les autorités gouvernementales, les organisations industrielles et la société civile, de la nécessité d'appliquer le principe de précaution face au risque engendré par les nanomatériaux. (Commission Européenne, 2000) Les propriétés « nouvelles », l'information incomplète à propos du risque lié aux nanomatériaux, leur taille et composition très variable compliquent l'application du principe de **toxicologie conventionnelle**. Il a alors été suggéré qu'une approche plus générique pourrait être une solution afin de définir des limites d'exposition relatives à certains groupes de nanomatériaux. (Schulte *et al.* 2010)

i. Utilisation actuelle et état de recherche/réglementation

Malgré de nombreuses études, très peu de données précises et spécifiques sont disponibles sur la toxicité des nanoparticules, cependant chaque personne y est plus ou moins exposés dans des situations de la vie quotidienne sur le plan personnel ou professionnel. En France, deux décrets applicables depuis janvier 2013 permettent d'améliorer les connaissances sur l'usage des nanoparticules et leur traçabilité.

Le **décret n°2012-232** du 17 février 2012 statue sur l'obligation de déclarations des **distributeurs de substances nanoparticulaires** (importateurs, entreprises, producteurs). En effet, ce dernier impose la déclaration, avant le 1^{er} mai de chaque année, des quantités et usages de substances nanoparticulaires produites, distribuées ou importées. Le décret est plus souple en matière de recherche, la déclaration étant restreinte s'il n'y a pas de mise sur le marché de produit. Il est prévu selon le code de l'environnement (articles L523-1, L-523-2 et L-523-3) que l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) exploite ces déclarations et les données qu'elles contiennent.

Le décret **n°2012-233** du 17 février 2012 liste ensuite les organismes susceptibles de collecter les informations de l'ANSES afin d'entrer dans une **logique d'évaluation des risques** comme prévu dans le Code de l'environnement (Article L-523-3) : InVS (Institut national de Veille Sanitaire), INRS (Institut National de Recherche et Sécurité), INERIS (Institut National de l'Environnement industriel et des Risques), ANSM (Agence Nationale pour la Sécurité du Médicament) et organismes chargés de pharmacovigilances (indiqués dans le code de santé publique – article L1341-1)

b. Voies d'entrées des nanoparticules et biodistribution dans l'organisme

Il existe **trois voies d'entrées potentielles** des nanoparticules dans l'organisme. Cependant la **voie d'entrée respiratoire** étant la **plus probable**, lors d'une exposition non désirée, il s'agit de la voie d'entrée principalement étudiée. De plus, la voie respiratoire est assujettie aux problèmes liés à la translocation des nanoparticules. En effet, la voie respiratoire est le siège des échanges gazeux entre les poumons et la circulation systémique offrant ainsi l'opportunité aux nanoparticules de pénétrer la circulation sanguine grâce à la fine barrière séparant les alvéoles pulmonaires des capillaires sanguins. Aussi, la voie respiratoire est intimement liée à la voie digestive. La **biodistribution** dans l'organisme des nanoparticules est un domaine

largement étudié. En effet, en raison de leur petite taille, les nanoparticules ont la propriété de se faufiler dans les moindres recoins de notre organisme ; ce qui n'est néanmoins non sans conséquence. En effet, une étude de Buzea *et al.* a permis de mettre en évidence que les nanoparticules semblent être responsables de **diverses pathologies** d'un point de vue **épidémiologique**. (Buzea *et al.* 2007)

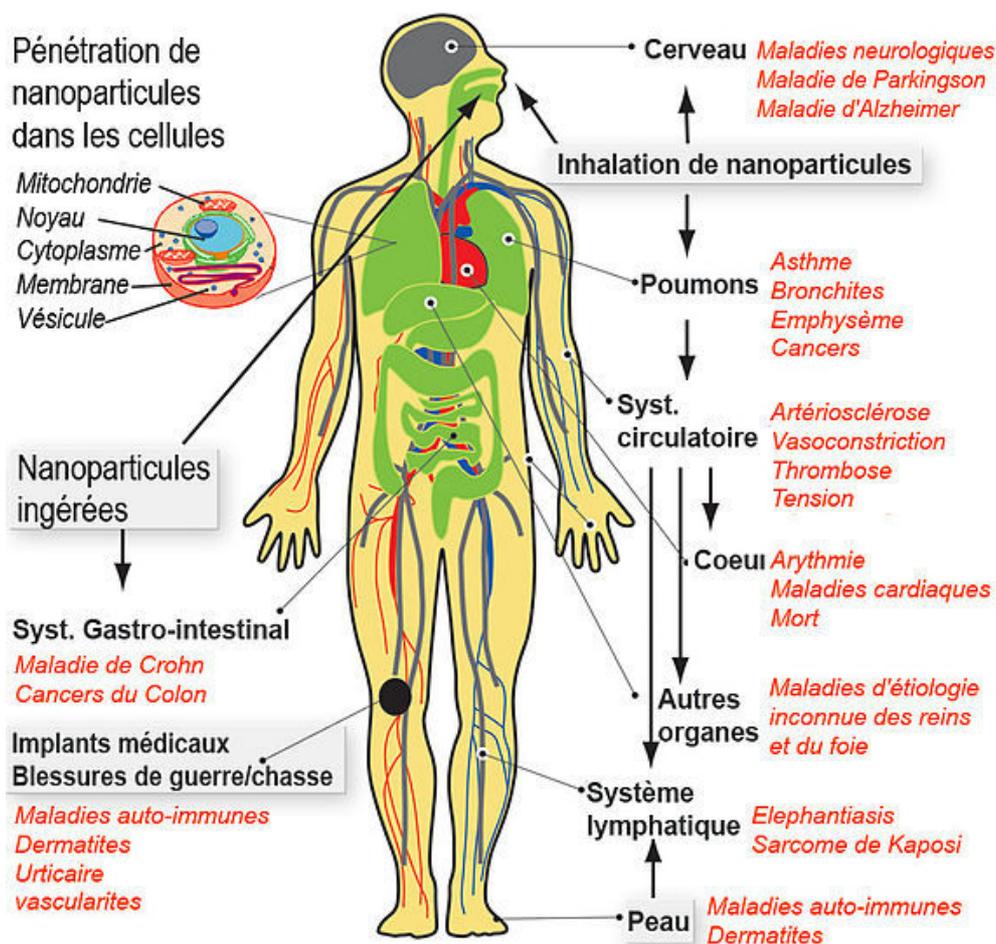


Figure I.16 : Maladies potentiellement associées à l'exposition aux nanoparticules. D'un point de vue épidémiologiques, l'association entre l'exposition aux nanoparticules et le développement de diverses maladies a été clairement établi. Cependant, une preuve de concept de causalité reste à établir (Adapté de Buzea *et al.* 2007)

4. L'appareil respiratoire : cible des particules inhalées

a. L'appareil respiratoire : Anatomie fonctionnelle

L'appareil respiratoire est composé de deux régions :

- Les **voies aériennes supérieures** (extra-thoraciques) s'étendent des fosses nasales à l'entrée de la trachée et celles **inférieures** (intra-thoraciques) vont de cette dernière aux bronchioles. Les voies aériennes assurent la conduction de l'air dans l'appareil

respiratoire, son réchauffement, sa saturation en eau et son épuration avant qu'il n'atteigne le poumon profond

- Les alvéoles qui sont responsables des échanges gazeux

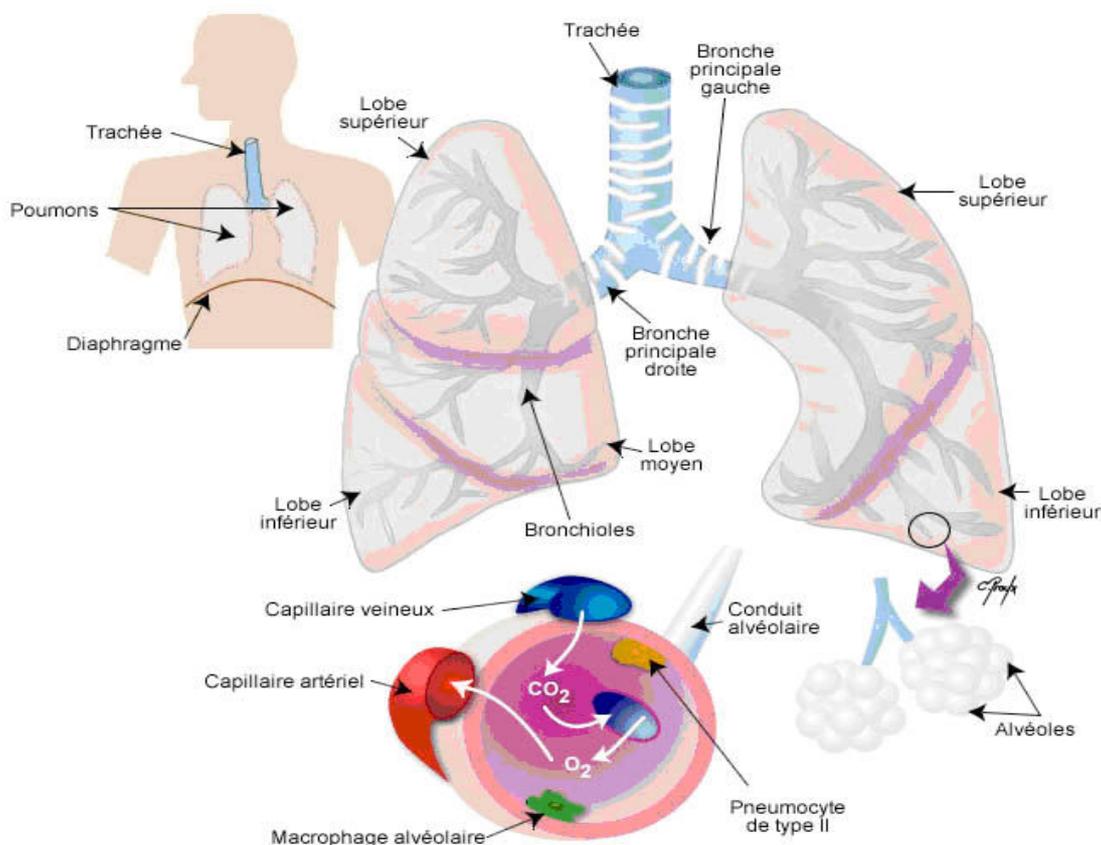


Figure I.17 : Anatomie respiratoire. Le système respiratoire est composé des voies aériennes supérieures et inférieures qui conduisent l'air jusqu'au alvéoles où se produit l'échange gazeux entre le compartiment aérien et le compartiment sanguin. (Source : <http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/images/respiration/Poumons-humains.jpg/>)

Les voies respiratoires sont un ensemble de conduits complexes qui se divisent de façon dichotomiques à partir des bronches et qui résultent en l'**apport final d'oxygène**, nutriment essentiel du métabolisme humain (Figure I.17).

b. Histologie des voies respiratoires

Les voies respiratoires se caractérisent par une **histologie complexe** qui favorise le **rôle de barrière** envers les éventuels contaminants/polluants qui pourraient être inhalés lors du processus de respiration.

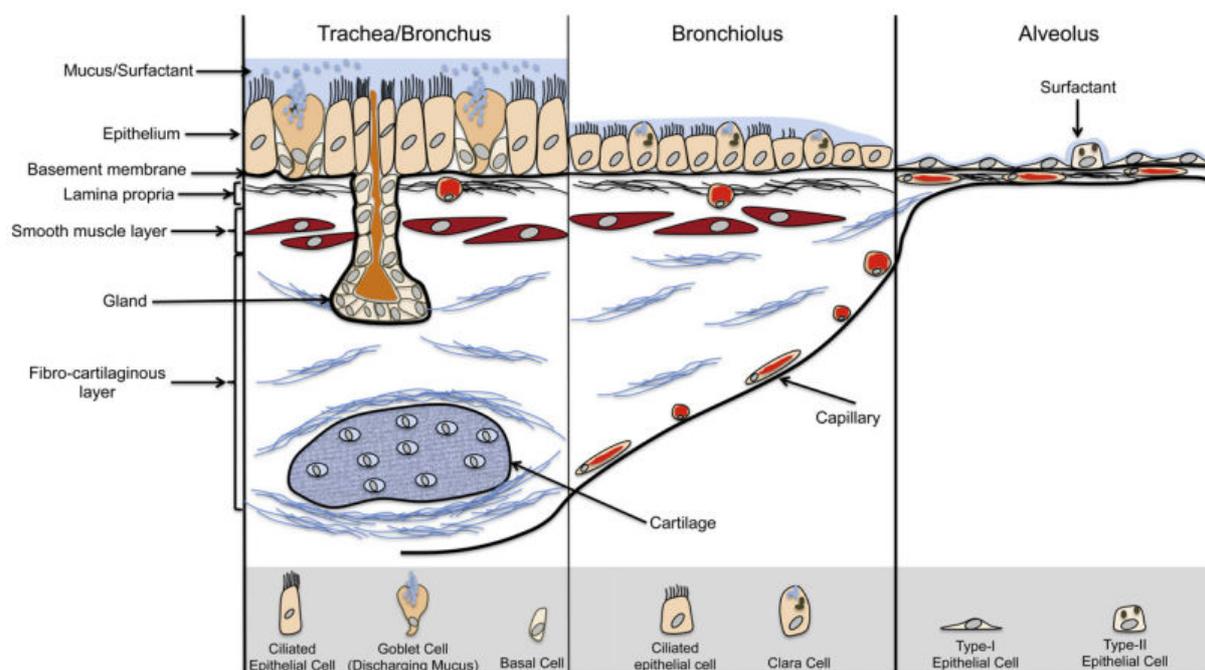


Figure I.18 : Structure histologique des voies respiratoires. La structure histologique de chaque zone des voies respiratoires est en lien étroit avec leur activité respective. Au fur et à mesure que l'on pénètre dans les voies respiratoires, la structure histologique de ces dernières s'affine afin de faciliter les échanges gazeux. (Source : Hittinger *et al.* 2015 adapté de Klein *et al.* 2011)

La structure histologique des voies respiratoires (Figure I.18) est organisée pour faciliter la conduction par ses propriétés de rigidité, flexibilité et extensibilité. La composition histologique des voies respiratoires évolue de la trachée à l'alvéole en lien avec l'adaptation due à la fonction et au diamètre de la zone concernée.

La muqueuse respiratoire est constituée d'un épithélium pseudo-stratifié reposant sur une membrane basale et un chorion conjonctif (*lamina propria*). L'élasticité des voies respiratoires et la broncho-motricité sont permises grâce à l'insertion d'une tunique musculaire lisse entre le chorion et le cartilage. La couche cartilagineuse est variable en lien avec la rigidité nécessaire à la zone d'intérêt.

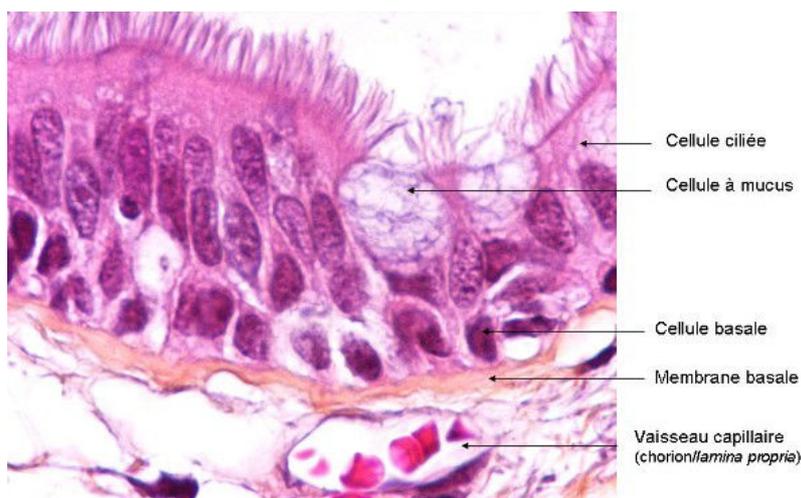


Figure I.19 : Epithélium de type respiratoire. L'épithélium respiratoire présente une structure histologique reconnaissable par l'intermédiaire de la présence de cellules ciliées caractéristiques. (Source : <http://www.respir.com/images/histologieEpithResp1.asp/>)

L'épithélium respiratoire (Figure I.19) renferme **4 types cellulaires** :

- Les **cellules ciliées** sont les plus abondantes. Elles sont pourvues de cils et assurent la clairance muco-ciliaire. Les cils se situant au pôle apical battent à fréquence régulière de manière coordonnée grâce à l'axoméne et sont séparés par des microvillosités.
- Les **cellules à mucus** aussi appelées caliciformes, 5 fois moins nombreuses que les cellules ciliées. Elles ont pour rôle la sécrétion du mucigène qui participe à la formation du mucus avec les sécrétions des glandes séro-muqueuses.
- Les **cellules basales**, très importantes dans le renouvellement de l'épithélium cellulaire. Situées au fond de l'épithélium, elles peuvent se différencier en différents types de cellules respiratoires. Il s'agit des progéniteurs des cellules ciliées et cellules à mucus.
- Les **cellules neuroendocrines** qui sont des chémorécepteurs capables de détecter les variations de teneur en O_2 ou CO_2

Au niveau des alvéoles qui assurent les échanges gazeux l'histologie est sensiblement différente. En effet, dans la zone des échanges gazeux, le tissu conjonctif interstitiel est très riche en fibre élastiques et capillaires sanguins. Deux types de cellules sont retrouvés :

- Les **pneumocytes de type I** qui sont des cellules pavimenteuses, elles remplissent un rôle principalement structural (90 % de la paroi alvéolaire en surface)

- Les **pneumocytes de type II** qui sont des cellules cubiques sécrétant le surfactant au moment de l'expiration et facilite l'expansion alvéolaire lors de l'inspiration en évitant tout risque de collapsus.

c. Facteurs déterminants de la toxicité respiratoire et toxicocinétique

Au niveau pulmonaire, il existe deux sortes de toxiques :

- Les **toxiques inhalés** (polluants gazeux ou particulaires de nature chimique ou biologique) qui peuvent présenter une toxicité pour le poumon et une toxicité ensuite systémique (exemple : monoxyde de carbone)
- Les **toxiques systémiques** (médicaments, pesticides, toxines, additifs alimentaires) qui peuvent présenter une toxicité respiratoire.
-

Cette toxicité est dépendante de plusieurs facteurs :

- Le **volume d'air** consommé par jour (pour un adulte 10-12 m³) soit une exposition correspondant à des toxiques alimentaires qui seraient potentiellement contenus dans 15 kg d'aliments
- La **surface d'échange** (140 m² chez un adulte soit la superficie d'un terrain de volley-ball)
- La **structure de l'épithélium** : quelques micromètres d'épaisseur
- L'**importance du réseau capillaire** nécessaire pour les échanges gazeux (grande circulation assure l'oxygénation de l'organisme, petite circulation nourrit le poumon en tant qu'organe)
- Le **système d'épuration** : les macrophages ne sont pas forcément favorables (par exemple la pneumoconiose qui est une pathologie liée à l'inhalation de poussière est engendrée par leur transformation par les macrophages : amiante, bois, charbon, métal, etc.)
- Le **métabolisme** pouvant être bioactivateur de toxiques : inhalés (par exemple, le naphthalène et le dichloréthylène acquièrent une toxicité respiratoire lorsqu'ils sont métabolisés en substances réactives toxiques) ou systémiques (par exemple, le 4-ipoménaol qui est la toxine assimilée au champignon *Fusarium Solani* ou le Paraquat qui est un pesticide acquièrent une toxicité pour l'organe pulmonaire lorsqu'ils sont métabolisés au niveau systémique)

- La **forte tension en O₂** qui peut engendrer une toxicité liée à un stress oxydant amplifiant la toxicité
- La **loi d’Haber** définie par l’équation suivante :

$$Dose = Concentration \times Temps\ d'exposition \times Fréquence\ respiratoire$$
- Les **caractéristiques de biodistribution** qui dépendent de la solubilité, de la taille et de la réactivité

La biodistribution des toxiques respiratoires soulève la problématique de passage de la barrière respiratoire évoquée. Ce phénomène aussi appelé translocation est un phénomène complexe qui peut présenter des caractéristiques mécaniques différents comme présenté ci-après. Il suggère dans un premier temps la déposition des particules dans l’appareil respiratoire où ces dernières peuvent induire différents effets cellulaires.

i. Déposition *in vitro* et *in vivo* des particules

Le potentiel toxique des particules est en lien étroit avec leur capacité à pénétrer l’arbre respiratoire. Cette dernière est dépendante de la taille qui est un facteur clé au regard du rétrécissement progressif des voies respiratoires.

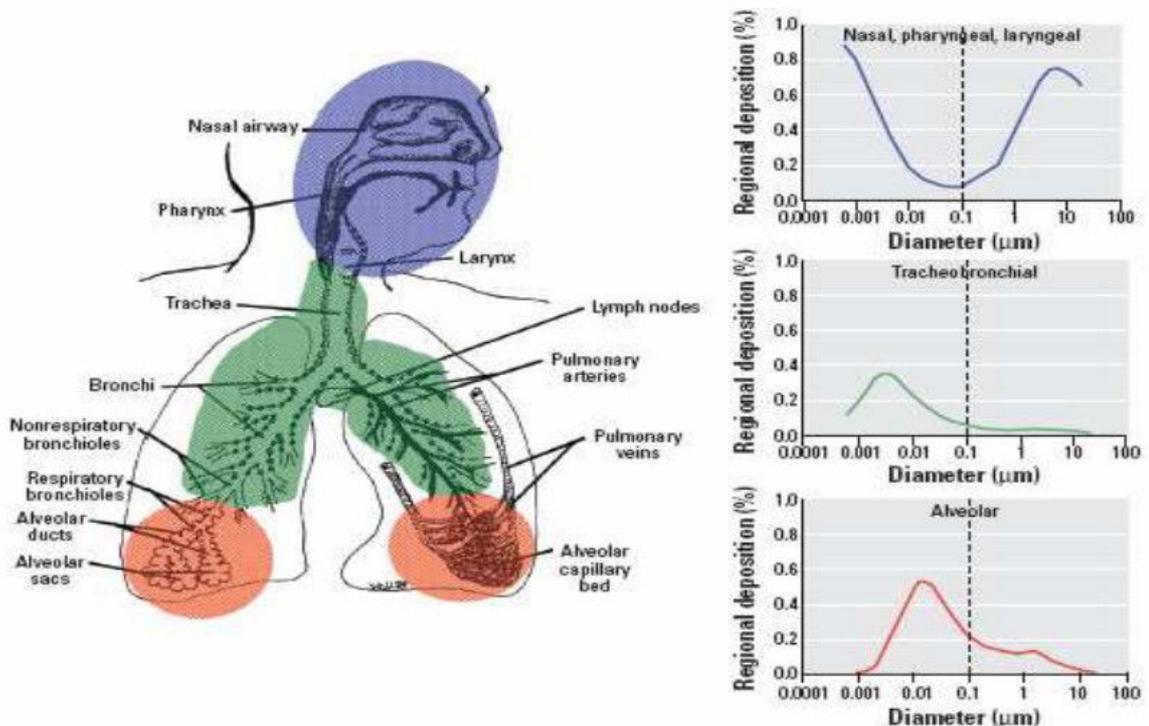


Figure I.20 : Déposition des nanoparticules au niveau respiratoire. La déposition des particules est taille-dépendante. Ainsi, si les grosses particules sont globalement déposées au niveau des voies respiratoires supérieures, les plus petites particules peuvent pénétrer l’arbre respiratoire jusqu’aux alvéoles. (Oberdorster *et al.* 2005)

Une fois déposées, il existe deux modes d'induction possible de la toxicité pour les particules. En effet, ces dernières, peuvent agir localement par induction de cytotoxicité ou agir en induisant des effets systémiques après translocation.

Dans un premier temps, les études de nanotoxicologie consistent à étudier le comportement des nanomatériaux en contact avec des cellules. C'est pourquoi la déposition des nanomatériaux *in vitro* est tout aussi importante que leur déposition *in vivo*. Mais les nanomatériaux ont un comportement particulier en milieu biologique puisqu'ils sont généralement non ou partiellement solubles et forment facilement des agrégats/agglomérats. Ce phénomène influence leur déposition et implique le développement de méthodologies spécifiques pour améliorer la reproductibilité de l'exposition des cellules et caractériser les doses d'exposition afin de permettre la comparaison des études entre elles. Lorsque l'on étudie des composés chimiques, il est suffisant de connaître la dose nominale d'exposition mais pour les objets particuliers cette dernière ne suffit plus (Figure I.21). Il faut connaître la dose effective de nanomatériaux afin de déterminer la dose de nanoparticules qui entrera effectivement en contact avec les cellules et induira une ou des réponses biologiques (Lison *et al.* 2014).

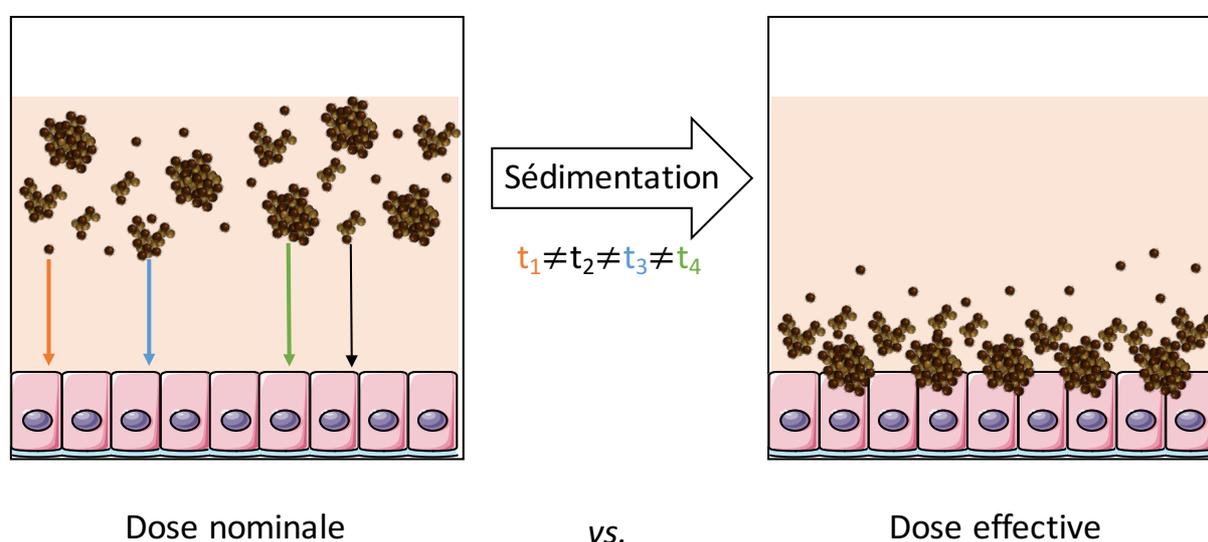


Figure I.21 : Différence entre la dose nominale et la dose effective. Les différents agrégats/agglomérats et les nanoparticules libres sédimentent/diffusent progressivement dans le milieu de culture pour atteindre les cellules à une vitesse différente en fonction de leur densité effective. La dose nominale prend en compte l'intégralité des nanoparticules appliquées contrairement à la dose effective qui ne considère que la dose de nanoparticules qui entre en contact avec les cellules. (Puisney 2016 – Annexe 1)

Afin d'une part standardiser la préparation/caractérisation de la suspension nanoparticulaire et d'autre part de modéliser mathématiquement la dose effective en tenant compte de la diffusion/sédimentation des nanoparticules selon le dispositif expérimental utilisé, le développement d'une méthode de dosimétrie spécifique est nécessaire. La méthode ISDD (pour *In vitro Sedimentation, Diffusion Dosimetry*), développée par l'équipe de P. Demokritou au sein de l'Ecole de Santé Publique d'Harvard est la plus aboutie à ce jour (Demokritou *et al.* US Patent No. 61/661,895). Le principe de cette méthode est résumé en Figure I.22.

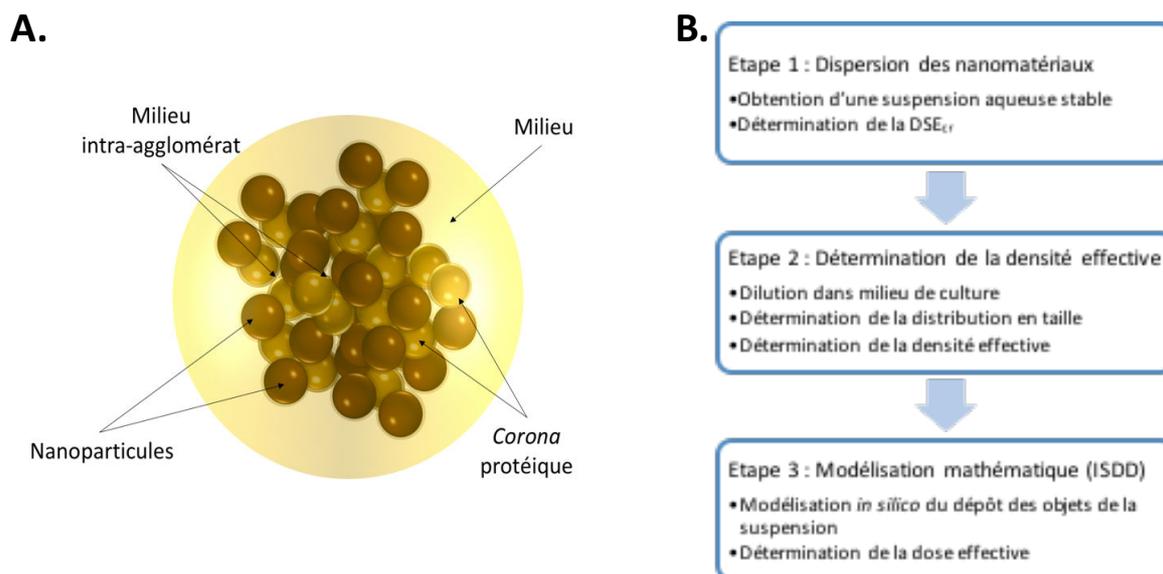


Figure I.22 : Principe de la méthode ISDD. (Puisney 2016 – Annexe 1)

I.22A : La densité effective des agrégats rend compte de la densité des nanoparticules et de la corona protéique formée à leur surface ainsi que de celle du milieu emprisonné entre les nanoparticules de l'agrégat.

I.22B : Récapitulatif des différentes étapes de la mise en œuvre de la méthode de dosimétrie ISDD appliquée aux nanomatériaux (d'après Cohen *et al.* 2014)

ii. Cytotoxicité : Mécanismes d'action

Il existe différents types de mécanismes de cytotoxicité qui peuvent être provoqués par la présence de nanomatériaux au contact des cellules comme le présente la Figure I.23.

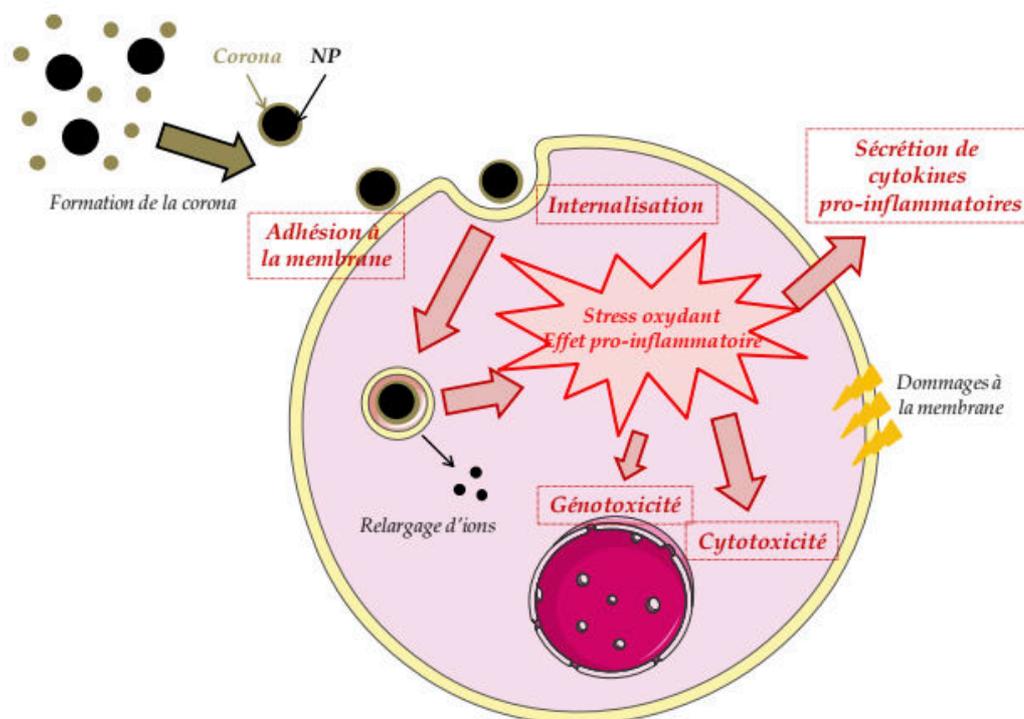


Figure I.23 : Vue d'ensemble des mécanismes de cytotoxicité des nanoparticules. Les nanoparticules ont la capacité d'induire la mort cellulaire par des atteintes de différents composants cellulaires tels que l'ADN ou la membrane mais aussi par leur potentialité intrinsèque à déclencher la réponse pro-inflammatoire ou à engendrer un stress oxydant. (George. 2014, adapté de Horie *et al.* 2013)

Cytotoxicité par atteinte métabolique

La cytotoxicité par atteinte métabolique peut trouver son origine à différents points selon les organelles touchées. Classiquement, en toxicologie, c'est la mitochondrie, siège de la chaîne respiratoire, qui est étudiée. En effet, la mitochondrie joue un rôle important dans des mécanismes cellulaires cruciaux comme la production d'énergie, la différenciation cellulaire ou l'induction de l'apoptose. Par ailleurs, il s'agit d'une organelle très sensible aux composés exogènes (Sun *et al.* 2011).

Avec les nanoparticules d'oxyde de fer, utilisées dans notre étude, l'induction de dommages mitochondriaux n'a pas été clairement établi. Cependant plusieurs études ont mis en évidence une apoptose cellulaire en présence de nanoparticules de fer permettant de suggérer une atteinte mitochondriale (Alarifi *et al.* 2014, Park *et al.* 2014).

Atteinte membranaire

La membrane cellulaire constitue la barrière entre le milieu intra et extracellulaire. Cette dernière permet donc de maintenir l'homéostasie du compartiment cellulaire mais aussi de protéger les organelles d'attaques extérieures. A ce jour aucune atteinte membranaire n'a été identifiée en présence de nanoparticules d'oxyde de fer ou d'usure des freins.

Stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et défenses anti-oxydantes (Betteridge *et al.* 2000). En cas de stress oxydant, de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires peuvent être perturbés aboutissant potentiellement au développement de situations pathologiques. Ce mécanisme peut être retrouvé parmi les mécanismes de cytotoxicité induits par les nanoparticules et peut intervenir de différentes façons comme le présente la Figure I.24.

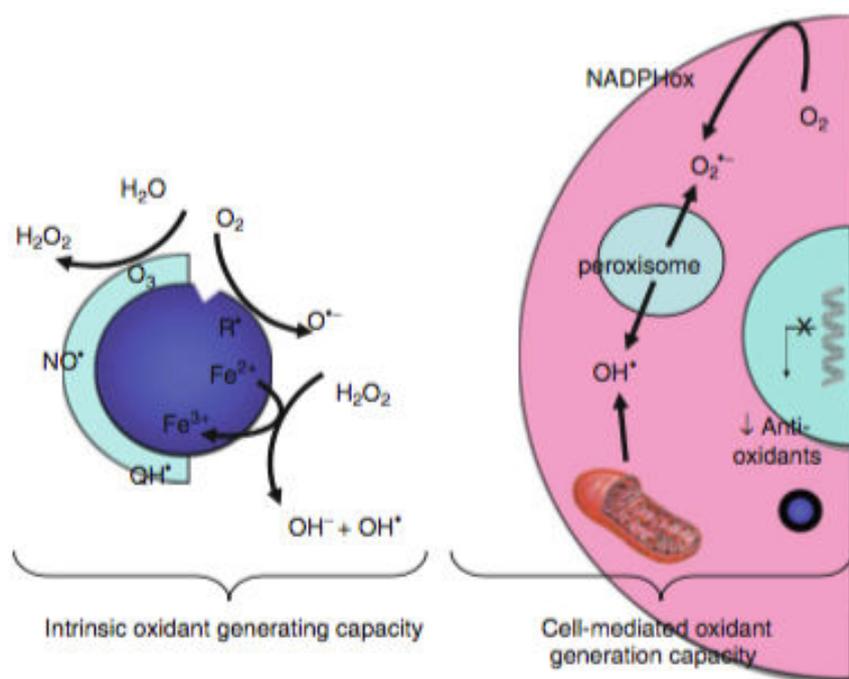


Figure I.24 : Aperçu des mécanismes de production d'espèces réactives de l'oxygène par les nanoparticules. Les nanoparticules ont la capacité d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène selon 3 mécanismes : *via* leur capacité intrinsèque de catalyse de réactions d'oxydo-réduction à leur surface, *via* des interactions cellulaires avec les mécanismes de production d'ERO ou anti-oxydants. (Hussain *et al.* 2014)

Dans notre étude, nous étudions des nanoparticules d'oxyde de fer et d'usure des freins. Il a déjà été montré que ces dernières pouvaient induire un stress oxydant au niveau de cellules humaines dermiques (Murray *et al.* 2013) ou de cellules de cancer du sein (Alarifi *et al.* 2014). Par ailleurs, Zhao *et al.* ont démontré que les nanoparticules d'usure des freins ont un

potentiel oxydant intrinsèque significatif (Zhao *et al.* 2015) et Gasser *et al.* ont démontré la potentialité de ces dernières à induire un stress oxydatif (Gasser *et al.* 2009)

Réponse pro-inflammatoire

L'inflammation correspond à une réponse du système immunitaire à une agression. Au niveau cellulaire, la réponse pro-inflammatoire se caractérise par la sécrétion de substances capables de déclencher à plus large échelle l'inflammation. Il a été montré, par exemple que certains types de nanoparticules d'oxyde de fer peuvent induire une réponse pro-inflammatoire (Couto *et al.* 2015). Par ailleurs, Barosova *et al.* ont montré que les nanoparticules d'usure des freins ont la capacité d'induire la production d'IL-8 qui est une cytokine pro-inflammatoire (Barosova *et al.* 2018)

- iii. Le phénomène de translocation : passage de la barrière respiratoire (*cf* Annexe 2 : « *Mechanisms of uptake and translocation of nanomaterials in the lung* » Puisney *et al.*, Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles, 2018b)

Les effets systémiques induits par les NPs inhalées semblent être induits par l'inflammation pulmonaire mais aussi par le passage de particules à travers la barrière respiratoire. (Braakhuis *et al.* 2014) Le mécanisme responsable de ce passage est appelé **translocation**. Au niveau alvéolaire, il permet aux nanomatériaux de **traverser la barrière air-sang** afin d'atteindre la circulation systémique et les organes secondaires. Au niveau des bronches, où la distance entre la surface et les capillaires est plus importante, les nanoparticules peuvent **s'accumuler au niveau de l'interstitium** où elles peuvent rester un long moment comme il a été montré par l'étude du parenchyme pulmonaire de femmes vivant dans des villes polluées. (Chrug *et al.* 2003) L'évidence complète de la **translocation des nanomatériaux** et de leur **biodistribution** a été prouvée par des études *in vivo* utilisant des nanoparticules radiomarquées. Des modèles *in vitro* de barrières épithéliales ont été développées dans le but d'identifier les mécanismes impliqués dans le processus de translocation et de caractériser la phase d'absorption d'études toxicocinétiques. Il est primordial de comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués dans la translocation. En effet, connaître les paramètres empêchant ou favorisant le passage des nanoparticules pourrait aider à la conception de nanomatériaux plus sûrs. D'autre part, cette capacité de translocation pourrait alors être modulée pour augmenter

le passage de nanoparticules au niveau systémique dans le cas de médicaments en nanomédecine.

Pour déterminer la façon dont les nanomatériaux traversent les barrières épithéliales, les modèles *in vitro* de ces barrières sont le meilleur moyen de comprendre les interactions existantes entre les cellules de la barrière et les nanoparticules. Il existe deux façons possibles de traverser la barrière épithéliale : la voie transcellulaire aussi appelée transcytose et la voie paracellulaire (Figure I.25).

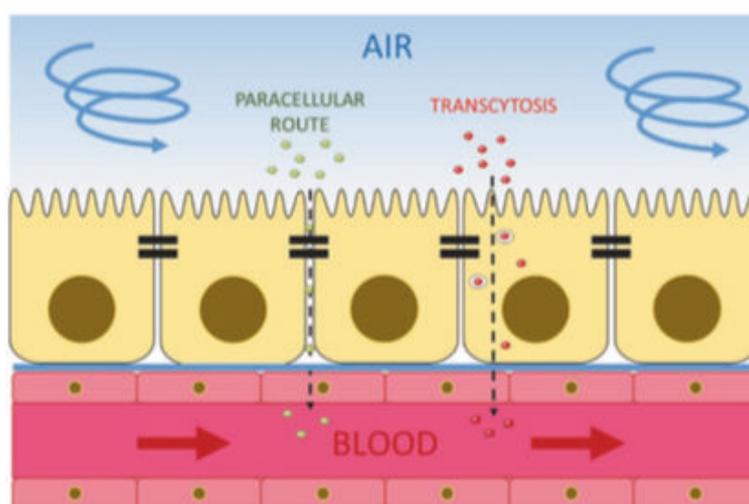


Figure I.25 : Les différentes voies de translocation. Les cellules épithéliales forment une barrière solide grâce à leurs jonctions serrées. La translocation des nanoparticules du compartiment aérien au sang peut survenir soit via la cellule (transcytose) soit par la voie paracellulaire. Dans le cas d'une transcytose, l'internalisation des particules et leur transport du pôle apical au pôle basal avant exocytose est requis. En cas de translocation, c'est l'ouverture des jonctions, probablement par les nanomatériaux, qui est nécessaire. (Puisney *et al.* 2018b)

La **transcytose** consiste au transfert à travers les cellules, du pôle apical de l'épithélium vers le pôle basal. Cela implique que les nanomatériaux soient internalisés par les cellules au niveau apical de l'épithélium auquel l'exposition a lieu et qu'ils soient ensuite **transférés à travers les cellules** avant une exocytose au niveau basal.

La voie **paracellulaire** consiste au transfert des nanomatériaux au niveau de l'**espace intercellulaire** au travers des différentes jonctions préétablies entre chacune des cellules. Parmi ces jonctions on trouve les jonctions serrées qui garantissent l'imperméabilité de l'épithélium et seront présentées dans le Chapitre I.6.a.i.

Etudes *in vitro*

Afin d'étudier *in vitro* la translocation des nanomatériaux, les cellules doivent être cultivées sur membranes poreuses d'inserts permettant la séparation du compartiment apical et du compartiment basal correspondants respectivement au compartiment aérien et au contact avec les capillaires sanguins. Les particules sont appliquées au niveau apical de **l'épithélium** et retrouvées dans le compartiment basal en cas de translocation.

Afin d'améliorer la pertinence des études, il est préférable d'utiliser **des cellules humaines**. D'autant que de nombreuses lignées cellulaires humaines respiratoires ou cellules primaires sont disponible, mais pour les études de translocation ces dernières doivent tout de même remplir certains critères :

- **Etre cultivables en dispositifs d'inserts** (Ex : Transwell®) afin de séparer les compartiments apical et basal et d'obtenir un épithélium polarisé
- Croître en inserts munis de **membranes ayant une porosité suffisante** pour le passage des nanomatériaux
- Former des jonctions serrées afin d'obtenir une barrière épithéliale efficace.

Un aperçu global des études *in vitro* de translocation réalisé au niveau de la barrière respiratoire est présenté dans le Tableau 2.1 de l'Annexe 2.

Etudes *in vivo*

Il a longtemps été suspecté que les **effets extra-pulmonaires** induits par l'exposition aux particules ambiantes était en partie liés à la translocation de leur fraction ultrafine sans que cela puisse être démontré en raison de l'absence de méthode de détection suffisamment sensible. (Kreyling *et al.* 2013)

En premier, grâce à des nanomatériaux radiomarqués, la translocation et biodistribution aux organes secondaires des nanoparticules a été mise en évidence chez l'animal. Mais la **translocation** a maintenant été démontrée pour un large panel de nanomatériaux comme repris dans le Tableau 2.2 de l'Annexe 2. Selon les études, la translocation n'est pas toujours complètement **quantifiée** mais parfois uniquement identifiée. La **taille** semble être un **facteur clé** dans la détermination de la capacité des nanomatériaux à traverser la barrière épithéliale respiratoire tout comme la charge ou le coating (Choi *et al.* 2010). La translocation au niveau de l'appareil respiratoire n'est pas limitée aux voies aériennes profondes et peut aussi apparaître au niveau des voies respiratoires supérieures. Par exemple, Elder *et al.* ont suggéré

une translocation des nanomatériaux directement des voies nasales jusqu'au niveau du cerveau par l'intermédiaire du bulbe olfactif. (Elder *et al.* 2006)

5. Fonctions spécifiques de l'épithélium respiratoire : mécanismes de protection et réparation épithéliale

L'**épithélium respiratoire** est une structure très organisée. De par sa position d'interface avec le milieu extérieur, il doit constituer une **barrière protectrice efficace** et doit être capable de se **réparer** en cas de lésions.

a. Mécanismes de protection de l'épithélium respiratoire

i. Les jonctions intercellulaires

L'intégrité de la barrière respiratoire est conservée grâce à des **complexes de jonctions cellulaires**. Les systèmes de jonction ne sont pas spécifiques des cellules épithéliales mais leur développement est renforcé dans ces cellules. Il existe trois types de jonctions (Figure I.26)

- Les **jonctions serrées ou *zonula occludens*** : elles sont localisées en forme de collier autour du pôle apical de chaque cellule. Il s'agit d'un réseau d'arêtes et de sillons entrecroisés aussi appelés lignes de soudure. Le complexe moléculaire impliqué dans ces jonctions étanches est composé de protéines trans-membranaires (occludines), de protéines intra-cytoplasmiques (protéines *zonula occludens*, cinguline, *etc.*), du cytosquelette d'actine et de calcium.
- Les **jonctions d'ancrage** qui maintiennent la forme des cellules, transmettent les forces qui s'exercent et forment un réseau trans-cellulaire de protéines qui confèrent à l'épithélium sa résistance et sa rigidité. Il en existe plusieurs sous-types :
 - La **ceinture d'adhérence** localisée en ceinture continue sous les jonctions étanches. Il s'agit d'un espace inter-cellulaire élargi sous formes de plaques cytoplasmiques denses associées au cytosquelette. Le complexe moléculaire impliqué dans la ceinture d'adhérence est composé de protéines trans-membranaires (E-cadhérine), de protéines intracytoplasmiques

(caténines). Ce complexe est associé au cytosquelette d'actine et font intervenir le calcium.

- Les **desmosomes** localisés sur les faces latérales des cellules. Il s'agit d'un espace intercellulaire élargi constitué de plaques ou disques denses cytoplasmiques liés au cytosquelette. Le complexe moléculaire impliqué dans les desmosomes est composé de protéines transmembranaires (cadhérines desmosomales : desmogléine, desmocolline), de protéines intra-cytoplasmiques (caténine, desmoplakines, desmocalmine). Ils sont associés au cytosquelette de kératine et font intervenir le calcium.

- Les **points de contact focaux** localisés au pôle basal des cellules. Il s'agit de plaques denses cytoplasmiques sous forme de protéines filamenteuses de la matrice extracellulaire associé au cytosquelette. Ils assurent l'ancrage des cellules au tissu de soutien et la transduction des signaux. Le complexe moléculaire impliqué dans les points focaux d'adhérence est composé de protéines transmembranaires (intégrines), protéines intracytoplasmiques (réseau complexe de taline, vinculine, actinine, tensine, *etc.*), ils sont associés au cytosquelette d'actine et aux protéines filamenteuses de la matrice extracellulaire (fibronectine et laminine) et font intervenir le calcium.

- Les **hémi-desmosomes** localisés au pôle basal des cellules. Il s'agit de plaques denses cytoplasmiques sous forme de protéines filamenteuses de la matrice extracellulaire associées au cytosquelette. Ils assurent l'ancrage des cellules au tissu de soutien. Le complexe moléculaire impliqué dans les points focaux d'adhérence est composé de protéines transmembranaires (intégrines et protéines BPAG2) et protéines intracytoplasmiques (plectine, BPAG1). Ils sont associés au cytosquelette de kératine et aux protéines filamenteuses de la matrice extra-cellulaire (laminine, épiligrine) et font intervenir le calcium.

- Les **jonctions communicantes** localisées sur la face latérale des cellules. Il s'agit de plaques denses cytoplasmiques associées aux membranes plasmiques adjacentes presque accolées et contiennent des canaux nanométriques. Ces canaux assurent le passage d'ions et de petites molécules. Le complexe moléculaire associé aux jonctions communicantes forme une structure tubulaire. Les canaux sont formés de connexons eux-mêmes formés de 6 protéines (connexines). Le calcium à forte concentration entraîne la fermeture de ce canal.

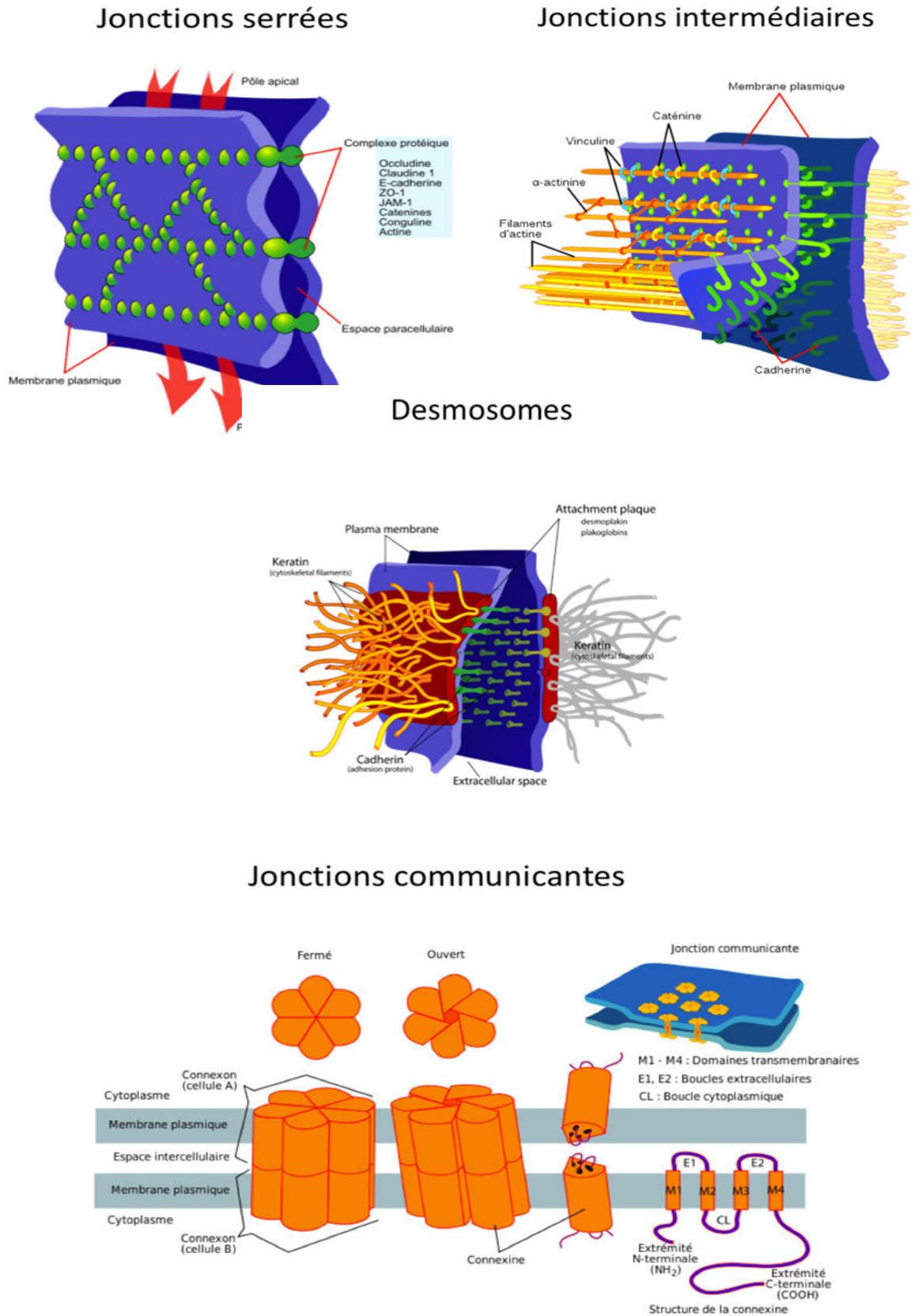


Figure I.26 : Les complexes jonctionnels. Il existe différents types de jonctions qui maintiennent l'intégrité de l'épithélium respiratoire comme présenté ci-avant. (Adapté de <http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/adherence-cellulaire.html>)

Les facteurs altérant les jonctions

De part leurs propriétés, les jonctions serrées doivent assurer deux rôles :

- Maintenir la **polarité cellulaire**
- Assurer la **fonction de barrière**

Cependant, le maintien de ces deux rôles distincts peut être affecté par différents facteurs. En effet, une **pathologie** ou encore des **modifications de l’environnement chimique** peuvent induire des changements des jonctions serrées.

La régulation des jonctions serrées n’est pas complètement élucidée mais il est possible de lister un certains nombres de cytokines et facteurs de croissance intervenant dans la régulation de ces dernières. Cette liste est présentée dans le Tableau I.1.

Tableau I.1 : Facteurs altérant les jonctions serrées (Adapté de Sawada *et al.* 2013)

Altération de la fonction de barrière	Renforcement de la barrière
IFN γ	EGF
TNF α	TGF-B
HGF	GDNF
TGF α	Neurturine
IGF-I et IGF II	IL-10
VEGF	IL-17
IL-1	
IL-4	
IL-13	

Par ailleurs les jonctions serrées peuvent être perturbées par des mécanismes plus complexes tels que le cancer ou des infections bactériennes ou virales. L’oncogène *Ras a*, par exemple, le potentiel d’altérer la mise en place des jonctions serrées en perturbant la phosphorylation de l’occludine et de ZO-1 (Sato *et al.* 1996). Par ailleurs, MUPP1 et MAGI qui sont deux protéines cibles du papillomavirus humain et de l’adénovirus peuvent induire une dédifférenciation des cellules induisant une perte de la polarité et donc des complexes jonctionnels (Fazano *et al.* 1997). Globalement, 3 types de mécanismes sont impliqués dans la perturbation des jonctions serrées consécutives à des agents pathogènes. Ces mécanismes sont présentés dans le Tableau I.2

Tableau I.2 : Mécanismes de dysfonction de la fonction de barrière par des agents pathogènes (Adapté de Sawada *et al.* 2013)

Changement fonctionnels des protéines jonctionnelles	<i>Clostridium perfringes</i> <i>Virbrio cholerae</i> Reovirus Coxsackievirus et Adenovirus <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Changement dans l'organisation de l'actine par une modulation Rho-dépendante et activité kinase des chaînes légères de la myosine	<i>Clostridium diptheriae</i> <i>Clostridium difficile</i>
Mécanismes indirects	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Helicobacter pylori</i> Rotavirus

Par ailleurs, la **dysfonction des jonctions serrés** est associée à un grand nombre de pathologies comme le résume le Tableau I.3.

Tableau I.3 : Pathologies associées à une dysfonction des jonctions serrées (Adapté de Sawada *et al.* 2013)

Altération du maintien de la polarité cellulaire	Cancer Infection par le Papillomavirus oncogène
Dysfonction de la fonction de barrière	<u>Système vasculaire</u> : Œdème, endotoxémie, cytokinémie, Rétinopathie diabétique, sclérose multiple, métastase à diffusion hématogène <u>Tractus gastro-intestinal</u> : Gastrite bactérienne, colite pseudomembraneuse, maladie de Crohn, colite ulcéraire, maladie cœliaque, colite collagèneuse <u>Foie</u> : Jaunisse, cirrhose biliaire primaire, cholangite sclérosante primaire <u>Tractus respiratoire</u> : Asthme, syndrome de détresse respiratoire <u>Infections virales</u> : Reovirus, Adenovirus, Coxsackievirus, Rotavirus, HIV <u>Maladies héréditaires</u> : Hypomagnésémie surdité, mucoviscidose <u>Divers</u> : Syndrome d'hyperstimulation ovarienne

ii. L'épuration muco-ciliaire

L'action coordonnée des cellules ciliées et des cellules productrices de mucus

Au niveau des voies respiratoires supérieures et jusqu'au fond des bronches on peut trouver des cils qui assurent par un mouvement régulier **l'évacuation des contaminants respiratoires** (virus, bactéries, particules) par **action mécanique** (Figure I.27). Les **cils** sont de structure complexe et possèdent un axomère constitué d'une paire de microtubules qui permet leur mobilité. Cette **mobilité**, coordonnée entre toutes les cellules, est assurée grâce à une interaction principale entre la dynéine et la tubuline même si d'autres protéines telles que la tektine et la nexine peuvent intervenir (Marshall et Nonaka 2006). Ces cils baignent dans une couche dite périciliaire. Les mucines de surfaces sont attachées aux cils et rigoureusement agencées dans l'espace périciliaire. La lubrification nécessaire au mouvement ciliaire et la séparation des cils sont rendus possibles grâce à des **mucines** particulières associées aux cils (mucines dites de surface) et aux charges qu'elles portent qui permettent de retenir l'eau (Ehré *et al.* 2013).

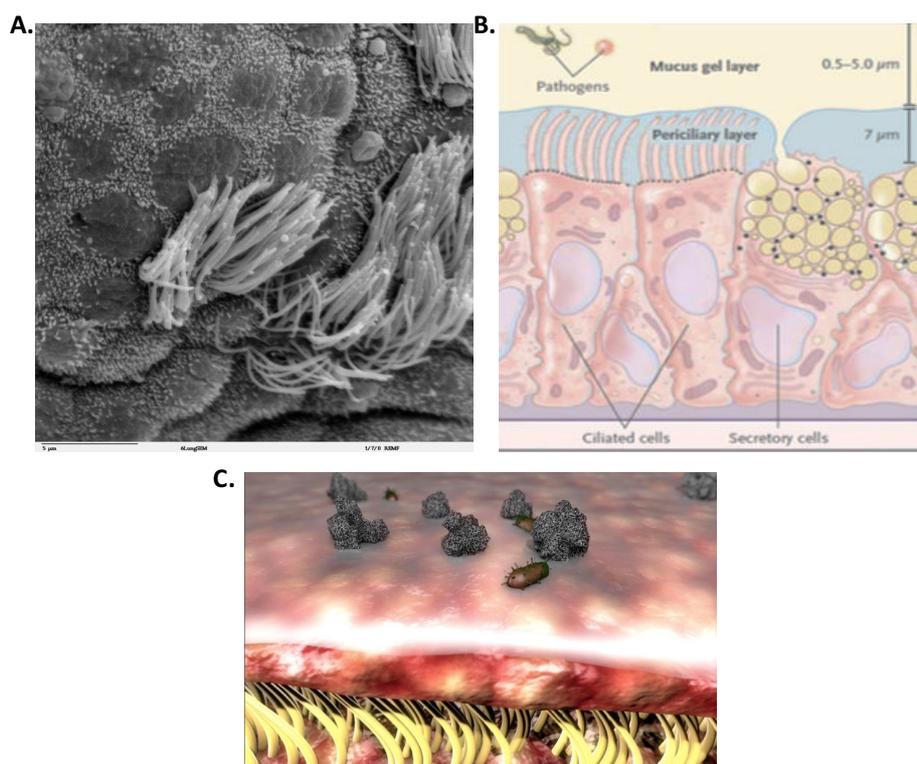


Figure I.27 : Représentation de la coordination entre les cellules ciliées et le mucus

A. Cils présents à la surface d'un épithélium bronchique (Microscopie électronique à balayage) (Source : <http://remf.dartmouth.edu/images/mammalianLungSEM/source/6.html>)

B. : Disposition de la couche de mucus sur la barrière épithéliale respiratoire (Source : Fahy *et al.* 2010)

C. Illustration de la clairance muco-ciliaire (Source : Canopé Corpus « La mucoviscidose » ; <https://www.reseau-canope.fr/corpus/video/la-mucoviscidose-95.html>)

Ces structures agissent en coopération avec le mucus qui recouvre l'épithélium trachéo-bronchique pour assurer la **clairance muco-ciliaire**. En effet, le **mucus** est une substance visqueuse qui aide à piéger les particules, bactéries et autres débris inhalés pour leur évacuation. Le **battement coordonné des cils** entraîne le mucus jusqu'à la glotte où ce dernier sera alors avalé en confusion avec la salive ou éventuellement expectoré (Figure I.27).

Les propriétés du mucus

Le mucus est sécrété à partir de deux zones du système respiratoire. A la surface de l'épithélium, certaines cellules bronchiques (goblet cells) produisent du mucigène qui sert à la formation du mucus mais la quantité la plus importante de mucus est sécrétée par les glandes séromuqueuses interconnectées avec l'épithélium respiratoire qui produisent jusqu'à deux litres de mucus par jour (Fahy *et al.* 2010).

Le mucus est composé d'eau, de glucides, protéines et lipides. Sa teneur importante en eau (97%) aide à l'humidification de l'air inspiré. Les protéines (3%) contenues dans le mucus sont principalement des glycoprotéines (appelées **mucines**) mais on y trouve aussi des protéines plasmiques et d'autres produits issus de la mort cellulaire comme l'ADN. (Richardson *et al.* 2003). Le mucus contient des antibiotiques naturels et du lysozyme (enzyme antibactérienne) capables d'inactiver les bactéries entravées.

Synthèse des mucines

Les mucines sont de larges **glycoprotéines** avec des régions riches en résidus sérine et thréonine. Grâce à leurs groupements hydroxyles, ces dernières sont liées à des groupements sucres (O-glycosylation) (Fahy *et al.* 2010). Ces protéines sont très anioniques en conséquence de la teneur en groupements carboxyl/sulfate des sucres terminaux (Kirkham *et al.* 2008). Ceci provoque des répulsions de charge contribuant à un volume hydrodynamique important en solution qui est nécessaire pour la formation d'un gel. Il existe 17 gènes dans le génome humain qui encodent 7 mucines sécrétées, les autres étant membranaires (Rose *et al.* 2006). Parmi ces mucines sécrétées 5 mucines peuvent former des ponts disulfures, importants pour la formation en **gel du mucus**, grâce à leurs domaines terminaux riches en cystéine (Fahy *et al.* 2010).

Les transcrits de mucines, qui pour la plupart sont très longs, sont transportés au niveau des ribosomes associés au réticulum endoplasmique et insérés via un canal au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique. La **synthèse des mucines** suit donc le schéma général

de synthèse de toutes les protéines sécrétées (Theodoropoulos et Carraway 2007). Des résidus N-glycosides sont ajoutés en parallèle de la traduction, et la séquence signal qui spécifie la liaison avec le réticulum endoplasmique est éliminée par protéolyse. Les glycoprotéines subissent ensuite une étape d'« édition » pour éliminer les protéines mal repliées qui implique une déglycosylation/glycosylation et une dégradation protéosomique (Helenius et Aebi 2004). La O-glycosylation et un traitement ultérieur des N-glycosides se produisent pendant le transit des mucines à la surface cellulaire. Dans le cas des mucines formant un gel, la formation de ponts disulfures entre les sous-unités et l'empaquetage en granules se produisent également pendant ce transit (Perez-Vilar et Hill 1999).

Une fois synthétisées, les mucines sont stockées dans des **vésicules de stockage** intracellulaires aussi appelées **granules sécrétoires** jusqu'à leur libération par exocytose induite. Contrairement à l'exocytose constitutive, l'exocytose induite implique l'activation de la **machine sécrétoire** par l'intermédiaire d'un stimulus extracellulaire. Différents types de stimulus sont connus pour l'activation de la machinerie sécrétoire du mucus parmi lesquels on trouve des médiateurs inflammatoires, neurotransmetteurs, nucléotides et nucléosides (Evans *et al.* 2002). L'**exocytose** induite provoque l'activation des voies du signal qui conduisent au transport du granule sécrétoire à la surface apicale, suivie de la dissociation de la barrière corticale d'actine avant l'association à la membrane plasmique avec attachement et amarrage de protéines associées au feuillet interne. Ce processus ayant pour étape finale la fusion dépendante du calcium du granule sécrétoire avec la membrane plasmique comme le présente la Figure I.28 (Evans *et al.* 2009).

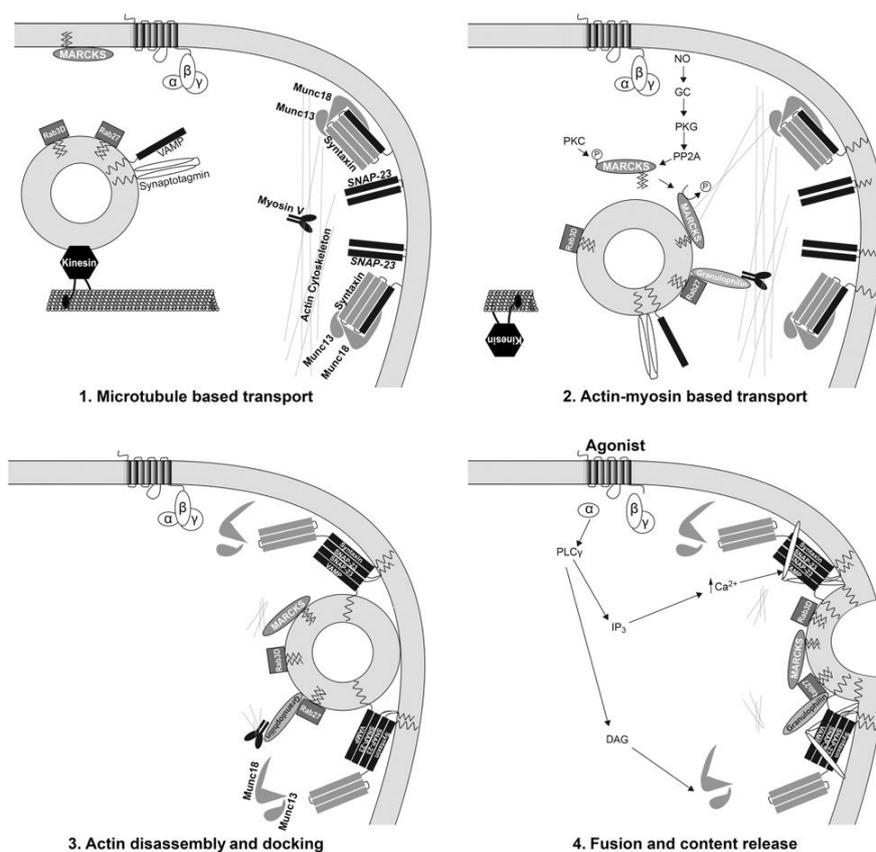


Figure I.28 : Processus de sécrétion des granules de mucus Les granules de mucus nouvellement synthétisés sont transportés à la région apicale par un transport basé sur les microtubules (1). Arrivés à la périphérie cellulaire, les granules de mucus sont confiés à un processus de transport basé sur l'interaction actine-myosine. (2) Une fois localisé au niveau de la membrane plasmique, les granules se fixent sur la membrane (3) et prennent progressivement une conformation ouverte entraînant l'exocytose. (4). Ce processus complexe médiée par le niveau de Ca^{2+} fait intervenir plus d'une vingtaine de médiateurs. (Source : Evans *et al.* 2009)

Au niveau alvéolaire, le mucus disparaît au profit du surfactant. Le rôle principal du surfactant est la réduction de la tension superficielle créée par l'expansion des alvéoles lors de l'inspiration. On trouve aussi, au niveau des alvéoles, les macrophages alvéolaires qui assurent la clairance des particules inhalées et débris cellulaires mais aussi la destruction des agents pathogènes et intervient dans l'immunité spécifique.

Les poumons sont résistants aux attaques environnementales malgré une exposition continue à des agressions variées. Cette résistance est très dépendante de l'efficacité du système de **production et sécrétion du mucus** (Thornton *et al.* 2004 ; Knowles *et al.* 2002 ; Thornton *et al.* 2008 ; Rose *et al.* 2006 ; Cone 2009 ; Hattrup *et al.* 2008 ; Linden *et al.* 2008 ; Fahy *et al.* 2010). En effet, comme détaillé précédemment, le mucus est un gel avec les propriétés à la fois d'un fluide élastique-solide et visqueux. Ce gel est constitué à 97% d'eau et à 3% de

solides parmi lesquels on retrouve les mucines, protéines essentielles à la formation du mucus.

La mucine MUC5AC

Structure : Les mucines MUC5AC et MUC5B sont les mucines principalement représentées et fortement exprimées au niveau des voies respiratoires. (Thorton *et al.* 2008 ; Rose *et al.* 2006). Alors que MUC5AC est uniquement produite par les « Goblet cells », MUC5B est surtout produite par les glandes sous-muqueuses. MUC5AC se présente sous la forme d'un **polymère homotypique** qui a la capacité à former un gel par enchevêtrement en mailles et réticulation non covalente dépendante du calcium entre polymères adjacents. (Thornton *et al.* 2004)

Contrôle de l'expression :

La **production de MUC5AC** est sous la responsabilité de trois voies : deux voies activatrices et une voie répressive (Figure I .29). La **voie répressive** fait intervenir les cadhérines et la voie *Frizzled/LRP* via *Wnt*. Ces récepteurs membranaires agissent via une action sur la β -caténine pour aboutir éventuellement via LEF1 à la répression de MUC5AC par l'intermédiaire de *Foxa2*. Les **deux voies activatrices** sont indépendantes. La voie *STAT6* est actionné par l'intermédiaire de la fixation à un récepteur membranaire spécifique (*IL-13R1/IL-4R α*) de l'IL-13 déclenchant une cascade faisant intervenir *Jak* et *STAT6* pour une action sur *Foxa2* répressive et *HIF-1* qui module une activation de la transcription de MUC5AC. La **voie EGFR dépendante** est plus complexe. En effet, deux sous voies peuvent être activées par ce récepteur. La fixation d'un agoniste du récepteur tel que *TGF α* , *EGF* ou l'héréguline peuvent aboutir à l'activation de *JAK* ou *Shc/Grb/Sos* qui respectivement agiront sur *STAT 1,3* et *Ras/MAPK* pour aboutir à une action sur *HIF-1* régulateur positif de la transcription de MUC5AC (Evans *et al.* 2009).

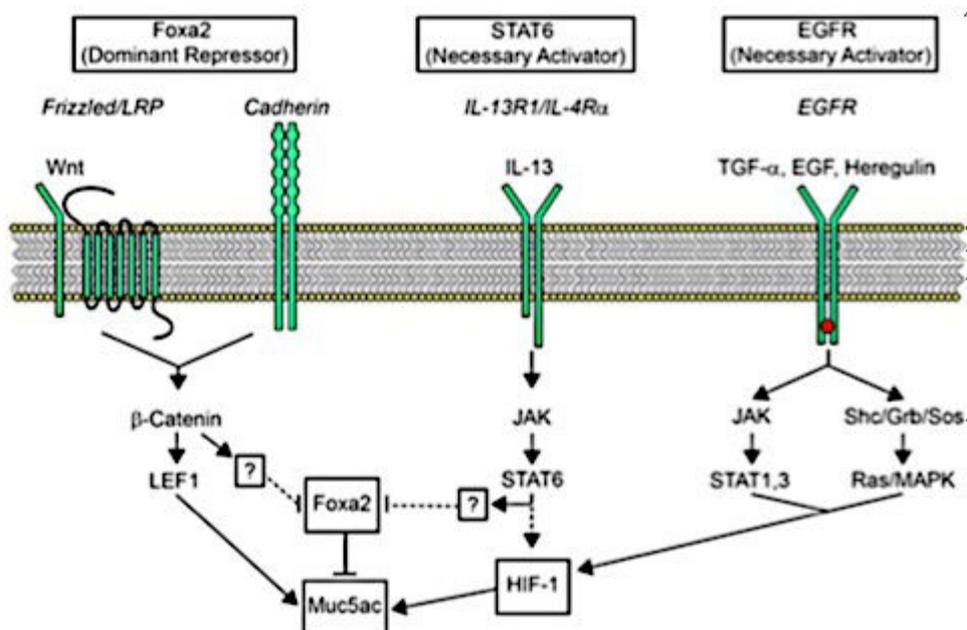


Figure I.29: Voies de régulation transcriptionnelle de MUC5AC La régulation transcriptionnelle de MUC5AC est assurée par deux voies activatrices et une voie répressive. Les deux voies activatrices dépendent de STAT6 et EGFR tandis que la voie répressive dépendant de Foxa2. Dans tous les cas, une cascade de signalisation complexe est déclenchée aboutissant à une régulation positive ou négative de la transcription du gène *MUC5AC*. (Source : Evans *et al.* 2009)

Mucus et voie du récepteur à l'EGF

La **voie EGFR** précédemment présentée comme activatrice de la production de mucus peut être régulée par deux mécanismes. En effet, la voie EGFR peut être activée par liaison d'un ligand ou par mécanisme non-ligand dépendant (Figure I.30). En effet, il existe **une voie d'activation ne nécessitant pas la fixation d'un ligand** à l'EGFR puisque ce dernier peut être activé à la suite d'une modification successive à la présence de radicaux libres en cas de stress oxydant. Pour la **voie ligand dépendant**, certains composés endogènes peuvent entraîner l'activation du complexe membranaire *TACE/ADAM17*. La protéine *TACE* après activation clive l'attache membranaire du *TGF α* qui devient soluble et a alors la capacité de se fixer au récepteur EGFR pour l'activer (Burgel *et al.* 2004).

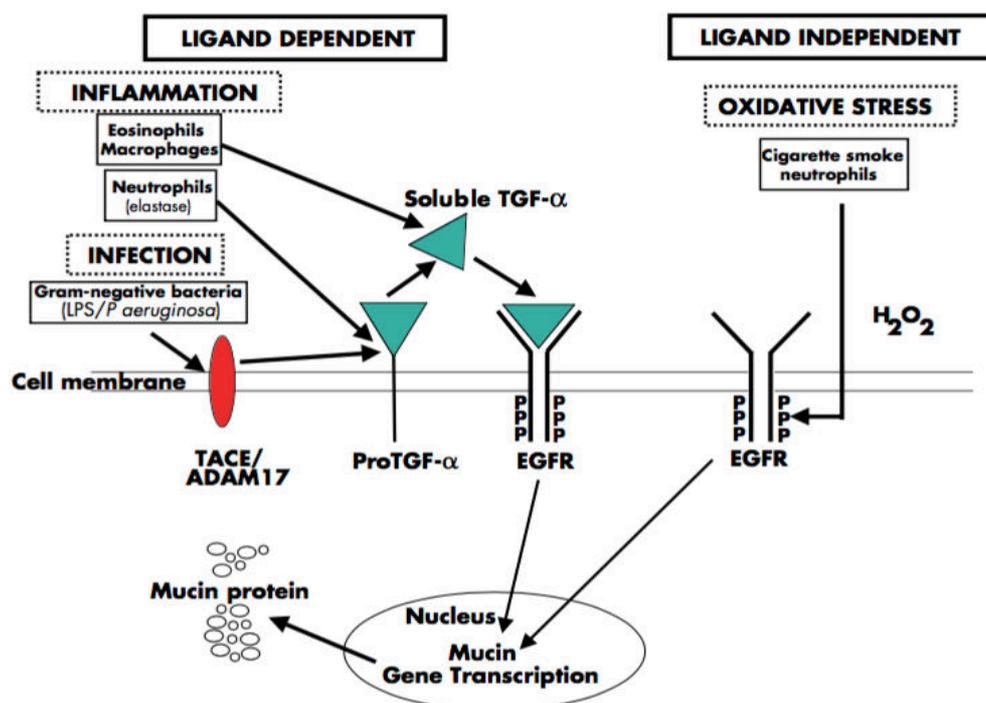


Figure I.30 : Voies d'activation de la voie EGFR potentielle activatrice de la production de *MUC5AC* La voie EGFR peut être régulée de deux manières. Premièrement, l'intervention d'un ligand peut activer la régulation de la transcription de *MUC5AC*. Deuxièmement, le stress oxydatif peut agir sur la phosphorylation du récepteur à l'EGF aboutissant aussi à l'activation de la transcription de *MUC5AC*. (Source : Burgel et al. 2004)

Hypersécrétion muqueuse

Les **pathologies respiratoires** affectant le mucus se traduisent globalement par une hypersécrétion de ce dernier. La plupart d'entre nous connaissent l'hypersécrétion de mucus et les **nuisances** qui y sont associées à cause de son occurrence régulière lors d'allergies saisonnières ou d'infections respiratoires. Cependant, pour certaines pathologies, l'hypersécrétion de mucus n'est pas occasionnelle mais **constitutive**. En effet, l'inflammation pulmonaire associée à l'hypersécrétion muqueuse engendrant une **altération de la clairance muco-ciliaire** sont des phénomènes retrouvés dans l'intégralité des **maladies pulmonaires obstructives**. Une **hyperplasie muqueuse** peut être observée dans certains types de **cancer du poumon**, mais aucun lien avec la cancérogénèse n'a pour le moment été établi. Ce phénomène d'hypersécrétion est rencontré selon deux formes distinctes chez les patients atteints d'**asthme**, de Bronchite Pseudo-Obstructive Chronique (**BPCO**) ou de **mucoviscidose**. Ainsi, l'hypersécrétion muqueuse peut provenir d'une altération de la quantité et du type de mucine produite engendrant une **augmentation de la charge** des cellules productrices de mucus en granules sécrétoire. D'autre part, l'hypersécrétion

muqueuse peut être consécutive à une **exocytose supérieure** à la normale des granules de mucus augmentant la viscosité et l'épaisseur de la couche muqueuse. Les **thérapies** actuelles font intervenir des anti-inflammatoires tels que les corticostéroïdes pour réduire l'hyperplasie muqueuse, des aérosols de solution saline pour réduire la viscosité des expectorations et des beta-antagonistes pour stimuler l'activité ciliaire. Cependant, leur efficacité reste moindre entraînant à terme une rétention des particules et agents pathogènes ainsi que la réduction du débit d'air conduisant à l'**insuffisance respiratoire** (Evans *et al.* 2009).

En situation physiologique, l'hypersécrétion muqueuse peut être associée à la présence de xénobiotiques ou de certains médiateurs dans l'environnement du tractus respiratoire comme le traduit le Tableau I.4.

Tableau I.4 : Médiateurs impliqués dans l'hypersécrétion muqueuse (Adapté de Rogers 2007)

Médiateurs	Sécrétion	Transcription MUC
Cytokines :		
IL-1B	+	Non évalué
IL-6	+	+
IL-9	Non évalué	+
IL-13 (IL-4)	+	+
TNF α	++	++
Gaz :		
Gaz irritants (fummée de cigarette par exemple)	++	++
Oxyde nitrique	-/+	Non évalué
ROS	-/+	Non évalué
Médiateurs inflammatoires :		
Bradykinine	+	Non évalué
Cystéinyl-leucotriènes	++	Non évalué
Endothéline	-/+	Non évalué
Histamine	+	Non évalué
PAF	+	+
Prostaglandines	-/+	Non évalué
Protéinases	+++	Non évalué
Nucleotides	++	Non évalué
Médiateurs nerveux :		
Agonistes cholinergiques	++	Non évalué
Nicotine	++	Non évalué
Agonistes Tachykinergiques	+	Non évalué
Substance P	++	Non évalué
Neurokinine A	+	Non évalué
Divers :		
EGF + TNF α	Non évalué	+
Sensibilisation	+	+

b. Mécanismes de réparation de l'épithélium respiratoire

Bien que doté d'un **système de protection** relativement important, le contact constant de l'épithélium respiratoire avec l'environnement est à l'origine de **nombreuses blessures** subies par ce dernier. En effet, les blessures peuvent être induites par différents stimuli : infections virales, phénomènes inflammatoires, réactions allergiques, exposition à des xénobiotiques, traumatisme physique (ventilation mécanique), cancer ou autre pathologie d'origine inconnue (Grainge *et al.* 2013). De nombreux facteurs cellulaires et moléculaires sont impliqués dans la **régénération de l'épithélium respiratoire** tant au niveau cellulaire que moléculaire (Figure I.31).

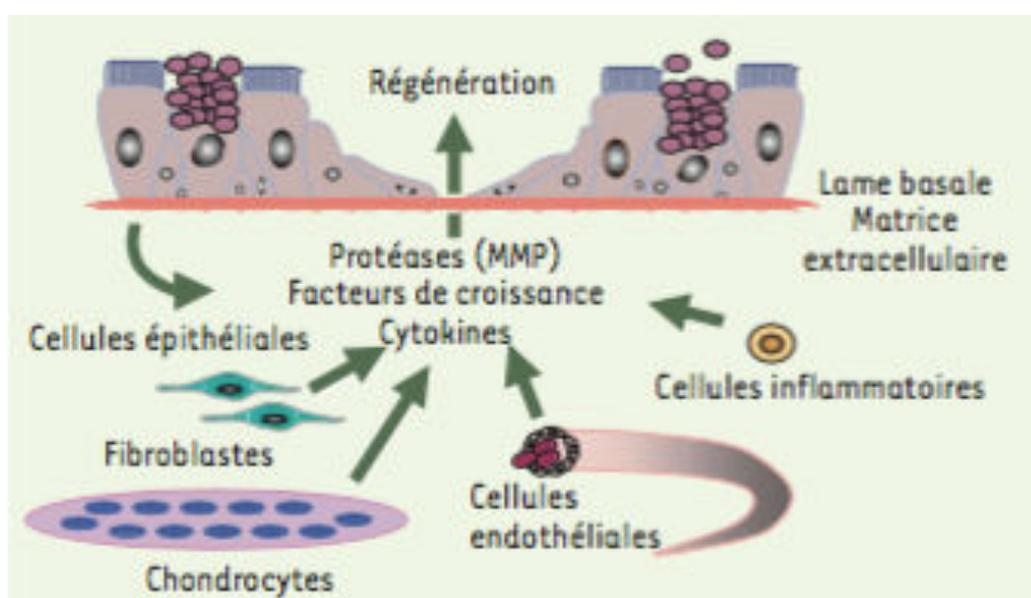


Figure I.31 : Facteurs cellulaires et moléculaires de la réparation de l'épithélium respiratoire. La réparation de l'épithélium respiratoire réside dans un processus complexe faisant intervenir un grand nombre de médiateurs tant cellulaires que moléculaires. (Source : Coraux *et al.* 2005)

Que la blessure intervienne au niveau des voies respiratoires proximales ou distales, le mécanisme de **réparation** reste le même (Crosby *et al.* 2009) :

- Juste après la blessure, l'**initiation** de la réparation se traduit par un relargage de cytokines, un recrutement des cellules immunitaires et une activation de la cascade de coagulation
- Les **progéniteurs cellulaires** migrent et s'étalent pour couvrir les surfaces dénudées
- La **prolifération** cellulaire se met en place tout comme la différenciation progressive afin de rétablir l'**intégrité fonctionnelle et structurelle** de l'épithélium

La **réponse précoce** est **similaire** quelque soit la zone respiratoire de blessure. Cependant, des mécanismes plus ou moins complexes interviennent en suite dans la **restructuration** de l'épithélium selon la **morphologie** de la zone respiratoire étudiée.

Le plus souvent, après blessure, la phase de **réparation** de la lésion est étudiée au détriment de la phase de **régénération** qui implique la différenciation et polarisation de l'épithélium. De nombreux facteurs interagissent étroitement dans le but de combler la lésion induite par l'environnement comme présenté dans le Tableau I.5.

Tableau I.5 : Facteurs intervenants dans la régénération de l'épithélium respiratoire (Adapté de Coraux *et al.* 2005)

Rôle des composants de la matrice extracellulaire	Rôle des métalloprotéinases matricielles	Rôle des facteurs de croissance
<ul style="list-style-type: none"> - Adhérence juste après la blessure à une matrice transitoire - Support matriciel : laminine, collagène IV, fibronectine - Migration cellulaire favorisée par la polymérisation de la fibronectine - Hyperexpression des laminines 1 et 2 ; intégrines $\alpha 5, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 6$ et $\beta 1$: favorise la migration sur le collagène IV - Réorganisation du cytosquelette d'actine par la voie Ras-MAP via complexe FAK complexé avec Src, Grb2 et c-Crk - Modulation de l'adhérence cellulaire médiée par les intégrines : intervention de la cellébruvine 	<ul style="list-style-type: none"> - MMP-9 (gélatinase B) surexprimée dans les cellules en migration : knock-out inhibe la migration - MMP-3 et 11 (stromélysines 1 et 3) et vimentine exprimées par les cellules avec un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse - MMP-7 (matrilysine) et 9 pourraient intervenir dans la sécrétion des facteurs de croissance VEGF, TGFβ et bFGF (clivage de récepteurs au niveau des protéoglycans) 	<ul style="list-style-type: none"> - EGF active la voie EGFR accélère la réparation - EGF et PGDF agissent en symbiose pour stimuler la prolifération et la différenciation des cellules respiratoires - HGF, KGF et IL-1α et β régulent la migration et peuvent avoir une action mitogénique - MCP-1 par liaison à CCR2B : favorise la réparation - TFF2 via ERK et protéine kinase C peut agir en synergie avec EGF - Héréguline-α via le récepteur erbB2-4 favorise la réépithélialisation - Insuline et HGF : favorisent la synthèse de la MEC - IL-8 : stimule les MMP - IL-13 : favorise la sécrétion de facteurs mitogènes

Les mécanismes de réparation de l'épithélium respiratoire sont un **enjeu important** puisque la voie respiratoire peut être la voie d'entrée de divers types de toxiques qui pénétreront plus facilement au niveau systémique en cas de lésion. Cependant, les différences régionales couplées avec l'existence de blessures chroniques peuvent conduire au **développement de**

pathologies pulmonaires. Par exemple, la **BPCO** est la conséquence de l'exposition chronique à la fumée de cigarette qui engendre, chez les fumeurs, un cycle continu de blessure et réparation conduisant à des changements structurels, fonctionnels et géniques tant au niveau des voies respiratoires proximales que distales (Hennson *et al.* 2006).

Objectif de l'étude

L'objectif de cette thèse a été **d'étudier le devenir et l'impact de nanoparticules manufacturées ou issues de processus d'usure sur la barrière épithéliale respiratoire.**

Ce travail a été financé par le DIM « Nano-K » de la région Ile de France. Les nanoparticules d'usure des freins (NPs-usure) ont été choisies comme nanoparticules issues de processus d'usure compte-tenu des connaissances limitées sur ces particules alors que leur contribution à la pollution atmosphérique particulaire tend à croître. En parallèle, il nous a paru pertinent d'étudier les nanoparticules d'oxyde de fer (NPs- γ -Fe₂O₃) car le fer est l'élément métallique principal des NPs-usure. L'étude de toxicologie réalisée sur ces deux nanoparticules s'est inscrite dans une démarche de toxicologie respiratoire. Ce choix est en accord avec la voie d'entrée préférentielle dans l'organisme des particules issues de la pollution atmosphérique : la voie respiratoire.

Nous avons privilégié l'approche *in vitro* en utilisant un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines, la lignée Calu-3, qui présente l'intérêt de permettre la reconstitution d'une barrière épithéliale jointive et productrice de mucus lorsqu'elle est cultivée en 3D. Après une caractérisation des paramètres toxicologiques classiques, ce modèle a permis d'étudier les effets de l'exposition particulaire sur des fonctions spécifiques de l'épithélium respiratoire et sur la capacité des nanoparticules à franchir la barrière épithéliale.

L'étude s'articule en quatre points :

1. La caractérisation et le fractionnement de la poudre d'usure des freins
2. L'étude des caractéristiques toxicologiques des nanoparticules d'oxyde de fer, de la poudre d'usure des freins et de sa fraction nanoparticulaire sur un modèle *in vitro* d'épithélium respiratoire en culture 2D et 3D.
3. L'étude du devenir des nanoparticules d'oxydes de fer et d'usure des freins au niveau de la barrière épithéliale respiratoire
4. L'étude de l'impact des nanoparticules d'usure des freins sur les fonctions de protection et de réparation de l'épithélium respiratoire

L'ensemble de cette étude, nous permet de répondre aux quatre questions suivantes :

- **Quels sont les caractéristiques physicochimiques de la poudre d'usure des freins et de sa fraction nanoparticulaire ?**

Pour répondre à cette question, nous avons entrepris une caractérisation de la poudre d'usure des freins en combinant plusieurs méthodes. Afin de connaître la composition de cette poudre, nous avons fait appel à la thermogravimétrie, à la fluorescence X et à la diffraction par rayons X. Pour caractériser leur taille et leur morphologie, nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et les microscopies optique et électronique à balayage (MEB). Nous avons mis au point un protocole spécifique permettant d'isoler la fraction nanoparticulaire de cette poudre. Cette dernière a été caractérisée par DLS et par microscopie électronique à balayage couplée à la diffraction X.

- **Quelles sont les caractéristiques toxicologiques des NPs- γ -Fe₂O₃, de la poudre d'usure des freins et de sa fraction nanoparticulaire (NPs-usure) sur les cellules bronchiques et sur la barrière épithéliale respiratoire ?**

Nous avons choisi d'étudier les caractéristiques toxicologiques des (nano)particules sur des cellules épithéliales bronchiques de la lignée Calu-3 maintenues en culture 2D (culture en plaques) ou en culture 3D (culture en *Transwell*®). Le modèle de culture 2D a été utilisé pour comparer le profil toxicologique de la poudre d'usure, de sa fraction nanoparticulaire et des NPs- γ -Fe₂O₃. Ce profil a été établi après 24h d'exposition à une gamme de doses de (nano)particules en mesurant i) la viabilité cellulaire, l'induction ii) d'un stress oxydant et iii) d'une réponse pro-inflammatoire par la mesure du relargage de cytokines pro-inflammatoires. Sur le modèle 3D, qui permet de reconstruire une barrière épithéliale jointive, nous avons étudié l'impact des NPs sur i) l'intégrité de la barrière par atteinte des jonctions serrées et action sur le cytosquelette et ii) sur la réponse pro-inflammatoire.

- **Les NPs- γ -Fe₂O₃ et les NPs-usure peuvent-elles traverser la barrière respiratoire ?**

Afin de savoir si les NPs peuvent traverser la barrière épithéliale, nous avons utilisé les cellules épithéliales bronchiques en culture 3D en dispositif *Transwell*®. Ce dispositif, composé de deux chambres appelées basale et apicale, respectivement en dessous et au-dessus des cellules, permet d'étudier la problématique du passage. En effet, les nanoparticules sont disposées au niveau apical et peuvent être collectées au niveau basal en cas de passage. C'est pourquoi nous avons collecté les milieux apicaux et basaux des épithéliums exposés aux NPs- γ -Fe₂O₃ et NPs-usure afin d'y détecter et quantifier les nanoparticules par sp-ICP-MS. Cette nouvelle méthode permet de distinguer un élément sous sa forme soluble et sous sa forme particulaire ce qui en fait une méthode parfaitement adaptée à notre problématique.

- **Quel est l'impact de l'exposition aux nanoparticules sur les fonctions essentielles de protection et réparation de l'épithélium respiratoire ?**

Les fonctions de protection et réparation épithéliales sont essentielles au maintien de l'intégrité de la barrière respiratoire.

La présence de mucus protège l'épithélium bronchique face aux nombreuses agressions (virus, bactéries, particules, *etc.*) dont il peut faire l'objet. Nous avons donc étudié la fonction de protection de l'épithélium respiratoire en s'intéressant à la production de mucus via le suivi de l'expression des transcrits et de la protéine d'une des principales mucines bronchiques, MUC5AC. Par ailleurs, les agressions de l'épithélium respiratoire peuvent conduire à des lésions qui nécessitent la mise en œuvre d'un processus de réparation afin de maintenir la fonction de barrière. L'exposition aux nanoparticules pourrait modifier le processus de réparation épithéliale. C'est pourquoi, après une pré-exposition aux NPs, nous avons procédé à une blessure du tapis épithélial et nous avons réalisé un suivi vidéomicroscopique pour quantifier la vitesse avec laquelle se fait la réparation épithéliale. Afin de déterminer la part du processus de migration et de prolifération dans cette réparation, nous avons étudié l'incorporation de BrdU, analogue de la thymidine, qui permet de quantifier les cellules en phase S du cycle cellulaire.

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

1. Objets d'étude

a. Les particules issues du processus d'usure des freins

Les particules d'usure des freins ont été obtenues dans 2 centres d'essais distincts et elles ont été collectées dans 2 contextes différents :

- À partir de véhicules entiers dans un centre d'essais. Ce centre d'essai teste des composants automobiles tels que le système ABS (« *anti blocking system* »), l'aide au stationnement, les essuie-glaces, *etc.* sur des véhicules circulant sur différents types de revêtements routiers (route pavée, en pente, ligne droite, virage) et dans différentes conditions climatiques (chaud/froid, humide/sec). Ces conditions multiples de conduite entraînant des scénarios de freinage variés nous ont permis de collecter un mélange représentatif de particules d'usure des freins émises par la flotte de véhicule circulant actuellement en Europe et dans des conditions de circulation se rapprochant de la réalité.
- À partir d'un banc d'essai des freins utilisant un dynamomètre hydraulique. Le banc d'essai des freins consiste en un dispositif permettant de simuler des scénarii de freinage précis afin de tester l'usure d'une garniture comme présenté précédemment (Chapitre I.1.c.i). Ce mode de collecte a été entrepris sur plusieurs types de garnitures selon plusieurs scénarii de freinage cependant, les particules récupérées sont fraîches et ne sont pas soumis à des processus de vieillissement comme sur véhicule entier donc moins représentatives de la réalité

Les centres de collecte de cette étude ont préféré rester anonyme. Par ailleurs, aucune information sur la composition des garnitures de freins n'utilisé n'a pu être communiquée.

Dans chacun des centres d'essai, la récolte des particules a été réalisée de la façon suivante. La roue a été démontée et le système de freinage ouvert. Une spatule stérile a été utilisée pour balayer délicatement la surface du système de freinage où sont déposées les particules et les faire tomber dans un tube Falcon de 50 mL. Cette opération a été répétée plusieurs fois à l'issue des différents tests pratiqués dans chaque centre d'essai afin de collecter des quantités suffisantes de particules et de constituer un stock homogène pour mener toutes les expériences

de la thèse. Les travailleurs des centres d'essai ont été sensibilisés aux risques de contamination engendrés par la procédure. Les particules recueillies constituent ce que l'on appelle la poudre à partir de laquelle la fraction nanométrique va être isolée (Chapitre III.2).

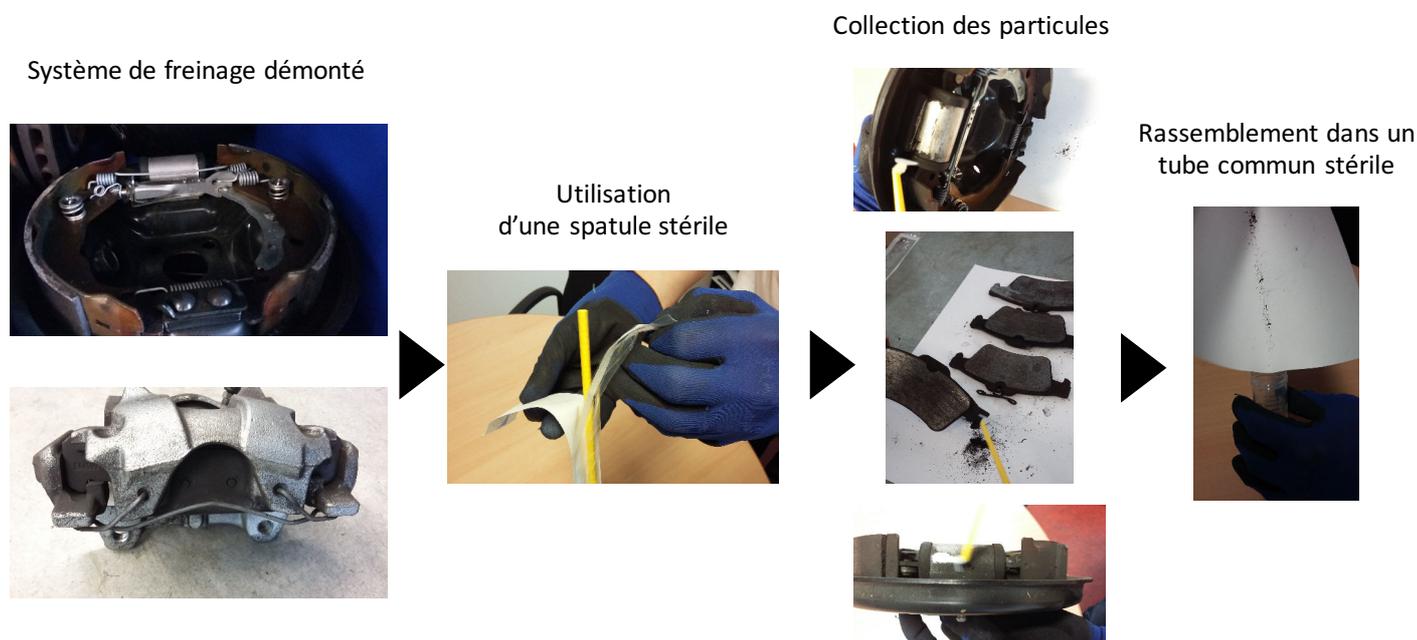


Figure II.1 :Collecte des particules d'usure des freins. Le système de freinage est démonté puis les particules sont collectées grâce à une spatule stérile sur les différentes pièces des systèmes de freinage avant d'être rassemblées dans un seul tube.

b. Les nanoparticules d'oxyde de fer (NPs- γ -Fe₂O₃)

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont des nanoparticules manufacturées qui correspondent à une nanopoudre d'oxyde de fer (REF 544884, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) dont les particules sont inférieures à 50 nm. (Certificat d'Analyse, Sigma Aldrich)

2. Modèle biologique : Cellules épithéliales bronchiques humaines de la lignée Calu-3

Les cellules Calu-3 (HTB-55TM, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) sont utilisées comme modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines dans cette étude. Il s'agit de cellules respiratoires issues d'un site métastatique (effusion pleurale) d'un adénocarcinome pulmonaire prélevées sur un individu caucasien mâle de 25 ans.

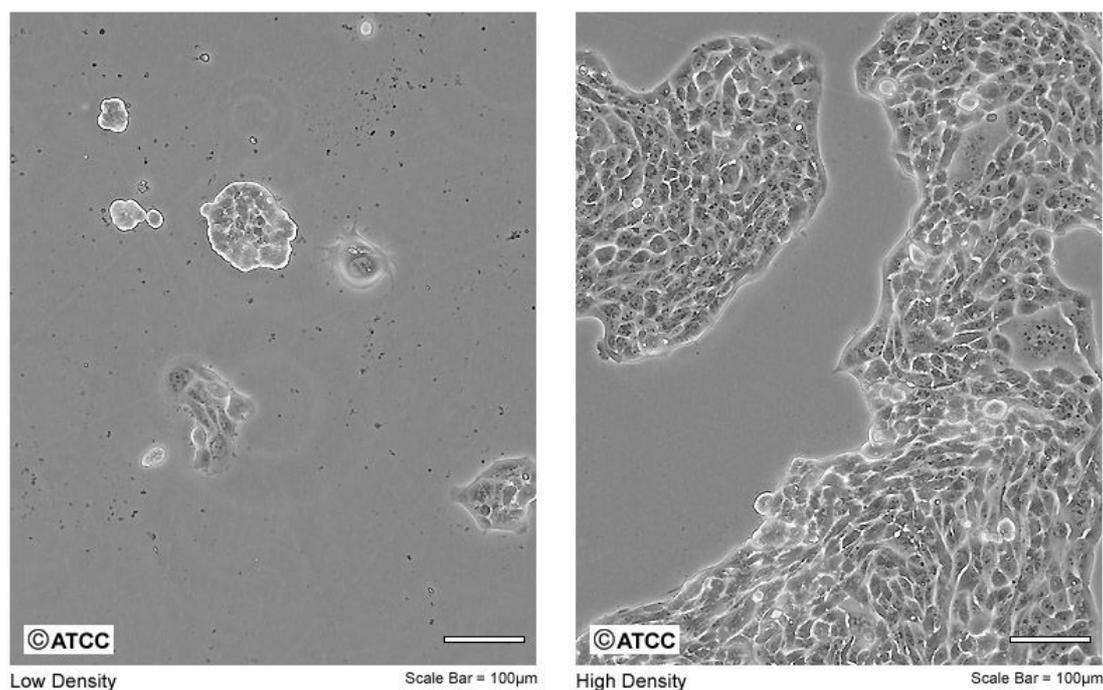


Figure II.1 : Cellules Calu-3. Les cellules Calu-3 forment de petits îlots isolés à faible densité (image de gauche) qui se regroupent au fur et à mesure des multiplications pour former un tapis étendu à forte densité (image de droite). (Source : <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-55.aspx>)

Les cellules Calu-3 sont cultivées à 37°C sous atmosphère contenant 5% de CO₂ avec du milieu MEM (Minimum Essential Medium, Sigma Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio, Les Ulis, France) et 1% d'acides aminés non-essentiels (Sigma Aldrich). Les cellules sont trypsinées une fois par semaine (Trypsin-EDTA, Sigma Aldrich) et disposées dans différents types de support selon l'utilisation envisagée du modèle. Dans le cas de cellules non différenciées, les cellules sont disposées en plaques à une densité de 120 000 cellules/cm² (soit 40 000 cellules/puits en plaques 96 puits) la veille du test. Dans le cas de l'établissement d'une barrière épithéliale, les cellules sontensemencées dans des *Transwells*[®] (Corning, Corning, Etats-Unis) à une densité de 500 000 cellules/cm². La culture est poursuivie pendant 14 jours avec un changement des milieux basaux et apicaux tous les 2 jours afin d'obtenir un épithélium polarisé différencié. Les 14 jours de culture sont nécessaires afin de s'assurer de l'obtention d'une barrière étanche qui peut être évaluée par la mesure de la résistance électrique trans-épithéliale et le passage paracellulaire d'un marqueur fluorescent le Lucifer Yellow (méthode décrite dans le chapitre II.7.a). (George *et al.*, 2015)

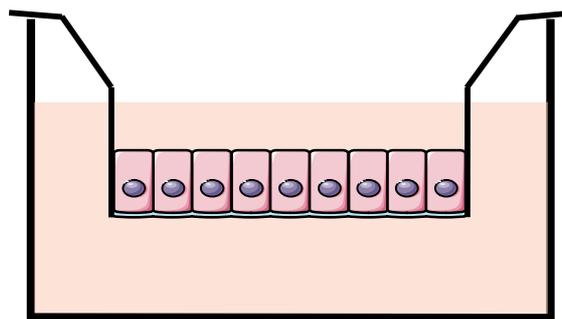


Figure II.2 : Dispositif *Transwell*®. Le dispositif *Transwell*® aussi appelé chambre d'insert à deux compartiment permet la culture de cellules adhérentes sur une membrane suspendue par l'intermédiaire d'un dispositif plastique entre deux compartiment de milieu respectivement appelé basal en dessous des cellules et apical au-dessus des cellules.

Les cultures sur *Transwell*® sont privées de sérum la veille de l'exposition aux particules afin d'éviter la formation d'une corona protéique sur les particules qui pourrait modifier leur comportement. Les passages 24 à 30 ont été utilisés au cours de l'étude.

3. Caractérisation physico-chimique des particules d'usure des freins

a. Analyse par fluorescence X

Une analyse élémentaire de la poudre a été réalisée par spectrométrie à fluorescence X. Les échantillons de poudre ont été déposés sur une membrane Prolene™ qui se caractérise par une faible absorption. Ils ont été analysés grâce à un spectromètre Epsilon 3XL (Malvern Panalytical, Almelo, Pays-Bas) équipé d'un tube de rayons X en argent. Les résultats ont été analysés grâce au logiciel Omnian qui détecte et quantifie les éléments du tableau périodique compris entre le sodium et l'uranium.

b. Microscopie optique

Une observation en contraste de phase des suspensions de poudre d'usure des freins dans l'eau (1mg/mL) a été réalisée avec un microscope inversé IX73 (Olympus Corporation, Tokyo, Japon) équipé avec des objectifs 20X, 40X et 60X. Sept microlitres de suspension ont été déposés sur une lame de verre équipée d'un système adhésif Gene Frame (ABgeneAdvanced Biotechnologies, Hamburg, Allemagne). Une camera EXi Blue (QImaging, Surrey, Canada) et le logiciel Metaview (Universal Imaging Inc., Bedford Hills, USA) ont été utilisés pour le système d'acquisition. Le logiciel ImageJ a été utilisé pour le traitement d'image (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

c. Microscopie électronique à balayage

La poudre d'usure des freins a été observée par microscopie électronique à balayage. Pour cela, la poudre a été déposée à l'aide d'un ruban adhésif sur un plot sans métallisation préalable. Les observations ont été réalisées avec un microscope Zeiss SUPRA 40V SEM-FEG (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) en travaillant avec un détecteur d'électron secondaire couplé à une lentille avec une tension d'accélération de 2kV à une distance de travail de 2-3 mm.

d. Thermogravimétrie

Afin de déterminer la balance organique/inorganique de la poudre d'usure des freins, une analyse thermogravimétrique a été réalisée avec un analyseur thermogravimétrique LABSYS Evo (Setaram Instrumentations, Caluire-et-Cuire, France) sous atmosphère inerte (Hélium). Approximativement 50 mg de poudre d'usure des freins ont été placés dans un creuset en aluminium et la température a été progressivement augmentée de 30°C à 1500°C à la vitesse de 5°C/min. La masse de l'échantillon est tracée durant toute la durée de montée en température.

4. Isolement et caractérisation des nanoparticules d'usure des freins

a. Processus de sélection de la fraction nanoparticulaire

La poudre d'usure des freins est suspendue dans l'eau à 1 mg/mL, vortexée 30 secondes et sonicquée 2 minutes à puissance maximale (10,7 W) dans un sonicateur équipé d'un « cup-horn » (Branson Ultrasonics, Shangai, Chine). Une minute de sonication dans ces conditions correspond à une énergie délivrée telle que $E_s = 650 \text{ J}$. Les suspensions de poudre d'usure des freins ici préparées sont conservées jusqu'à 30 jours à 4°C en accord avec l'étude de stabilité (Chapitre III.3). Ces dernières contenant la fraction particulaire totale seront comparées en termes de potentiel toxicologique à celles filtrées contenant uniquement la fraction nanoparticulaire. Pour isoler la fraction nanoparticulaire, les suspensions sont filtrées avec une seringue équipée d'un filtre avec une membrane poreuse en polyether sulfone 0,45 μm Nalgene™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Une concentration des suspensions obtenues est réalisée grâce à une étape d'ultracentrifugation (150 000 g, 45 min) afin de pouvoir ensuite les diluer dans le milieu de culture des cellules aux concentrations testées dans l'étude toxicologique

b. Caractérisation de la taille par diffusion dynamique de la lumière

Les intensités diffusées I_s et diamètres hydrodynamiques D_H ont été mesurés en utilisant un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). Un faisceau laser 4mW He-Ne ($\lambda = 633$ nm) a été utilisé pour illuminer l'échantillon et l'intensité diffusée a été collectée avec un angle de 173° . La fonction d'auto-corrélation de second ordre a été analysée par l'utilisation de l'algorithme de Contin pour déterminer le coefficient de diffusion D_C . Le diamètre hydrodynamique a été calculé grâce à l'équation de Stokes-Einstein, $D_H = k_B T / 3\pi\eta D_C$ où k_B est la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du solvant. La vélocimétrie laser par Doppler a été utilisée pour effectuer les mesures électrocinétiques de la mobilité électrophorétique et du potentiel zêta avec l'équipement Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). La diffusion de la lumière et les mesures du potentiel zêta ont été effectuées en triplicat à 25° C après un temps d'équilibrage de 120 s.

c. Microscopie électronique à transmission couplée à la diffraction par rayonnement X

La fraction nanoparticulaire de la poudre d'usure des freins a été caractérisée par microscopie électronique à transmission (MET) par l'utilisation d'un microscope JEOL 2010 (JEOL Ltd, Tokyo, Japon) fonctionnant à 200 kV avec un filament LaB6 équipé avec une camera CCD Orius (Gatan inc., Warrendale, PA, Etats-Unis). Les analyses de diffraction X (EDX, PGT) ont été réalisées de manière à connaître la composition élémentaire d'une seule nanoparticule. Des grilles de MET en molybdène et un porte-échantillon en béryllium ont été utilisés afin d'éliminer la contribution faussement positive du cuivre des grilles qui sont classiquement utilisées en MET. L'analyse des images a été réalisée grâce au logiciel ImageJ et la distribution en taille a été calculée à partir de $n = 200$ particules. La distribution a été ajustée par l'utilisation d'une fonction log-normale, conduisant au diamètre médian et à sa dispersion.

5. Dosimétrie

Les particules ont été testées sur les cellules à des concentrations allant de 1 à $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cependant les particules sédimentant sur les cellules de façon différente selon leur taille, il est également nécessaire de pouvoir exprimer la concentration d'exposition en concentration déposée sur les cellules. Cette dernière a été calculée à l'aide du modèle ISDD (*In vitro* Sedimentation, Diffusion and Deposition model). (Hinderliter *et al.* 2010)

Les paramètres suivants ont été utilisés dans le modèle :

- Pour les plaques : profondeur du puits : 3 mm ; volume : 100 μL ; concentration initiale du matériau : 330 $\mu\text{g/mL}$; viscosité (MEM, 37°C) : 0,783 mPa.s temperature : 37°C ; densité du milieu (MEM, 37°C) : 1,0091 g.cm^3 ; densité Fe_2O_3 : 5,02 g.cm^3 ; densité effective Fe_2O_3 : 1,402 g.cm^3 ; densité effective NPs-usure : 1,402 g.cm^3 ; temps d'incubation : 24h ; diamètres des populations particulières : 167,8/316,7/1234 nm ; répartition des populations particulières : 0,12/0,78/0,10.
- Pour les *Transwells*®, quelques paramètres différent : profondeur du puits : 5 mm ; volume : 300 μL .

6. Caractérisation de la toxicité sur cellules Calu-3 non différenciées

a. Test de viabilité par mesure de l'activité mitochondriale (WST-1)

Afin de déterminer l'impact de toxique sur la cellule, une méthode conventionnellement utilisée en toxicologie est le test WST-1. Ce test fait appel à l'activité métabolique cellulaire en évaluant l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

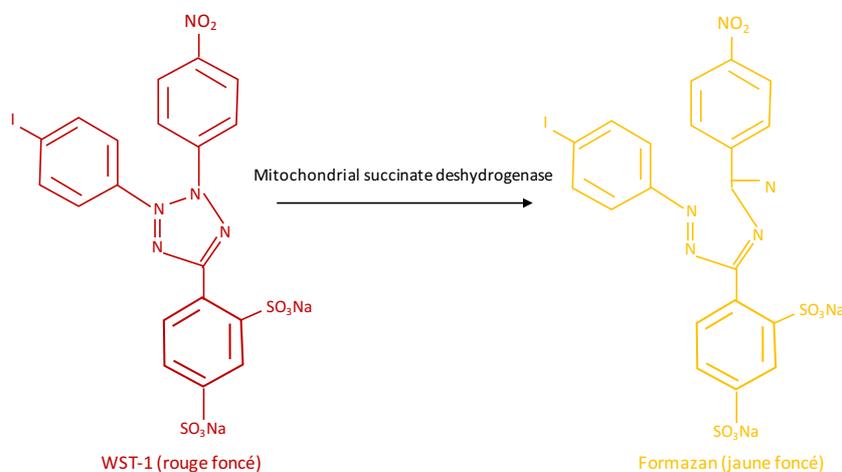


Figure II.3 : Test WST-1. Le test « WST-1 » consiste à introduire dans le milieu cellulaire un sel de tétrazolium qui sera réduit en formazan par la succinate déshydrogénase des cellules vivantes. (Source : Adapté de Sigma-Aldrich)

Les cellules Calu-3 ont étéensemencées à 40 000 cellules par puits en plaques 96 puits. Le lendemain, les cellules ont été exposées aux suspensions de poudre d'usure des freins (*cf* chapitre II.4.a) et à sa fraction nanoparticulaire pour des doses de 1 à 100 $\mu\text{g/cm}^2$. Ces doses correspondent à des concentrations de 3 à 300 $\mu\text{g/mL}$. La viabilité cellulaire reflétée par l'intégrité mitochondriale a été mesurée 24h plus tard en utilisant le test « Cell Prolifération

Reagent WST-1 » (Roche, Bale, Suisse) en accord avec les recommandations du fabricant. Les expériences ont été réalisées en triplicats techniques (n=3) et en triplicats biologiques (N=3). Après traitement, les cellules sont rincées deux fois avec de l'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen, Waltham, Etats-Unis). Une première plaque est incubée avec la solution de WST-1 dans du milieu de culture (1 :10) pendant 1h30, alors que la seconde plaque est au préalable traitée avec du Triton 100X (0,1 wt %) pendant 15 min avant l'ajout de la solution de WST-1. Cette seconde plaque a été utilisée afin d'évaluer l'impact de potentielles interférences de particules absorbées/internalisées. L'absorbance du signal reflétant la viabilité a été mesuré à 450 et 630 nm avec un lecteur de microplaque ELx808 (Biotek Instruments, Winooski, Etats-Unis). La densité optique à 630 nm a été soustraite de la valeur à 450 nm afin d'obtenir le signal final.

b. Evaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène

Afin de déterminer l'impact d'un toxique sur la cellule, une méthode conventionnellement utilisée en toxicologie est le test DCFH₂DA. Ce test fait appel à la problématique de stress oxydant. Le niveau de stress oxydant est évalué par un dosage des espèces réactives de l'oxygène qui sont relarguées et oxyde une sonde qui devient fluorescente en leur présence.

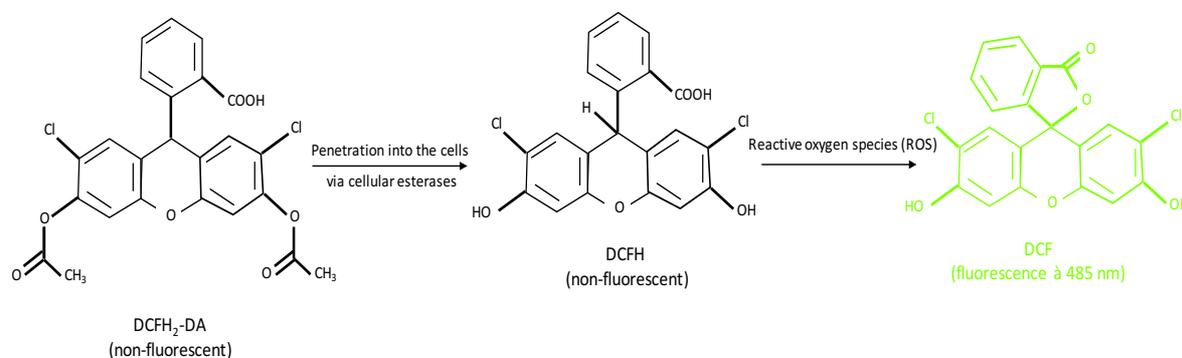


Figure II.4 : Oxydation de la sonde DCFH₂-DA. La production d'espèces réactives de l'oxygène est quantifiée par l'intermédiaire d'une sonde qui s'oxyde en présence d'espèce réactive de l'oxygène. Dans un premier temps, la sonde pénètre dans les cellules via des estérases, puis cette sonde est oxydée par les espèces réactives de l'oxygène potentiellement présentes dans l'environnement cellulaire. (Adapté de <http://bqckit.com/product/dcfh-da-probe/>)

Les cellules Calu-3 ont étéensemencées à 40 000 cellules par puits en plaques 96 puits. Le lendemain, les cellules sont rincées avec de l'HBSS puis chargées avec une solution à 25 µM de CM-DCFH₂DA (Molecular Probes, Eugene, Etats-Unis) dans l'HBSS pendant 45 min à 37°C. Après une étape de lavage avec de l'HBSS, les cellules sont exposées aux particules pendant 0,5, 1, 2 et 4h. La fluorescence a été mesurée avec un lecteur de microplaque en mode

multiple FlexStation® 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, Etats-Unis) à 485/535 nm. Le bruit de fond à 535 nm a été soustrait du signal à 485 nm. Des contrôles positifs consistant en l'utilisation de tert-butyl hydroquinone (TBHQ) et H₂O₂ à 50 µM dans du milieu de culture ont été réalisés en accord avec les recommandations du fournisseur.

c. Etude de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines relarguées dans le milieu de culture cellulaire sont dosées par méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) dont le principe est présenté ci-après. (Figure II.5)

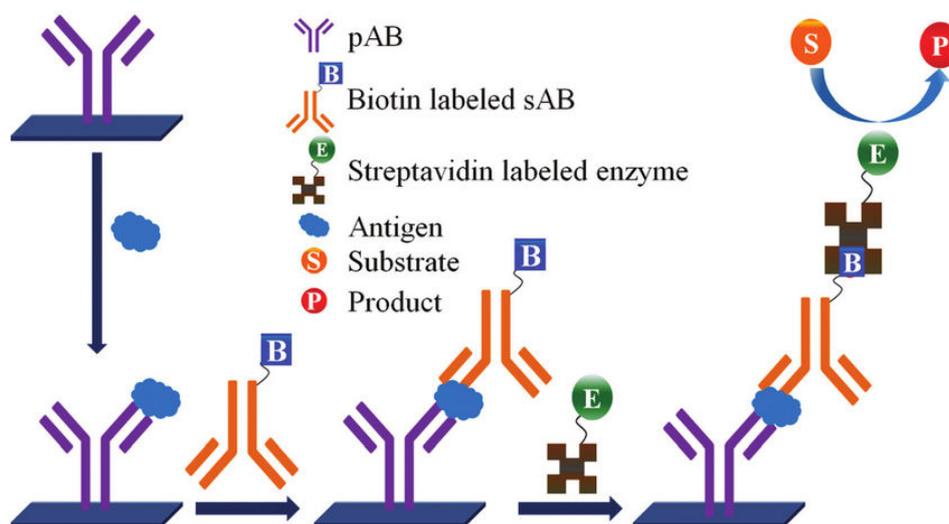


Figure II.5 : Quantification de la sécrétion de cytokines par ELISA « sandwich ». Les cytokines sont captées par des anticorps fixés dans des plaques puis détectées par des anticorps secondaires biotinylés qui seront couplés avec la streptavidine. La streptavidine complexée à une enzyme va transformer un substrat en produit coloré. L'absorbance mesurée est donc proportionnelle à la quantité de cytokine contenue dans le milieu cellulaire. (Source : Nimse *et al.* 2015)

Les cellules Calu-3 ont étéensemencées à 40 000 cellules par puits en plaques 96 puits. Le lendemain les cellules ont été exposées aux suspensions de poudre d'usure des freins (cf partie 4.a) et à sa fraction nanoparticulaire pour des doses de 1 à 100 µg/cm². Ces doses correspondent à des concentrations en masse de 3 à 300 µg/mL. Après 24h d'incubation, les milieux de culture contenant les cytokines secrétées ont été récoltés et centrifugés (3000g, 4°C, 10 min) pour la quantification du relargage d'IL-6, IL-8 et TNFα dans le milieu de culture par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, R&D Systems, Minneapolis, Etats-Unis). Le signal d'absorbance reflétant le relargage de cytokines a été mesuré à 450 et 630 nm avec un lecteur de microplaques (Biotek Instruments, Winooski, Etats-Unis). Le bruit de fond à 630 nm a été soustrait à la densité optique à 450 nm afin d'obtenir le signal final. Pour le dosage de l'IL-8,

les échantillons sont dilués au ½ afin d'obtenir des signaux compatibles avec la gamme d'étalonnage.

d. Mesure d'endotoxines

Le dosage des endotoxines présente au niveau des particules a été réalisé grâce au kit « Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation » (ThermoFisher Scientific) en accord avec les recommandations du fournisseur. Ce kit consiste en la détection et quantification d'endotoxine présentes dans un échantillon grâce au lysat d'amœbocyte de limule. Les particules sont mises en suspension dans de l'eau à une concentration de 1 mg/mL pour réaliser l'expérience.

7. Caractérisation de la toxicité sur la barrière épithéliale

a. Mesure de la perméabilité épithéliale

La mesure de la perméabilité épithéliale a été réalisée à différents moments de l'étude par 2 méthodes. Cette mesure a pour objectif de vérifier l'intégrité des épithéliums, de valider leur bonne différenciation avant de commencer les expériences et d'évaluer les conséquences de l'exposition aux nanoparticules sur l'étanchéité de la barrière épithéliale respiratoire.

Résistance électrique trans-épithéliale

L'intégrité des épithéliums a été examinée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER). Pour la mesure de TEER, un EVOM (voltmètre) équipé avec une chambre Endohm® 12 (World Precision Instrument, Sarasota, Etats-Unis) a été utilisé. La TEER est mesurée à chaque changement de milieu pendant le processus de différenciation et avant chaque expérience pour s'assurer que cette dernière soit menée sur un épithélium sain. La chambre Endohm® 12 est remplie avec 1,5 mL de milieu préchauffé et les membranes sont placées une à une dans cette chambre pour la mesure de la résistance réalisée grâce au voltmètre associé (EVOM). Des contrôles consistant en des Transwells® dépourvus de cellules sont aussi réalisés. La TEER est ensuite calculée selon la formule suivante : $TEER_{éch} = (R_{échantillon} - R_{blanc}) \times S$ où $R_{échantillon}$ est la résistance mesurée de l'échantillon et R_{blanc} est la résistance de la membrane dépourvue de cellule ; enfin, S est la surface du filtre ici $1,12 \text{ cm}^2$. Les résultats sont exprimés en Ω/cm^2 .

Passage paracellulaire du Lucifer Yellow

Le Lucifer Yellow, qui est un colorant paracellulaire (incapable d'internalisation cellulaire lors d'une exposition de courte durée), a aussi été utilisé pour vérifier l'intégrité des épithéliums avant et après l'exposition aux nanoparticules. Il s'agit d'un marqueur fluorescent paracellulaire capable de passer du compartiment basal du Transwell® au compartiment apical uniquement en cas de lésion de l'épithélium et/ou d'ouverture des jonctions serrées (George *et al.* 2015). Brièvement, une solution préchauffée de Lucifer Yellow à 0,1 mg/mL (Sigma-Aldrich) dans de l'HBSS est appliquée pendant 45 min à 37°C au niveau du compartiment apical (donneur) en accord avec les recommandations du fournisseur. Le surnageant basal (receveur) est ensuite collecté et la fluorescence est mesurée grâce à un lecteur de multiplaques multimode FlexStation® 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, Etats-Unis) à 485/535 nm. Une mesure de la fluorescence intrinsèque du tampon HBSS et de la solution fluorescente de Lucifer Yellow a aussi été mesurée. La perméabilité (en %) est ensuite calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{perméabilité (en \%)} = \frac{F(\text{Ech}) - F(\text{Blanc})}{F(\text{LY}) - F(\text{Blanc})} \times 100$$

où F(ech) correspond à la fluorescence de l'échantillon, F(Blanc) correspond à la fluorescence de l'HBSS et F(LY) est la fluorescence de la solution mère de Lucifer Yellow préalablement appliquée au niveau apical.

b. Etude de la viabilité cellulaire par mesure de l'intégrité membranaire

Le test d'intégrité membranaire consiste en la mesure du relargage de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les surnageants apicaux et basaux après traitement. Cette enzyme cytosolique n'est relarguée que s'il y a une atteinte de la membrane et atteste ainsi d'une perte de viabilité cellulaire.

Brièvement, après les deux semaines de culture, les épithéliums sont privés de sérum pendant 24h puis exposés aux suspensions de nanoparticules d'usure des freins à des concentrations de 1 à 100 µg/cm². Après 24h d'exposition aux nanoparticules, les milieux de culture apicaux et basaux sont récoltés et centrifugés (3000g, 4°C, 10 min) puis l'activité de la LDH est mesurée grâce au kit « CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity assay » (Promega, Madison, Etats-Unis) en accord avec les recommandations du fournisseur. L'absorbance correspondante est déterminée à 490 nm et l'intégrité membranaire reflétant la viabilité est calculée grâce à la formule suivante : Intégrité membranaire (%) = $\frac{A_e}{A_t} \times 100$ où A_e correspond à l'absorbance de l'échantillon, A_t correspond à l'absorbance du témoin n'ayant pas reçu de traitement.

c. Etude de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

Les cellules Calu-3 ont étéensemencées à 500 000 cellules par Transwell® de 1.12 cm² puis cultivées pendant deux semaines avec un changement des milieux de culture basaux et apicaux un jour sur deux. Après une incubation de 24h avec du milieu de culture dépourvu de sérum, les cellules sont exposées pendant 24h aux suspensions de poudre d'usure des freins et à leur fraction nanoparticulaire pour des doses de 1 à 100 µg/cm². Les milieux de culture apicaux et basaux sont récoltés et centrifugés (3000g, 4°C, 10 min) pour la quantification du relargage d'IL-6, IL-8 et TNFα dans le milieu de culture par ELISA selon le protocole décrit précédemment (Chapitre II.6.c).

d. Immunocytochimie

Les épithéliums sont fixés après traitements par les nanoparticules avec du paraformaldéhyde 4% dans de l'HBSS (Sigma-Aldrich) pendant 25 minutes à température ambiante. Après trois lavages, les membranes des Transwells® sont découpées au scalpel pour faciliter la réalisation des immunomarquages et éventuellement diviser le filtre pour multiplier les anticorps à tester. Les cellules sont perméabilisées et saturées dans une solution de BSA 1% + 0,2% Triton dans du PBS (Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire à la dilution adéquate dans la solution de perméabilisation/saturation à 4 °C. Après trois lavages au PBS, une incubation de 45 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire à la dilution adéquate dans la solution de saturation/perméabilisation est réalisée. Les membranes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage FluoroShield® (Sigma-Aldrich) contenant du DAPI qui permet le marquage des noyaux des cellules. Les lames ont été observées au microscope confocal avec un objectif 40X (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Les réglages de l'instrument ont été décidés en accord avec les lois optiques, dans le souci d'obtenir des images avec la meilleure résolution possible. Le traitement d'image a été réalisé grâce au logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Tableau II.1 : Anticorps utilisés pour l'immunomarquage lors de l'étude de l'intégrité de la barrière épithéliale respiratoire

Anticorps	Type	Référence	Espèce	Dilution
Anti-actine	Primaire	ThermoFisher (A12379)	Phalloïdine-GFP	1/100 ^{ème}
Anti-tubuline	Primaire	Sigma Aldrich (T9026)	Souris	1/100 ^{ème}
Anti-ZO-1	Primaire	ThermoFisher (33-9100)	Souris	1/500 ^{ème}
Anti-souris	Secondaire	ThermoFisher (A-10667)	Chèvre (Alexa Fluor® 488)	1/1000 ^{ème}
Anti-souris	Secondaire	ThermoFisher (A-11004)	Chèvre (Alexa Fluor® 568)	1/1000 ^{ème}

8. Caractérisation du devenir des nanoparticules au niveau de la barrière respiratoire

a. Dosage de la quantité de fer par sp-ICP-MS

Les mesures de sp-ICP-MS ont été réalisées sur un appareil HR-ICP-MS Element II (ThermoFisher Scientific). Afin de doser le Fer présent dans nos échantillons, l'isotope 56 du fer a été mesuré en moyenne résolution (MR) pour résoudre la principale interférence polyatomique (40Ar16O). La technique de spICPMS s'est révélée comme une méthode puissante permettant la mesure de la composition ainsi que les distributions en taille et en nombre de particules inorganiques (Tharaud et al., 2017). En effet, cette technique se base sur la robustesse, la sélectivité et la sensibilité de la spectrométrie de masse à source plasma (Pontes da Costa et al. 2017). Tandis, qu'une analyse ICP-MS classique nécessite un temps d'intégration (dwell-time) relativement élevé (env. 100 msec), la spICPMS requiert l'utilisation d'un dwell-time de l'ordre de la milliseconde voir de la centaine de microseconde pour certaines applications, permettant ainsi la détection d'évènements individuels. L'intensité de chacun de ces évènements ainsi que le nombre d'évènements seront respectivement reliés à la taille et aux nombres de NPs. L'échantillon étant introduit dans le plasma après passage dans une chambre de nébulisation engendrant des pertes, il est nécessaire d'effectuer le calcul d'une efficacité de nébulisation (Effneb) (Tharaud et al., 2017). Cette dernière est déterminée au début de chaque session d'analyses à l'aide d'un matériel de référence de taille et de nombre connus (ici des AuNPs de 60 nm) puis appliquée à l'échantillon inconnu de manière à définir les distributions en taille et nombre.

9. Impact des nanoparticules sur le processus de protection épithéliale

a. Traitement des cellules

Les cellules Calu-3 cultivées en transwells ont été exposées à une échelle de doses (1 à 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de nanoparticules d'oxyde de fer et d'usure des freins pendant 24 heures. Lors de l'investigation mécanistique (Chapitre V.c), une pré-exposition de 30 minutes aux inhibiteurs de la voie EGFR a été réalisée comme détaillée dans le chapitre V.c.

b. Impact des nanoparticules sur le processus de protection épithéliale : Etude de l'expression et de la sécrétion de MUC5AC

Immunomarquage de la protéine MUC5AC

Les mucines sont un mélange de différentes protéines dont la mucine MUC5AC est la plus abondante au niveau bronchique (Hovenberg *et al.* 1996). Un anticorps spécifique est disponible permettant sa localisation cellulaire et sa quantification. Le protocole utilisé correspond à celui détaillé dans la section 7.d. Cependant, les anticorps utilisés étant différents, leurs caractéristiques sont détaillées dans le tableau ci-après.

Tableau II.2 : Anticorps utilisés pour l'immunomarquage lors de l'étude de la fonction de protection de l'épithélium respiratoire

Anticorps	Type	Référence	Espèce	Dilution
Anti-MUC5AC	Primaire	Thermofisher (MA5-12178)	Souris	1/250 ^{ème}
Anti-souris	Secondaire	Thermofisher (A-10667)	Chèvre (Alexa Fluor® 488)	1/1000 ^{ème}

Analyse quantitative de la quantité de protéine MUC5AC

Les observations au microscope confocal ont fait l'objet d'une analyse d'images afin de quantifier le niveau d'expression de la protéine MUC5AC. Un seuillage homogène des images acquises en imagerie confocale a été réalisé suivi d'un détournage automatique des spots du marquage correspondant à MUC5AC. L'aire des spots est ensuite calculée après un étalonnage objectif. Enfin, la valeur totale de l'aire correspondant au marquage est normalisée par rapport au nombre de noyaux marqués par le DAPI.

c. Mesure de l'expression de MUC5AC par PCR quantitative

Extraction des échantillons

A l'issue de l'exposition de 24 heures des épithéliums aux nanoparticules, l'ARN total est extrait après deux rinçages avec de l'HBSS par utilisation du kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Hoerd, France) en accord avec les recommandations du fournisseur. Brièvement, les ARN sont retenus sur une colonne de groupements silice et lavés après dessalage de la membrane. Après le dernier lavage, les ARN sont élués en eau ultrapure et stockés à -80°C jusqu'à usage ultérieur.

Contrôle qualité et rétrotranscription

Après contrôle qualité au Nanodrop™ (Nanodrop™ 2000, ThermoFisher Scientific), les ARN sont rétrotranscrits à l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, France) utilisé en accord avec les recommandations du fournisseur.

PCR quantitative

Les réactions de PCR en temps réel (qPCR) ont été réalisées grâce au gène de référence RPL19 et plusieurs gènes ont été analysés grâce à la Taq Polymérase et le SYBR Green contenu dans le Mix Light Cycler 480 SYBR Green 1 Master (Roche).

L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur Lightcycler 480 (Roche, Basel, Suisse) en plaques 384 puits avec un volume final de 10 µL :

- 2 µL d'échantillon dilué au 1/10^{ème}
- 8 µL de mélange pour PCR :
- 5 µL de 2X SYBR Green MasterMix (Roche)
- 0,3 µL d'amorce « Sens » (R) + 0,3 µL d'amorce « Anti-sens » (L) (dilution au 1/10^{ème} de la solution mère à 100µM (Eurogentec, Kaneka Corporation, Osaka, JPN)
- 2,4µL d'eau « Nuclease Free » (Macherey-Nagel)

Le SYBR Green, agent intercalant, est lié à l'ADN double brin à chaque cycle d'amplification et la détection de fluorescence est suivie en temps réel. 40 cycles d'amplification sont réalisés, après 5 minutes à 95°C d'activation de l'ADN polymérase, 10 secondes à 95°C permettent de dénaturer l'ADN double brin, puis, 20 secondes à 58°C permettent l'hybridation de l'amorce et enfin, 20 secondes à 72°C permettent l'élongation du brin d'ADN complémentaire néoformé.

Une courbe de fusion est réalisée afin de vérifier la spécificité de l'amplification. Le seuil de fluorescence est établi par l'appareillage. Dès que la quantité d'ADN amplifiée permet de franchir ce seuil, un numéro de cycle « Ct » (pour Cycle Threshold) est attribué au puits échantillon. Cette valeur permet de quantifier l'ADN ; plus sa valeur est basse, plus l'échantillon de départ présentait une forte concentration. Les séquences des gènes d'intérêt ont été obtenues sur le site Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 input (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) avec comme exigence : longueur de 20 nucléotides, T_m (température de fusion) de 60°C, localisation à cheval sur deux exons, pourcentage de GC de 50% et une taille d'amplicon de 150 à 300 nucléotides. Chaque amorce est ensuite testée (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pour vérifier l'absence d'hybridation non spécifique qui conduirait à l'amplification d'autres gènes que ceux d'intérêt.

d. Etude mécanistique des voies de signalisation impliqué dans les modifications du niveau de transcrits et de protéine MUC5AC

Après exposition de 24h aux nanoparticules, les surnageants apicaux et basaux des dispositifs Transwell® ont été prélevés. Ces milieux ont été centrifugés (3000g, 4 °C, 10 min) puis la quantification du relargage d'amphireguline et TGF α a été réalisée par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, R&D Systems, Minneapolis, Etats-Unis). Ce protocole correspond à celui précédemment détaillé en paragraphe 6.c.

10. Impact des nanoparticules sur le processus de réparation épithéliale après blessure

a. Blessure des épithéliums

Les barrières épithéliales ayant au préalable été exposées pendant 24 heures aux nanoparticules (1 à 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sont blessées par aspiration selon un mouvement rectiligne des cellules selon la largeur d'un cône de 100 μL . La pointe de cône est appliquée à 90°C et reliée à une pompe afin d'éviter l'effet bord et d'aspirer les cellules au fur et à mesure de la blessure. La méthode utilisée permet d'obtenir des blessures homogènes sur les différentes cultures en *Transwell*® telles que $l=864 \pm 38 \mu\text{m}$ en largeur de blessure.

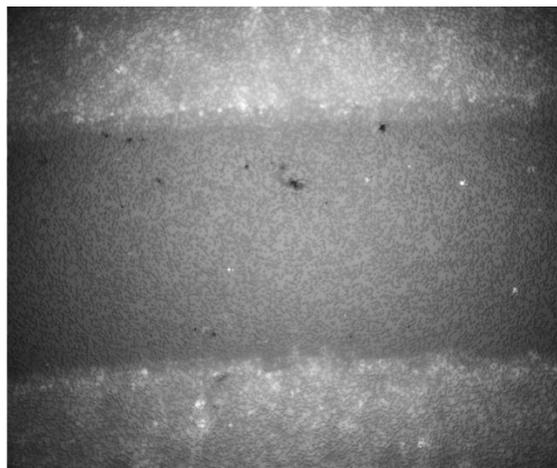


Figure II.6 : Blessure épithéliale. L'épithélium blessé présente une morphologie caractéristique : la zone centrale plus foncée correspond à la blessure et la zone plus claire périphérique au tissu épithélial. Cette différence de contraste est rendue possible par le marquage fluorescent détaillé ci-après. On note la présence de petits agrégats très contrastés qui sont des agrégats de nanoparticules dans la mesure où l'épithélium présenté a été pré-exposé à des nanoparticules d'oxyde de fer.

b. Evaluation de la vitesse de réparation par vidéomicroscopie

Afin de visualiser les cellules en vidéomicroscopie, les cellules ont été marquées grâce au kit CellTracker™ Green CMFDA (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) qui les rend fluorescentes tout en préservant leur viabilité. Le suivi de la réparation est effectué par photographies successives toutes les 30 minutes pendant 72h. L'acquisition des images est réalisée sur un Plein Champ Leica Statif DMI 6000 équipé d'une caméra sCMOS Andor (plateforme ImagoSeine, Institut Jacques Monod). Les cellules sont maintenues à 37°C avec une atmosphère à 5% de CO₂ grâce à une enceinte permettant un contrôle de l'environnement. L'acquisition est gérée par le logiciel d'acquisition d'images MetaMorph. Le traitement d'image a été réalisé grâce au logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

c. Marquage de la prolifération cellulaire par incorporation de EdU

Le suivi de la prolifération cellulaire durant le processus de réparation est assuré par l'incorporation d'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, nucléotide analogue de la thymidine) par les cellules en phase S. L'EdU est dilué dans le milieu de culture à une concentration de 10 µM. Le milieu de culture contenant l'EdU est appliqué juste après la blessure de l'épithélium jusqu'à la fixation de l'épithélium après 1, 4, 6, 10, 16, 24, 48 et 72 heures. Le processus de fixation implique une fixation de 25 minutes grâce à du paraformaldéhyde 4% dans du PBS (Phosphate Buffer Solution, Gibco) suivie de trois lavages avec du PBS. La révélation de l'EdU incorporé dans les cellules est assurée par l'utilisation du kit « Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488

Imaging kit » (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) en accord avec les recommandations du fournisseur. Les éithéliums fixés et marqués sont montés entre lame et lamelle dans un milieu contenant du DAPI pour le marquage des noyaux (FluoroShield®, Sigma Aldrich). Les lames ont été observées au microscope confocal avec des objectifs 10X et 40X (LSM 710, Zeiss). Les réglages de l'instrument ont été décidés en accord avec les lois optiques, dans le souci d'obtenir des images avec la meilleure résolution possible. Le traitement d'image a été réalisé grâce au logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Les champs analysés représentent trois 3 champs autour de la blessure et 3 champs du tapis cellulaire.

11. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées par l'intermédiaire du logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, Etats-Unis). Le design des études statistiques a été établi en fonction d'un arbre décisionnel en respectant les exigences respectives à chaque test. Des tests paramétriques et non paramétriques en accord avec les paramètres de l'étude suivi de post-tests multicomparatifs ont été réalisés.

Chapitre III :

Caractérisation physico-chimique et étude toxicologique des nanoparticules manufacturées (NPs- γ -Fe₂O₃) et issues de l'usure des freins (NPs-usure)

1. Introduction et concept

Les particules d'usure des freins proviennent d'émissions du trafic routier qui ne sont pas liées à l'échappement et qui ne font à ce jour l'objet d'aucune réglementation. Cependant, ces particules constituent une préoccupation sanitaire émergente compte-tenu de leur composition majoritaire en éléments métalliques (Grigoratos *et al.* 2015). Les émissions liées à l'échappement sont quant à elles, mieux contrôlées grâce à des technologies de dépollution qui se sont développées sous la contrainte réglementaire. Ceci a pour conséquence l'accroissement de la contribution des particules produites par les mécanismes d'usure dans les concentrations massiques de l'aérosol particulaire du trafic routier (Rexeis *et al.* 2009). Ainsi, Hooftmann *et al.*, ont estimé que d'ici 2020, grâce au renouvellement du parc automobile, les émissions non-liées à l'échappement, représenteront plus de 85% des émissions liées au trafic routier (Hooftman *et al.* 2016). Les systèmes de freinage sont des sources importantes de particules puisque les freins à tambours émettent 30 mg/km/véhicule de particules et ceux à disque 9 mg/km/véhicule (Kutkutschova *et al.* 2009).

La pollution particulaire non-liée à l'échappement et notamment celle de l'usure des freins a fait l'objet d'une attention principalement limitée à leur caractérisation physico-chimique alors que leurs effets toxicologiques ont été peu étudiés.

Dans ce contexte nous avons souhaité contribuer à une meilleure connaissance de ces particules d'usure des freins. Il a été estimé que 35 à 50% des particules générées lors de l'usure d'une plaquette de freins est aéroportée et 86 et 63% de cette quantité correspondent respectivement à des PM₁₀ et PM_{2,5}. (Garg *et al.* 2000). Par ailleurs de nombreuses études ont démontré la présence d'une fraction ultrafine dans la poudre d'usure des freins qui sont donc de taille nanométrique (Garg *et al.* 2000 ; Kukutschova *et al.* 2011 ; Kwak *et al.* 2013 ; Iijima *et al.* 2007 ; Riediker *et al.* 2004 ; Sanders *et al.* 2003 ; Wahlström *et al.* 2010). Nous avons

choisi de focaliser notre étude sur cette fraction nanoparticulaire pour l'instant mal caractérisée.

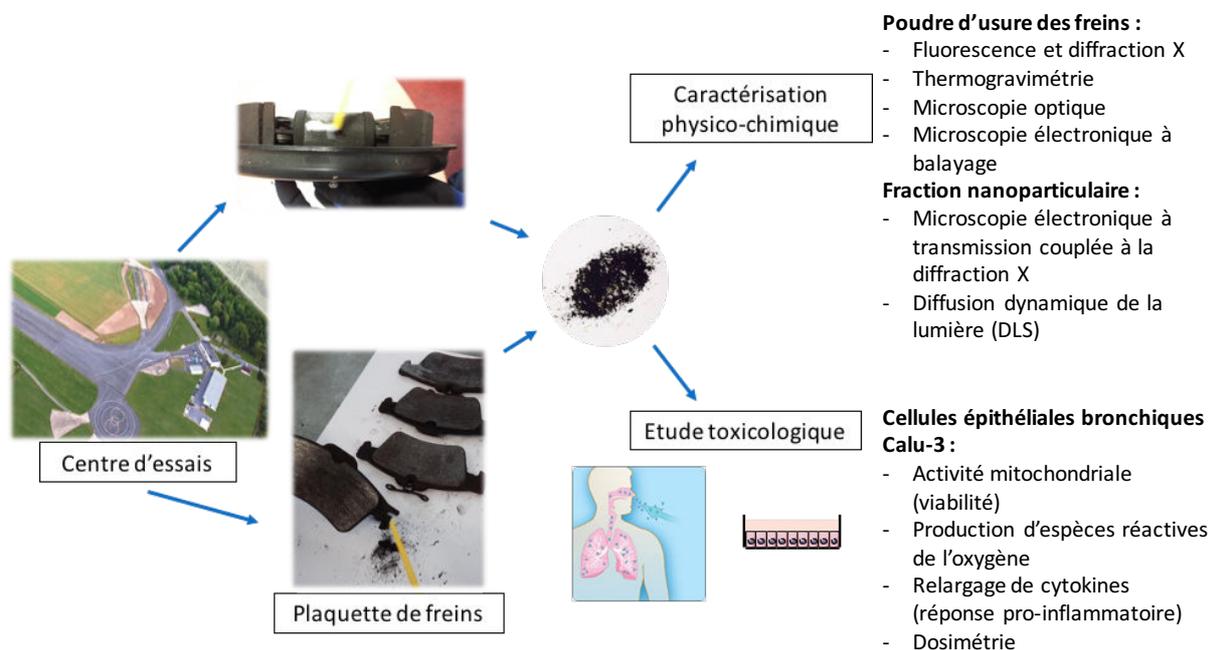


Figure III.1 : Concept général de l'étude des propriétés physico-chimiques des particules d'usure des freins et de l'évaluation de leur toxicité *in vitro*. Les particules ont été collectées dans des centres d'essais à partir de plaquettes de freins ou de freins à tambour. A partir de la poudre recueillie, la fraction nanométrique a été isolée. La poudre comme la fraction nanométrique ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique approfondie puis elles ont été comparées pour leur toxicité pour les cellules épithéliales bronchiques humaines (Calu-3) en culture 2D

Les particules d'usure des freins proviennent de deux centres d'essais. Elles ont été collectées manuellement par des techniciens soit sur un dynamomètre ou à partir de véhicules entiers (cf Chapitre I.1.c). Les particules récupérées ont fait l'objet d'une caractérisation par l'utilisation d'un panel de techniques physico-chimiques : fluorescence X, diffraction par rayonnement X, microscopie optique et électronique à balayage et thermogravimétrie. Puis, nous avons mis au point un protocole pour isoler la fraction nanométrique qui a également fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique par microscopie électronique à transmission couplée à la diffraction X, diffusion de lumière (mesure de la taille et de la taille de surface des particules). La poudre et sa fraction nanométrique ont été comparées pour leur toxicité sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée Calu-3) en culture 2D. Cette étude de toxicité a consisté à évaluer l'effet des particules sur i) la viabilité par le test-WST-1 qui mesure l'activité d'une enzyme mitochondriale, sur leur capacité ii) à induire une réponse pro-

inflammatoire par la mesure du relargage d'IL-6, IL-8 et TNF α par dosage ELISA, et iii) à induire un stress oxydant par le suivi de l'oxydation de la sonde DCFH₂DA. Afin de pouvoir comparer les relations dose-réponse obtenues avec la poudre et sa fraction nanométrique, nous avons réalisé une étude de dosimétrie pour simuler les doses déposées c'est à dire la quantité de particules réellement en contact avec les cellules. Cette simulation faite en utilisant le modèle ISDD (In vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry), a permis de connaître la dose de particules déposées sur les cellules en comparaison avec la dose nominale appliquée.

Ces recherches ont fait l'objet d'une publication qui est sortie dans *Environmental Science Nano* en 2018, présentée ci-dessous.

2. Article – Version complète



Cite this: *Environ. Sci.: Nano*, 2018, 5, 1036

Brake wear (nano)particle characterization and toxicity on airway epithelial cells *in vitro*†

Chloé Puisney,^a Evdokia K. Oikonomou,^b Sophie Nowak,^c Alexandre Chevillot,^c Sandra Casale,^d Armelle Baeza-Squiban,^a and Jean-François Berret^a

Particulate air pollution resulting from different sources, among which are those related to road traffic, has a significant impact on human health. Combustion-derived particles emitted by thermal engines have been implicated and are now better controlled. In contrast, non-exhaust emission sources related to car wear and degradation processes are not yet regulated. Here we report on brake wear particles (BWPs) harvested in two test facilities operating in France, providing samples from different braking systems and driving/testing conditions. Using a combination of light scattering, X-ray fluorescence, and optical and electron microscopy, the particle size and elemental composition are revealed. The BWPs are shown to be in the nano- to micrometer range and to have a low carbonaceous content (6%), iron and copper being the main components (>40%). To evaluate the toxicity potential of their nano-sized fraction, the brake wear nanoparticles are isolated by sonication, filtration and ultra-centrifugation techniques, leading to stable colloidal dispersions. A significant outcome of this study is that the nano-sized fraction represents 26% by mass of the initial BWPs. Human bronchial epithelial cells (Calu-3) are used as relevant target cells to investigate their cytotoxicity. We observe a clear short-term loss of viability associated with reactive oxygen species generation, but with limited pro-inflammatory effects. On an actual cell-deposited mass-dose basis, the cytotoxicity of the nano-sized fraction is similar to that of BWPs, suggesting that the cytotoxicity is particle size-independent. To conclude, brake wear dust contains a substantial amount of metallic nanoparticles exhibiting toxicity for lung cells, and should warrant further consideration.

Received 8th September 2017,
Accepted 4th March 2018

DOI: 10.1039/c7en00825b

rsc.li/es-nano

Environmental significance

Air pollution is now recognized as a major environmentally related health threat. Traffic exhaust particles are considered to contribute significantly to this threat, resulting in the implementation of specific regulations for the automotive industry. Until now, little attention has been paid to non-exhaust particles, especially to wear particles emitted by transport vehicles during braking. Here we provide evidence that brake wear particles coming from two distinct sources contain large amounts of metallic particles of size less than 100 nm. These nanoparticles are shown to be cytotoxic towards human bronchial cells, but display limited pro-inflammatory effects. The presence of metallic nanoparticles in brake wear emissions raises concerns about their ability to translocate through the respiratory barrier and trigger systemic effects.

Introduction

Air pollution is now recognized as a major environmentally related health threat. A number of epidemiological studies have shown the existence of an association between the exposure to air pollution and the increase of mortality and morbidity from cardiorespiratory diseases.^{1,2} Toxicological studies have supported the biological plausibility of this association, especially for the particulate matter (PM) component.³ PM air pollution results from different sources, among which road traffic has a significant part, impacting urban populations worldwide. Combustion-derived particles emitted by thermal engines are specifically held accountable, which has led state agencies to implement stricter regulations for the automotive industry, eventually resulting in the reduction

^a UMR CNRS 8251, Unit of Functional and Adaptive Biology, Laboratoire de Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, Université Paris Diderot, Université Sorbonne Paris Cité, 5 Rue Thomas Mann, F-75205, Paris, France. E-mail: baeza@univ-paris-diderot.fr

^b UMR 7057 CNRS, Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, Université Paris Diderot, Université Sorbonne Paris Cité, 10 Rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris, France. E-mail: jean-francois.berret@univ-paris-diderot.fr

^c UMR CNRS 7086, Laboratoire Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, Université Paris Diderot, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^d Institut des Matériaux de Paris Centre, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7en00825b

of $PM_{2.5}$ (particles with aerodynamic diameters $\leq 2.5 \mu\text{m}$) in the past decades.⁴ By contrast, non-exhaust emission sources related to wear mechanisms are not yet regulated. Wear and degradation processes concern the subcomponent moving parts in cars, including the clutch, tires, brakes *etc.* as well as the direct driving environments, such as roads or tarmac. Moreover, with the broadening of exhaust post-treatment (*e.g.* diesel particulate filters) and the emergence of electric vehicles, the proportion of wear particles in urban pollution is expected to soar in the coming years.^{5,6}

Recent studies have shown that the contribution of brake wear particles (BWPs) can represent up to 55% by mass of the total non-exhaust traffic-related PM_{10} emissions and up to 21% by mass of the total traffic-related PM_{10} (particles with aerodynamic diameters $\leq 10 \mu\text{m}$) emissions.^{7,8} The two types of frictional braking systems available for light-duty and small vehicles are drum and disc/pad brakes, whose emissions have been quantified in specific contexts at a level of 30 mg km^{-1} and 9 mg km^{-1} of particles per vehicle, respectively.⁹ There exists many different brands of braking systems on the market, and most of them comprise similar lining components, such as binders, fillers, reinforcing agents (fibers) and friction modifiers (abrasives and lubricants).¹⁰ The filler and fiber components as well as some additives are mainly metallic, whereas the binders and additives are carbonaceous.^{10,11} During braking, the friction between the pad and disc surfaces is used to convert the vehicle kinetic energy into heat, resulting in a significant alteration of the lining components and in a concomitant temperature increase.⁸ The temperature there can increase to $400 \text{ }^\circ\text{C}$ and locally it may reach up to 700 to $1000 \text{ }^\circ\text{C}$, depending on the testing or driving conditions.^{12–14} In this process, metallic particles in the nano- to micrometer range are generated, together with carbon-based particles stemming from the condensation of evaporated organic compounds.⁹ BWPs may have an impact on the environment and human health due to their composition and size. In particular, the nanoscale fraction of the BWPs could be preferentially retained in the vicinity of a roadway compared to larger more readily settleable materials. As such, the inhaled dose and exposure could be much higher than for larger particles. Traffic-related wear emissions are nowadays considered relevant to air quality policy development, however, for now, no specific regulations have been implemented.

More generally pertaining to human health, BWP emission leads to airborne (nano)particles for which the preferential entrance pathway is the respiratory tract. Besides their local impact on the lung epithelia, nanoparticles reaching the alveolar region may cross the air–blood barrier and accumulate in secondary organs.^{15,16} So far, a few studies have dealt explicitly with the toxicity of BWPs, and most of them were limited to *in vitro* assays and not focused on the nano-sized fraction. In general, it was found that their high content in transition metals and metallic compounds can generate various cytotoxic effects.^{17,18} With the A549 alveolar cell line, BWPs were shown to induce oxidative stress¹⁹ and to alter the tight junctions between the cells.¹⁸ On peripheral blood

lymphocytes, brake wear dust was found to cause chromosomal damage, which was likely produced by the metallic nanocrystals present in the dust.²⁰

Our present work focuses on pooled BWP samples collected from two testing center facilities in France and corresponding to different braking conditions. The objectives are to characterize the BWPs in terms of size and composition, and to isolate their nano-sized fraction by a combination of sonication, filtration and ultra-centrifugation techniques.²¹ The resulting nanoparticle dispersions in water are found to be stable over time and they are tested on a model of human bronchial epithelial cells (Calu-3). As a result, a short-term loss of viability associated with reactive oxygen species generation is observed. The nano-sized fraction is found to exhibit lower toxicity and reactive oxygen species production than BWPs. In terms of effective doses, however, the toxicity levels are indeed similar, suggesting that, under the conditions of the study, the cytotoxicity is particle size-independent.

Materials and methods

Brake wear particle collection

BWPs were obtained from two different sources, a motor vehicle testing center operating on light-duty vehicles and a test bench working with an automotive brake dynamometer. In the latter case, the dynamometer is equipped with an environmental chamber, *i.e.* the brake system is operating in close mode. In both facilities, the brake wear dust was collected in a similar manner. The wheel was dismantled and the brake system opened. The dust was harvested in a 50 mL Falcon tube using a clean and sterile spatula. The disc and pad surfaces were not scrapped in the procedure. For the dust coming from transport vehicles, different types of driving conditions were realized, including tests with anti-lock braking and traction control systems, park assists, wipers and accessories on different road surfaces. These multiple driving conditions allow retrieving a representative mixture of BWPs emitted by the current European car fleet and under real-life driving cycles. In both facilities, the dust was harvested on a regular basis and pooled with previously collected samples. As a result, it comprised both newly generated fresh particles and particles that aged in the braking systems and were hence subjected to oxidation or decomposition.¹⁹ The workers collecting the samples were trained to minimize contamination during the operation.

Brake wear particle characterization

X-ray fluorescence analysis. BWP elemental analysis was carried out using X-ray fluorescence spectrometry. The as-received samples were deposited on a low absorption prolene membrane and analyzed on an Epsilon 3XL (Panalytical) spectrometer equipped with a silver X-ray tube. The analysis was performed using the Omnian software which detects and quantifies elements from sodium to uranium.

Thermogravimetric analysis. Thermogravimetry was performed with a LABSYS evo thermogravimetric analyzer

(Setaram Instrumentation, Caluire-et-Cuire, France) under a helium atmosphere. Approximately 50 mg of the as-received BWPs were placed in an alumina crucible and the temperature was raised from 30 °C to 1500 °C at a rate of 5 °C per minute.

Scanning electron microscopy. Scanning electron microscopy was performed on BWPs without metallization using a Zeiss SUPRA 40V SEM-FEG microscope (Oberkochen, Germany). The microscope was operated using an in-lens secondary electron detector working with a 2 kV acceleration tension and a 2–3 mm working distance.

Optical microscopy. Phase-contrast images were acquired using an IX73 inverted microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipped with 20×, 40×, and 60× objectives. Seven microliters of a dispersion were deposited on a glass plate and sealed into a Gene Frame (ABgene Advanced Biotechnologies, Hamburg, Germany) dual adhesive system.²² An EXi Blue camera (QImaging, Surrey, Canada) and Meta-view software (Universal Imaging Inc., Bedford Hills, USA) were used as the acquisition system. ImageJ software was used for scale bars (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Brake wear dispersion and characterization

Nanoparticle dispersion. BWPs were suspended in water at 1 mg mL⁻¹, vortexed and sonicated for 1 to 10 minutes at maximum power (10.7 W) using a cup-horn-equipped sonicator (Branson Ultrasonics, Shanghai, China). For each assay, 7 vials each containing 2 mL of the suspension were placed in the cup and sonicated over time. This procedure was optimized to establish a reliable protocol, in particular concerning the particle size, charge and long-term stability. In the second phase, the protocol was repeated to produce large volumes of dispersions required for the physico-chemical and toxicological studies. To separate the nano-sized fraction, the dispersions were hereafter filtered with a syringe equipped with 0.45 μm Nalgene™ polyethersulfone membranes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Light scattering. Scattering intensities (I_s) and hydrodynamic diameters (D_H) were measured using Zetasizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom). A 4 mW He–Ne laser beam ($\lambda = 633$ nm) was used to illuminate sample dispersion and the scattered intensity was collected at an angle of 173°. The second-order autocorrelation function was analyzed using the CONTIN algorithm to determine the average diffusion coefficient (D_C) of the scatterers. The hydrodynamic diameter was calculated according to the Stokes–Einstein relation, $D_H = k_B T / 3\pi\eta D_C$, where k_B is the Boltzmann constant, T the temperature and η the solvent viscosity.^{22,23}

Zeta potential. Laser Doppler velocimetry was used to carry out the electrokinetic measurements of electrophoretic mobility and zeta potential with the Zetasizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom). Light scattering and zeta potential measurements were performed in triplicate at 25 °C after an equilibration time of 120 s.²⁴

Transmission electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray. The BWP nano-sized fraction was characterized by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL 2010 microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) operating at 200 kV with a LaB6 filament and equipped with an Orius CCD camera (Gatan Inc., Warrendale, PA, USA). Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX, PGT) investigations were performed to determine the elements from a single nanoparticle. To avoid parasitic contribution from copper on the EDX spectra, a molybdenum TEM grid and a beryllium sample holder were used. TEM image analysis was performed with ImageJ software, and the size distributions were obtained from $n = 200$ particles. The distributions were adjusted using a log-normal function, leading to the measurement of the median diameter and dispersity.²⁵

Toxicological studies

Cell culture. The human lung epithelial cell line Calu-3 has been shown to be a relevant target for the study of airborne particles on the respiratory tract.²⁶ Calu-3 cells (ATCC, HTB-55™, Manassas, VA, USA) were grown at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere in EMEM (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Eurobio, Les Ulis, France) and 1% non-essential amino acids (Sigma Aldrich). Cells were trypsinized once a week (trypsin–EDTA, Sigma Aldrich). Passages 25 to 29 were used.

WST-1 assays. Calu-3 cells were seeded at 40 000 cells per well in 96-well plates. On the second day, cells were exposed for 24 h to BWPs and to their nano-sized fraction at increasing concentrations between 1 to 100 μg cm⁻², corresponding to weight concentrations of 3 to 300 μg mL⁻¹. The cell viability was measured using the WST-1 assay performed using the cell proliferation reagent WST-1 (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol. The experiments were performed in duplicate following the protocols developed by Vietti and coworkers.²⁷ After treatment removal, cells were rinsed twice with HBSS (Hank's balanced salt solution, Invitrogen, Waltham, USA). The first plate was incubated with WST-1 dilution (1:10) in cell culture medium for 30 min, whereas the second one was treated with Triton X100 (0.1 wt%) for 15 min before WST-1 addition. This second plate was used to evaluate potential interferences of adsorbed/internalized particles with WST-1. The absorbance signal reflecting the cell viability (mitochondrial activity) was measured at 450 and 630 nm with an ELx808 microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, United States). The optic density at 630 nm was subtracted from the value at 450 nm to obtain the final signal.

Reactive oxygen species (ROS). Calu-3 cells were seeded at 40 000 cells per well in a 96-well plate. Cells were first rinsed with HBSS and then loaded with a 25 μM solution of CM-DCFH₂DA (Molecular Probes, Eugene, United States) in HBSS for 45 min at 37 °C. Following a washing step with HBSS, cells were incubated with treatment for 0.5, 1, 2 and 4 h. Fluorescence was measured with a FlexStation® 3 multi-

mode microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, United States) at 485/535 nm. The fluorescence background at 535 nm was subtracted from the fluorescence signal at 485 nm. A positive control consisting of *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) and H₂O₂ dilutions at 50 μm in cell culture medium was used according to the manufacturer's protocol.

Cytokine release. Calu-3 cells were seeded and treated under the same conditions as above. Supernatants were recovered and centrifuged (3000g, 4 °C) after treatment for the quantification of IL-6, IL-8 and TNF-α release in cell culture medium by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). The absorbance signal reflecting cytokine release was measured at 450 and 630 nm with an ELx808 microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, United States). The optical background density (OD) at 630 nm was subtracted from OD at 450 nm to obtain the final signal.

Results and discussion

Brake wear particle characterization

The BWP samples collected from passenger vehicles and from an automotive brake dynamometer have the appearance of a fine black powder (Fig. 1a). The BWPs were characterized

using different techniques including thermogravimetry, X-ray fluorescence, optical and scanning electron microscopy (Fig. 1). Fig. 1b shows thermogravimetry data obtained between room temperature and 700 °C. The mass variation reveals an initial 6% decrease that is attributed to the loss of bound water around 100 °C and to the degradation of the carbon-based binder, resin and additives. This amount is lower than expected, as binders in brake pads are known to account for 20–40% of the lining material. This result could be explained by the heat generated during braking that leads to high temperature and to the thermal degradation of the carbonaceous materials.^{9,13,14}

At the micrometer length scale, the particle size distribution was studied using phase-contrast optical microscopy. Fig. 1c highlights the presence of contrasted particles in the range 200 nm–10 μm, with the distribution peaking at 1.47 μm (median value) and a dispersity of 0.47 (ESI† Fig. S1). Particles larger than 10 μm were also found but in a smaller proportion. The insets in Fig. 1c display close-up views of particles or aggregates of increasing size and contrast. X-ray fluorescence spectrometry was used to determine the BWP elemental composition (Fig. 1d). The technique reveals 18 different elements at a level above 0.1%, including the most

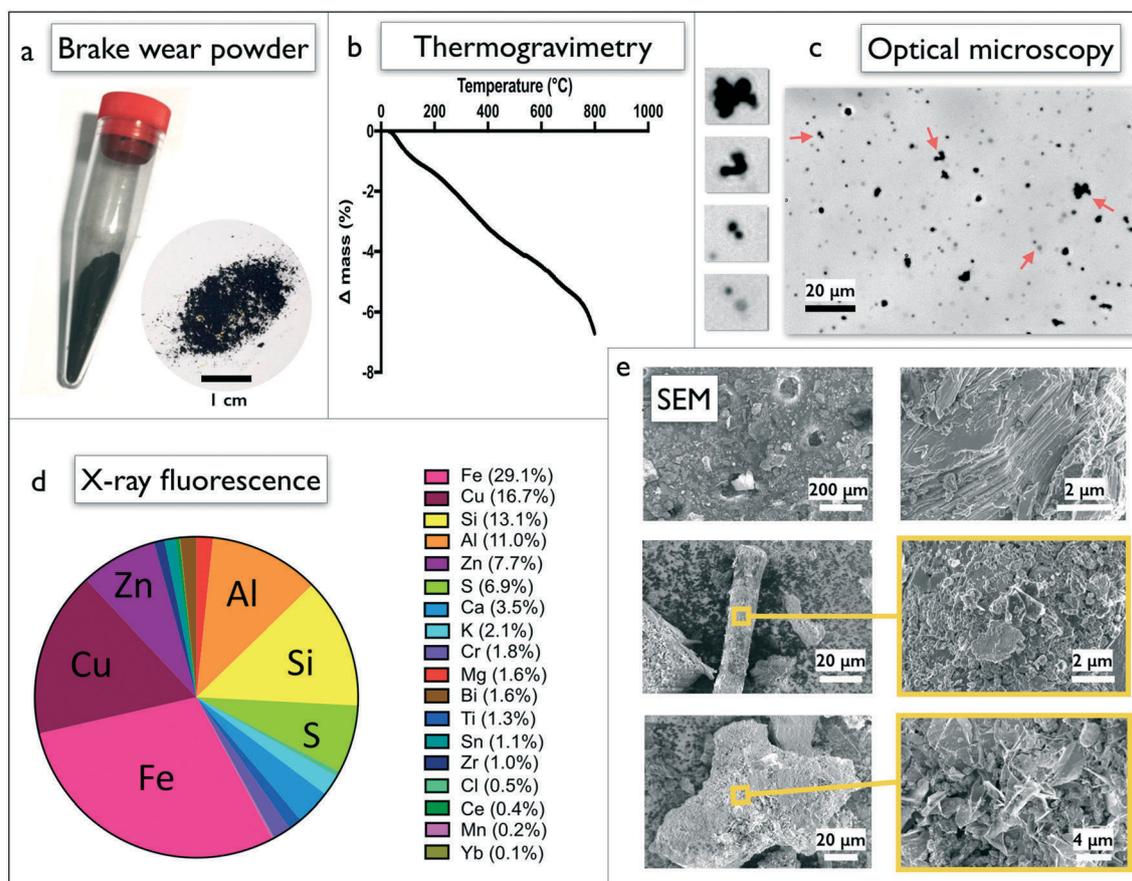


Fig. 1 Brake wear particle characterization. (a) BWP sample obtained from a motor vehicle testing center operating on commercial transport vehicles. BWP composition was characterized using thermogravimetry analysis measured in a helium atmosphere (b) and X-ray fluorescence for elemental analysis (d). To evaluate the size and morphology of the wear particles, optical (c) and scanning electron (e) microscopy were performed. The insets in (c) are $7 \times 8 \mu\text{m}^2$ fields.

prominent ones such as iron (Fe, 29%), copper (Cu, 17%), silicon (Si, 13%), aluminum (Al, 11%), zinc (Zn, 8%) and sulfur (S, 7%). The proportions and compositions obtained are consistent with those known for low and semi-metallic brake pads and drums typical for the European market.^{7–9,11,19} They are also in line with the data obtained for the dynamometer test bench BWPs, indicating the weak impact of environmental driving conditions on the studied specimens (ESI† Fig. S2). The outcomes confirm the presence of metals such as iron, copper and zinc which are known to induce toxicity to living cells. We also note that antimony was not found from the elemental results and that barite was not used as a filler in the brake pad formulations studied. Scanning electron microscopy (Fig. 1e) reveals that, at the micro- and nanoscale, the BWPs display a wide range of sizes and morphologies.^{19,20,28–30} The left-hand side images show fine particles with sharp edges and rough surfaces, as well as numerous pittings arising from material removal (arrows). Micron-size objects appear as shavings and fragments generated by metallic surface friction.⁷ At a sub-micron scale (right hand side panels), the surfaces have either platelet-packed solid structures or show a large number of smaller particles associated with the background debris. From these data, it is not clear whether the sub-micron particles adsorb during the braking and emission events or later during sample collection and treatment. For the separation and toxicity assays presented in the next sections, emphasis will be put on the BWPs from passenger vehicles. Data from the dynamometer test bench can be found in the ESI† (Fig. S2 and S3).

Sonication and separation of brake wear particles in water

SEM has shown the existence of sub-100 nm particles, and an important question pertaining to the toxicity assessment is that of the nano-sized fraction.³ Sonication is a well-known technique used to break particle aggregates as well as to im-

prove particle dispersibility. BWPs were dispersed in DI-water at 1 mg mL^{-1} , vortexed and sonicated as a function of the delivered sonication energy (DSE)^{31,32} under the conditions described in the Materials and methods section. The suspensions were then filtered through a $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ membrane and characterized by static and dynamic light scattering. Fig. 2a shows the scattered intensity (I_s) (upper panel) and the hydrodynamic diameter (D_H) (lower panel) against the DSE for filtered and non-filtered BWP dispersions.²² Prior to sonication, the dispersions exhibit a strong scattering intensity and diameters larger than $1 \text{ }\mu\text{m}$, in agreement with the optical and electron microscopy results. In contrast, the filtered solution has a much weaker scattering, about 400 times smaller, indicating that, as anticipated, filtration did remove most of the suspended particles. With increasing DSE, the scattering intensity increases and displays a saturation plateau. In parallel, the diameter decreases and levels off at 165 nm . The corresponding autocorrelation functions $g^{(2)}(t)$ obtained from dynamic light scattering exhibit a quasi-exponential decay associated with a unique relaxation mode²³ and a distribution that refines with increasing DSE (Fig. 2b). Note that at the highest input energy, the intensities for filtered and unfiltered dispersions are close to each other, suggesting that sonication was able to redisperse most of the particles. With a zeta potential of -26 mV , electrokinetic measurements confirmed that the brake wear nanoparticles are negatively charged and that their stabilization is ensured by electrostatic interactions (Fig. 2c). We also found that the surface charge does not depend on the sonication energy. The previous experiments were repeated in the presence of bovine serum albumin (BSA) proteins at 1 g L^{-1} to evaluate whether the adsorbed macromolecules could improve the dispersion stability. The figures in the ESI† (Fig. S4) show that BSA has no significant effect on the particle dispersibility, even at a long term (>1 month). To determine the proportion of nanoparticles in the BWP samples, the dispersions were

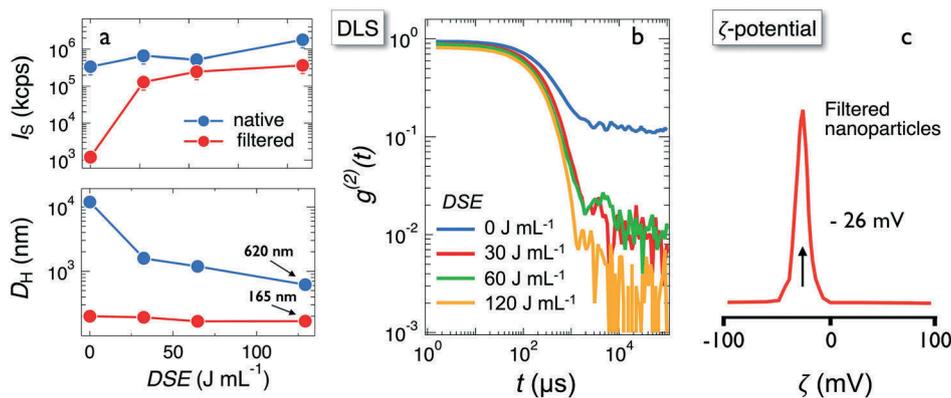


Fig. 2 Characterization of the brake wear particles before and after sonication and filtration. (a) Scattering intensity (upper panel) and hydrodynamic diameter (lower panel) measured by light scattering on 1 mg mL^{-1} sonicated BWP dispersions as a function of the delivered sonication energy (DSE).^{31,32} In the configuration used, a one-minute sonication translates into a total input energy of 30 J mL^{-1} . (b) Second-order autocorrelation functions of the scattered intensity for the filtered solutions in (a). With increasing DSE, the dispersity indexes (PDI) were 0.28, 0.29, 0.20 and 0.16, respectively. (c) Intensity distribution as a function of the zeta potential ζ for the sonicated and filtered dispersions showing that the BWP nanoparticles are negatively charged.

evaporated in an oven and the residual dry matter was weighed, revealing that $26 \pm 1\%$ of the initial BWPs is indeed made up of nanoparticles. This percentage is consistent with the static light scattering results in Fig. 2a.

Brake wear nano-sized fraction: determination of size, shape and composition

The BWP nano-sized fraction was further characterized by transmission electron microscopy coupled with X-ray dispersive energy spectroscopy. As shown in Fig. 3a and b, nanoparticles have sizes ranging between 50 and 150 nm and a broad range of morphologies. The most abundant elements are copper and iron, which is in good agreement with the X-ray fluorescence data. Interestingly, EDX spectra from different brake wear nanoparticles show the presence of one dominant metal per particle, with traces of others, indicating that the particles were generated from different parts of the pads and drums. Examples are provided in the ESI† (Fig. S5) for iron, silicon, zirconium, tin, bismuth and titanium. Fig. 3c displays a size distribution peaking at 66 nm (median value) and characterized by a dispersity of 0.50. Studied at different times after sonication, the BWP nanoparticles were found to be stable over time, with hydrodynamic diameters remaining constant over a month (Fig. 3d). In cell culture medium, it was found that the nano-sized fraction slowly destabilizes as a function of time, giving rise to the formation of aggregates.³³ Here, aggregation is primarily due to the adsorption of proteins and/or biological molecules at the particle surfaces that modify the interaction between particles. From being repulsive in DI-water, the interaction becomes attractive in the presence of salt or proteins, leading to particle

destabilization.^{34–36} Fig. S6† displays the autocorrelation function and the size distribution after a 24 h incubation at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. The data in the ESI† exhibit three relaxation modes: the first one is associated with the initial particle size (160 nm, 12%), and the second and third modes are associated with medium (320 nm, 78%) and large (1200 nm, 10%) aggregates. Here, the percentages in parenthesis indicate the frequency of each contribution. These results will be exploited later in the manuscript to determine the effective dose administered to the cells using a recently developed *in vitro* sedimentation, diffusion and dosimetry model.^{31,32} To conclude, we combined sonication and filtration to separate the BWP nano-sized fraction from the original dust. This protocol will be now applied to *in vitro* toxicity assessment studies.

Biological effects of brake wear particles and their nano-sized fraction on Calu-3 cells

The toxicity of BWPs and their nano-sized fraction was investigated on human bronchial epithelial cells (Calu-3).²⁶ The cytotoxicity was assessed using the WST-1 mitochondrial activity assay³⁷ for concentrations of 1 to $100 \mu\text{g cm}^{-2}$. After a 24 h exposure, the cell viability was found to decrease with the applied dose for both samples (Fig. 4a). However, the BWPs exhibited a stronger effect, the viability being reduced by 81% at $100 \mu\text{g cm}^{-2}$, and this value becoming 35% for the nanoparticle dispersion. Zhao *et al.* observed that some brake wear samples reduce the viability of A549 alveolar cells, and that the decrease was comparable to that of ours.¹⁹ Exposing the same cell line to an aerosol of freshly produced BWPs, however, Gasser *et al.* did not notice any significant effect.

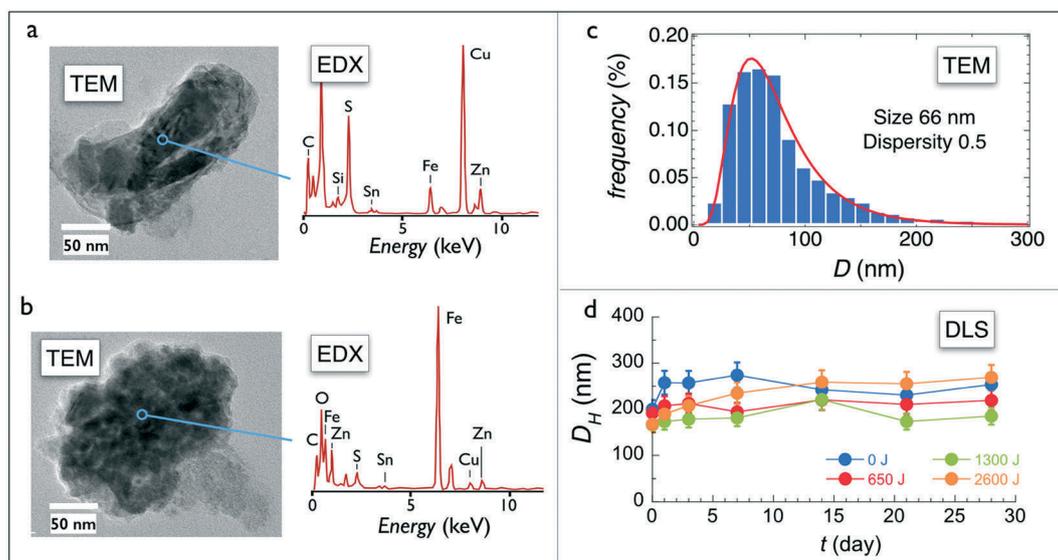


Fig. 3 Composition, size and stability of the brake wear nano-sized fraction. (a and b) Left: TEM images of the brake wear nanoparticles; right: EDX spectra of the particle region shown in the blue circles. (c) Size distribution determined from TEM on the filtered particles. The median value is 66 nm and the dispersity is 0.50. (d) Hydrodynamic diameter as a function of the time for brake wear nanoparticle dispersions at increasing sonication energies. In the four instances, the particles are stable as the diameter remains unchanged for the period.

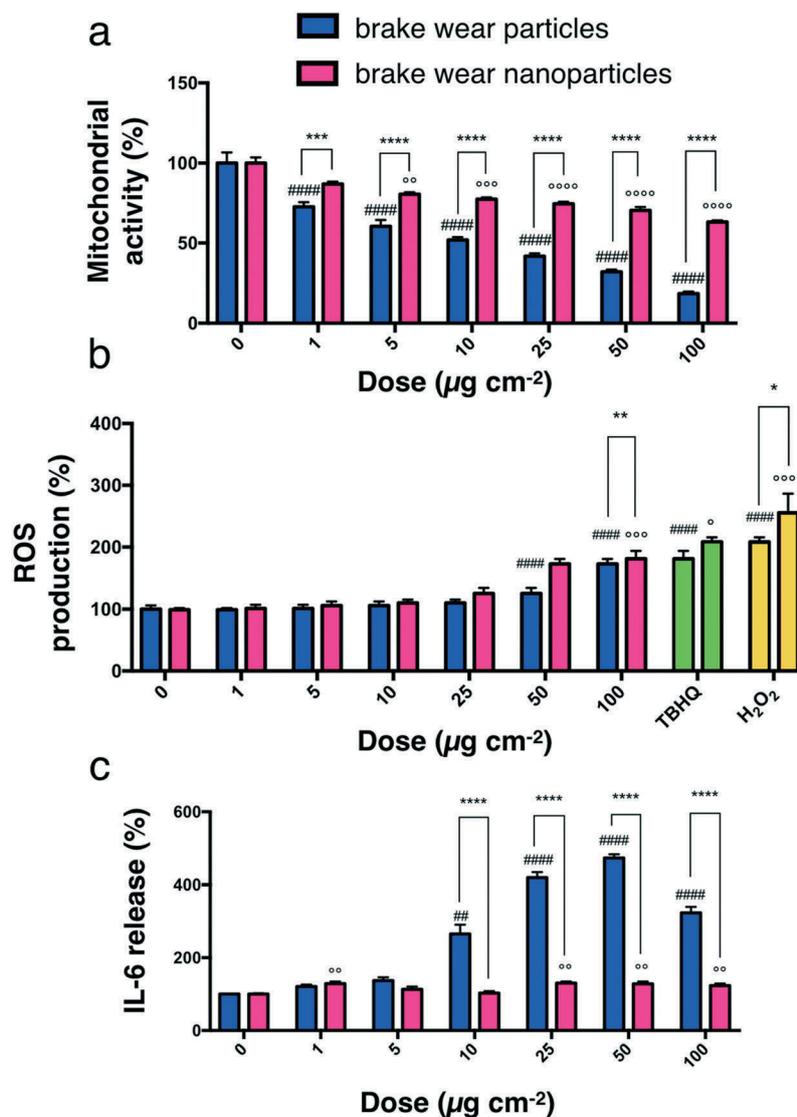


Fig. 4 Biological effects of the brake wear particles and their nano-sized fraction on Calu-3 cells. Calu-3 cells were exposed to BWPs and to their nano-sized fraction at concentrations ranging from 1 to 100 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (corresponding to weight concentrations in the supernatant of 3 to 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$). (a) Mitochondrial activity reflecting cell viability was assessed using the WST-1 assay after 24 h of exposure. (b) Reactive oxygen species production was detected by DCFH probe oxidation after 4 h of exposure. (c) IL-6 cytokine release measured by ELISA was used to characterize the pro-inflammatory response after a 24 h exposure. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Dunnett's post-test to compare the effects of particles with no exposure. The symbols (#) and (°) refer to the BWPs and to their nano-sized fraction, respectively. Two-way ANOVA complemented by the Holm-Sidak post-test was performed to compare the BWP size effects (*).

This apparent discrepancy could be due to the different plating techniques used, the cells being grown on inserts providing a denser epithelium compared to the conditions in plates, leading to a lower particle dose per cell.¹⁸

With BWPs being mainly composed of metal compounds (as shown in Fig. 1), this loss of viability may be related to the oxidative stress arising from the imbalance between intracellular oxidants and anti-oxidant molecules.³⁸ Metallic ions can generate ROS through the Fenton reaction for transition metals and by depleting thiol anti-oxidant molecules such as glutathione.² The intracellular redox state was assessed using the DCFH-DA probe that exhibits green fluorescence upon oxidation. A time-course study over 4 hours revealed a time-

dependent increase of the DCF fluorescence in cells treated with either BWPs or with their nano-sized fraction. The fluorescence signal remains however lower than that of positive H_2O_2 and T-BHQ controls (ESI† Fig. S7). Fig. 4b displays the ROS production as a function of the dose following a 4 h incubation together with the controls. Both BWPs and nanoparticles exhibit a similar behavior, with a nearly two-fold increase at the highest dose. These results are in fair agreement with those of the literature for A549 cells treated under the same conditions.¹⁸

The ability of BWPs to induce a pro-inflammatory response was characterized by evaluating the release of the IL-6, IL-8 and $\text{TNF}\alpha$ cytokines after a 24 h exposure (Fig. 4c).

While the BWP IL-8 and TNF α releases were not significantly modified (Fig. S8 \dagger), the IL-6 release was found to be dose-dependent, with a deviation seen already at 10 $\mu\text{g cm}^{-2}$, *i.e.* at the concentration where cell viability is reduced by 50%. At the highest dose, the IL-6 release shows a 5-fold increase compared to the control. The situation is different for the nano-sized fraction for which IL-6 and IL-8 signals remain dose-independent and similar to the control. The toxicity, ROS production and pro-inflammatory response results in Fig. 4 reveal an overall lower toxicity for the brake wear nanoparticles compared to that of the initial fraction. We have checked whether this extra toxicity could be due to the soluble fraction that is present in the BWP dispersions (and not in the nanoparticle dispersions) and may contain harmful metallic ions. The cytotoxicity of the soluble fraction was evaluated by the WST-1 assay and revealed a weak decrease of viable cells by 10% at the highest concentration, suggesting that the solubilized ions do not contribute significantly to the observed phenomenon (Fig. S9 \dagger).

From the above results, the nano-sized fraction appears hence to be less toxic than BWPs. However the comparison was made on the basis of the nominal concentrations and not on the effective delivered concentrations. To examine this issue, we have applied the *in vitro* sedimentation, diffusion and dosimetry (ISDD) model recently developed by DeLoïd and coworkers to improve dose metrics methodologies.^{31,32} According to the ISDD model, the doses administered to the cells depend primarily on the particle sizes and on their densities. For the brake wear nanoparticles, we based our calculations on the light scattering data in Fig. S5 \dagger as suggested by the model. For the BWPs, we used the size determined from optical microscopy (Fig. S1 \dagger), with the light scattering data not being reliable for micron-size particles. The results of the ISDD simulations shown in the ESI \dagger (Fig. S10) include the time dependencies of the deposited fraction and bottom concentration, and the concentration gradients in the well. It was found that the micron-size BWPs sediment rapidly and that the delivered dose reaches 79% after 24 h of exposure. For the nanoparticles, in contrast, the dose delivered to the cells was estimated to reach 7% of the nominal dose under the same conditions. Considering the effective doses, the mitochondrial activity results in Fig. 4 can be re-interpreted. At 50 $\mu\text{g cm}^{-2}$, for instance, the effective dose for nanoparticles at 24 h is around 4 $\mu\text{g cm}^{-2}$ and the cell viability is 70%. For the BWPs, an effective dose of 4 $\mu\text{g cm}^{-2}$ corresponds to a nominal dose of 5 $\mu\text{g cm}^{-2}$, for which the cell viability is 60%, so close to that of the previous value. In conclusion, the differences seen in the cell viability for regular BWPs and for their nano-sized fraction are mainly due to dosimetric effects, demonstrating that BWPs are toxic, but the nano-sized fraction does not display extra toxicity. Similar findings have been identified for the pro-inflammatory response, whereas the ROS-producing nanoparticles exhibit a more pronounced effect (ESI \dagger Fig. S11). Altogether, these data suggest that under the conditions of the study, the brake wear macro- and nanoparticles exhibit similar cytotoxicity. We can speculate

that the underlying mechanisms leading to cell death could be different, as indicated by the difference in ROS production.

Conclusion

We have shown that BWPs emitted from low-metallic brake pads used in passenger cars and coming from two different sources have typical sizes in the micron range and contain metallic compounds, such as iron, copper, silicon, aluminum and zinc, in their crystalline and amorphous forms. Scanning electron microscopy indicates that the initial BWPs appear as fragments or debris made from a large number of sub-micron particles. To isolate these sub-micron particles, we set up a combination of sonication, centrifugation and filtration techniques. The first significant conclusion that emerges from this work is that the nano-sized fraction represents around 26% by mass of the initial brake wear dust. The nanoparticles are also broadly distributed, with size ranging between 50 and 400 nm. Their toxicity was assessed on human bronchial epithelial cells. The second important result is that BWPs display short-term toxicity and we do not find any enhanced effect from the nano-sized fraction. These results show finally the interest in isolating this fraction of brake wear dust and characterizing its *in vitro* behavior, in particular in the cell culture medium for accurate dosimetry and toxicity assessment.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors thank DIM (Domaine d'Intérêt Majeur) Nano-K of Region Île-de-France for funding C. Puisney's PhD thesis at the University Paris-Diderot. ANR (Agence Nationale de la Recherche) and CGI (Commissariat à l'Investissement d'Avenir) are acknowledged for their financial support of this work through Labex SEAM (Science and Engineering for Advanced Materials and devices) ANR 11 LABX 086 and ANR 11 IDEX 05 02. We acknowledge the ImagoSeine facility (Jacques Monod Institute, Paris, France), and the France BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04, « Investments for the future »). This research was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche under the contract ANR-13-BS08-0015 (PANORAMA) and ANR-12-CHEX-0011 (PULMONANO).

References

- 1 R. D. Brook, S. Rajagopalan, C. A. Pope, J. R. Brook, A. Bhatnagar, A. V. Diez-Roux, F. Holguin, Y. L. Hong, R. V. Luepker, M. A. Mittleman, A. Peters, D. Siscovick, S. C. Smith, L. Whitsel and J. D. Kaufman, *Circulation*, 2010, **121**, 2331–2378.
- 2 M. Valko, K. Jomova, C. J. Rhodes, K. Kuca and K. Musilek, *Arch. Toxicol.*, 2016, **90**, 1–37.

- 3 V. Stone, M. R. Miller, M. J. Clift, A. Elder, N. L. Mills, P. Moller, R. P. Schins, U. Vogel, W. G. Kreyling, K. A. Jensen, T. A. Kuhlbusch, P. E. Schwarze, P. Hoet, A. Pietroiusti, A. De Vizcaya-Ruiz, A. Baeza-Squiban, C. L. Tran and F. R. Cassee, *Environ. Health Perspect.*, 2017, **125**, 106002.
- 4 F. R. Cassee, M. E. Heroux, M. E. Gerlofs-Nijland and F. J. Kelly, *Inhalation Toxicol.*, 2013, **25**, 802–812.
- 5 J. H. J. Hulskotte, H. A. C. D. van der Gon, A. H. Visschedijk and M. Schaap, *Water Sci. Technol.*, 2007, **56**, 223–231.
- 6 N. Hooftman, L. Oliveira, M. Messagie, T. Coosemans and J. Van Mierlo, *Energies*, 2016, **9**, 84.
- 7 T. Grigoratos and G. Martini, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2015, **22**, 2491–2504.
- 8 J. Kukutschova, P. Moravec, V. Tomasek, V. Matejka, J. Smolik, J. Schwarz, J. Seidlerova, K. Safarova and P. Filip, *Environ. Pollut.*, 2011, **159**, 998–1006.
- 9 J. Kukutschova, V. Roubicek, M. Maslan, D. Jancik, V. Slovak, K. Malachova, Z. Pavlickova and P. Filip, *Wear*, 2010, **268**, 86–93.
- 10 A. Thorpe and R. M. Harrison, *Sci. Total Environ.*, 2008, **400**, 270–282.
- 11 P. G. Sanders, N. Xu, T. M. Dalka and M. M. Maricq, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, **37**, 4060–4069.
- 12 B. D. Garg, S. H. Cadle, P. A. Mulawa, P. J. Groblicki, C. Laroo and G. A. Parr, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 4463–4469.
- 13 A. Iijima, K. Sato, K. Yano, M. Kato, K. Kozawa and N. Furuta, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, **42**, 2937–2942.
- 14 T. P. Newcomb, *Wear*, 1980, **59**, 401–407.
- 15 A. Nel, T. Xia, L. Madler and N. Li, *Science*, 2006, **311**, 622–627.
- 16 G. Oberdörster, E. Oberdörster and J. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.*, 2005, **113**, 823–839.
- 17 J. Wahlström, *PhD Thesis*, University of Stockholm, 2011.
- 18 M. Gasser, M. Riediker, L. Mueller, A. Perrenoud, F. Blank, P. Gehr and B. Rothen-Rutishauser, *Part. Fibre Toxicol.*, 2009, **6**, 30.
- 19 J. Zhao, N. Lewinski and M. Riediker, *Aerosol Sci. Technol.*, 2015, **49**, 65–74.
- 20 A. Kazimirova, P. Peikertova, M. Barancokova, M. Staruchova, J. Tulinska, M. Vaculik, I. Vavra, J. Kukutschova, P. Filip and M. Dusinska, *Environ. Res.*, 2016, **148**, 443–449.
- 21 B. Kowalczyk, I. Lagzi and B. A. Grzybowski, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2011, **16**, 135–148.
- 22 F. Mousseau, R. Le Borgne, E. Seyrek and J.-F. Berret, *Langmuir*, 2015, **31**, 7346–7354.
- 23 V. Torrisi, A. Graillot, L. Vitorazi, Q. Crouzet, G. Marletta, C. Loubat and J.-F. Berret, *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 3171–3179.
- 24 E. K. Oikonomou, F. Mousseau, N. Christov, G. Cristobal, A. Vacher, M. Airiau, C. Bourgaux, L. Heux and J. F. Berret, *J. Phys. Chem. B*, 2017, **121**, 2299–2307.
- 25 L. Qi, J. P. Chapel, J. C. Castaing, J. Fresnais and J.-F. Berret, *Soft Matter*, 2008, **4**, 577–585.
- 26 I. George, S. Vranic, S. Boland, A. Courtois and A. Baeza-Squiban, *Toxicol. In Vitro*, 2015, **29**, 51–58.
- 27 G. Vietti, S. Ibouaadaten, M. Palmi-Pallag, Y. Yakoub, C. Bailly, I. Fenoglio, E. Marbaix, D. Lison and S. van den Brule, *Part. Fibre Toxicol.*, 2013, **10**, 52.
- 28 H.-G. Namgung, J.-B. Kim, S.-H. Woo, S. Park, M. Kim, M.-S. Kim, G.-N. Bae, D. Park and S.-B. Kwon, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 3453–3461.
- 29 K. Adachi and Y. Tainosho, *Environ. Int.*, 2004, **30**, 1009–1017.
- 30 M. Mosleh, P. J. Blau and D. Dumitrescu, *Wear*, 2004, **256**, 1128–1134.
- 31 G. DeLoid, J. M. Cohen, T. Darrach, R. Derk, L. Rojanasakul, G. Pyrgiotakis, W. Wohlleben and P. Demokritou, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 3514.
- 32 G. M. DeLoid, J. M. Cohen, G. Pyrgiotakis and P. Demokritou, *Nat. Protoc.*, 2017, **12**, 355–371.
- 33 M. Safi, J. Courtois, M. Seigneuret, H. Conjeaud and J.-F. Berret, *Biomaterials*, 2011, **32**, 9353–9363.
- 34 G. Ramniceanu, B. T. Doan, C. Vezignol, A. Graillot, C. Loubat, N. Mignet and J. F. Berret, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 63788–63800.
- 35 A. Galimard, M. Safi, N. Ould-Moussa, D. Montero, H. Conjeaud and J. F. Berret, *Small*, 2012, **8**, 2036–2044.
- 36 B. Chanteau, J. Fresnais and J.-F. Berret, *Langmuir*, 2009, **25**, 9064–9070.
- 37 M. Delaval, W. Wohlleben, R. Landsiedel, A. Baeza-Squiban and S. Boland, *Arch. Toxicol.*, 2017, **91**, 163–177.
- 38 B. Crobeddu, L. Aragao-Santiago, L. C. Bui, S. Boland and A. Baeza Squiban, *Environ. Pollut.*, 2017, **230**, 125–133.

Supporting Information

Brake wear (nano)particle characterization and toxicity on airway epithelial cells *in vitro*

C. Puisney^{1,2*}, E.K. Oikonomou², S. Nowak³, A. Chevillot³, S. Casale⁴, A. Baeza-Squiban^{1*} and J.-F. Berret^{2*}

Outline

Figure S1 – Size distribution from BWP found on commercial transport vehicles

Figure S2 – Characterization of brake wear powder

Figure S3 – Size distribution from BWP collected from an automotive brake dynamometer

Figure S4 – Light scattering data for BWP dispersed and sonicated with proteins

Figure S5 – Complementary TEM images and EDX spectra from brake wear nanoparticles

Figure S6 – Dynamic light scattering results in cell culture medium

Figure S7 – Reactive oxygen species production in Calu-3 cells

Figure S8 – IL-6 and TNF α release by Calu-3 cells exposed to BWP or its nanosize fraction

Figure S9 – Cell viability of Calu-3 cells exposed either to particles or the soluble fraction

Figure S10 – Cell viability of Calu-3 cells exposed either to particles or the soluble fraction

Corresponding authors: chloe.puisney@univ-paris-diderot.fr, baeza@univ-paris-diderot.fr, jean-francois.berret@univ-paris-diderot.fr

Supporting Information Figure S1 – Size distribution from BWP found on commercial transport vehicles

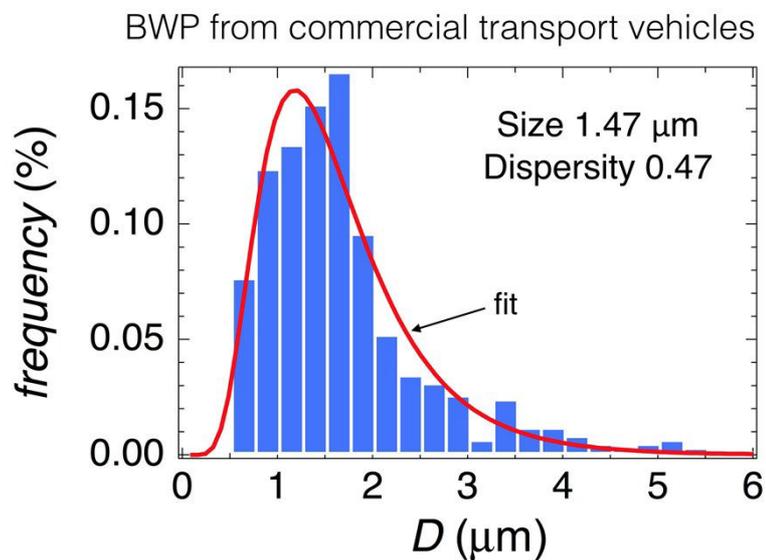


Figure S1: Distribution of particle detected by optical microscopy obtained from a motor vehicle testing center operating on light duty vehicles. The fitting curve is given by a log-normal function.

Supporting Information Figure S2 – Characterization of brake wear powder

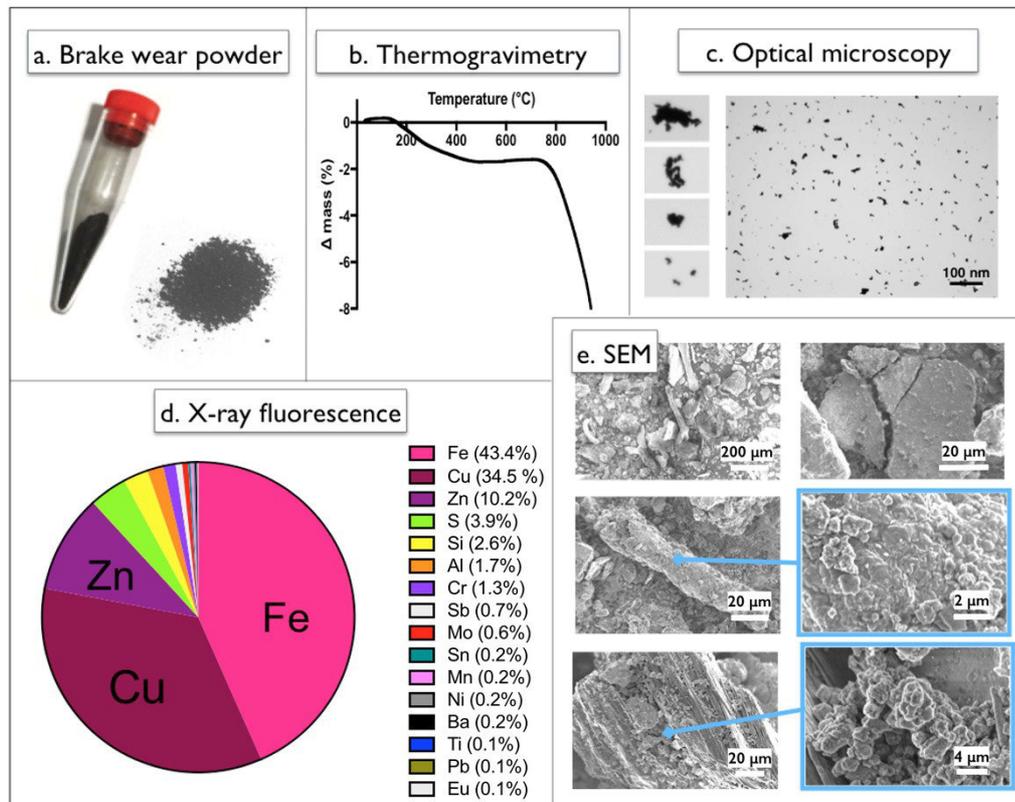


Figure S2: Characterization of brake wear powder originating from an automotive brake dynamometer

a) Brake wear powder sample obtained from an automotive brake dynamometer for pad and drum testing. BWP composition was characterized using thermogravimetry analysis (b) and X-ray fluorescence for elemental analysis (d). Note that for the sample coming from the motor vehicle testing center, the iron and copper proportions were 29% and 17% respectively, whereas the values here are 43 and 34 %. Moreover, this brake pad formulation contained Sb and Mo, most probably in form of sulfides (since content of S is 3.9%). Content of Ba (0.2%) suggests that Ba was not used as a filler. To evaluate the size and morphology of the wear particles optical (c) and scanning electron (e) microscopy were performed. The insets in c) are $24 \times 40 \mu\text{m}^2$ fields.

Supporting Information Figure S3 – Size distribution from BWP collected from an automotive brake dynamometer

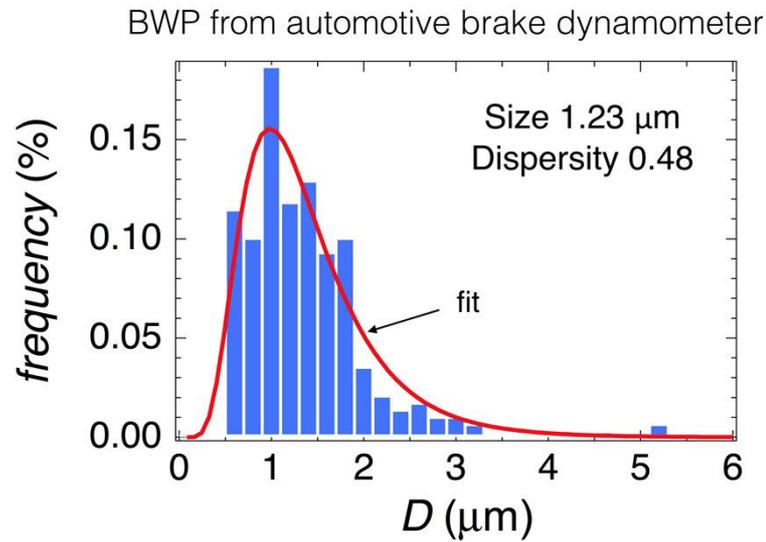


Figure S3: Distribution of particle detected by optical microscopy obtained from an automotive brake dynamometer for pad and drum testing. The fitting curve is given by a log-normal function.

Supporting Information Figure S4 – Light scattering data for BWP dispersed and sonicated with proteins

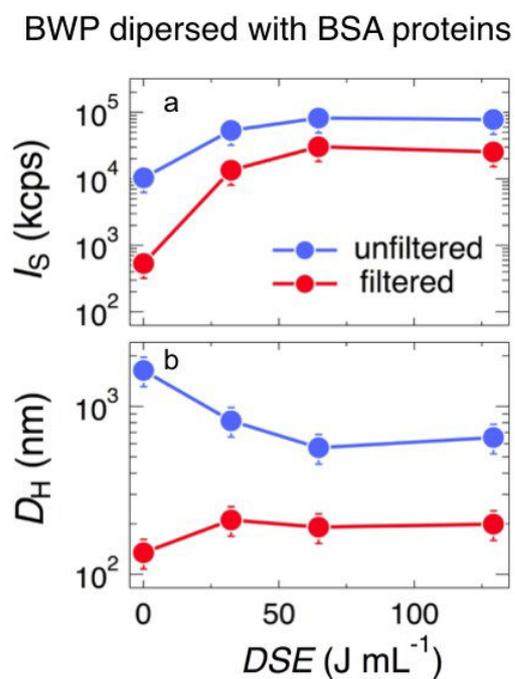


Figure S4: a) Scattering intensity and b) hydrodynamic diameter measured by light scattering of BWP particles dispersed in a $1 g L^{-1}$ BSA solution as a function of the sonication delivered sonication energy DSE . In the configuration used, a one-minute sonication translates into a total input energy of $30 J mL^{-1}$.

Supporting Information Figure S5 – Dynamic light scattering in cell culture medium (EMEM)

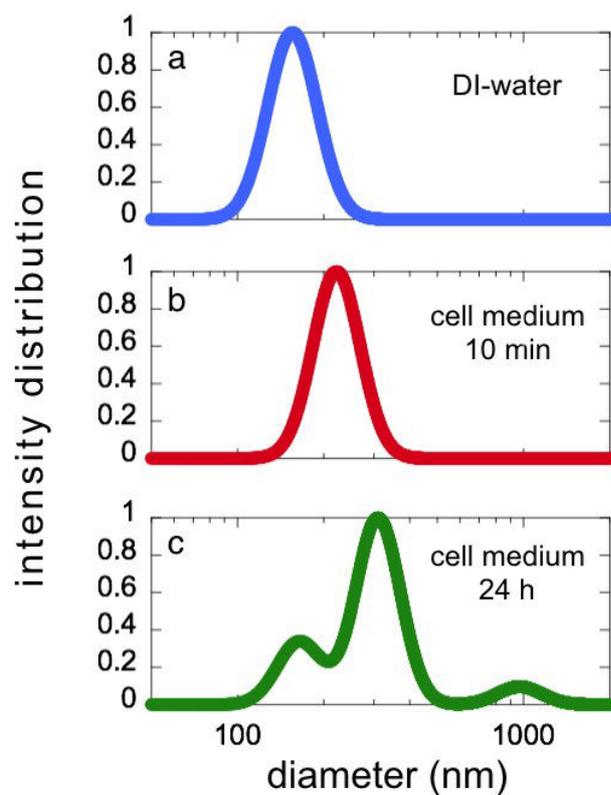
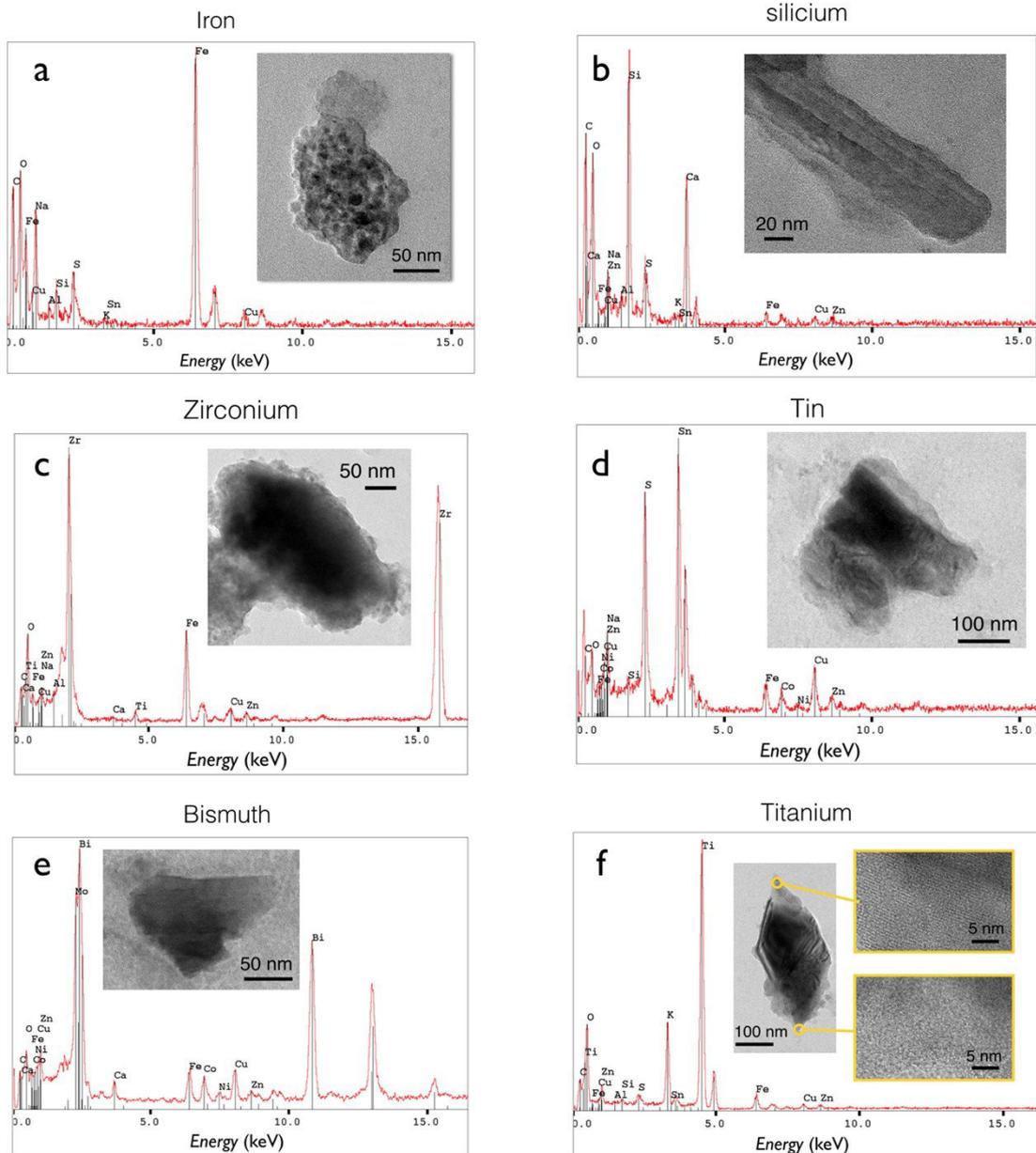


Figure S5: Intensity distributions for the BWP nano-sized fraction in DI-water (a) and in cell culture medium (EMEM) at 10 min (b) and 24 h (c). The maxima at 24 h are at 170 nm, 320 nm and 1000 nm.

Supporting Information Figure S6 – Complementary TEM images and EDX spectra from brake wear nanoparticles



Fi

Figure S6: a-f) EDX spectra from different brake wear nanoparticles showing that elemental composition underlines the presence of only one type of atoms per particle, indicating that the particles are generated from different parts of the braking component. Examples of particles containing iron (a), silicon (b), zirconium (c), tin (d), bismuth (e) and titanium (f) are provided.

Supporting Information Figure S7 - Reactive oxygen species production in Calu-3 cells

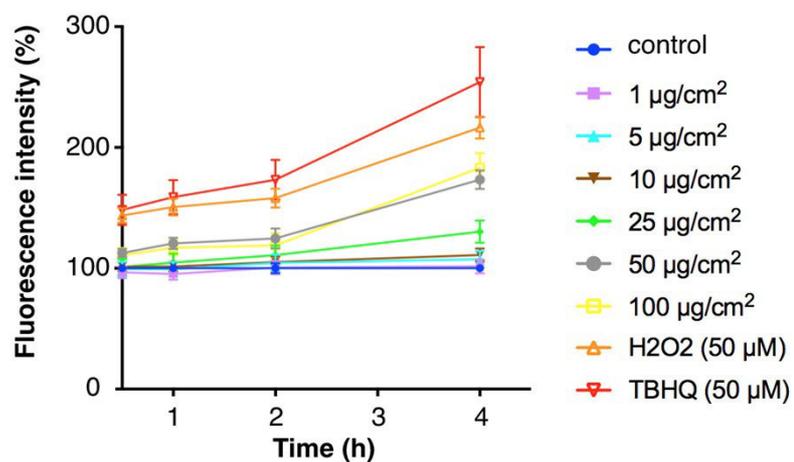


Figure S7: Reactive oxygen species production was detected by DCFH probe fluorescence in Calu-3 cells exposed for 4 h to BWP from 1 to 100 µg cm⁻². H₂O₂ and TBHQ were used as positive controls

Supporting Information Figure S8 – IL-6 and TNF α release by Calu-3 cells exposed to BWP or its nanosize fraction

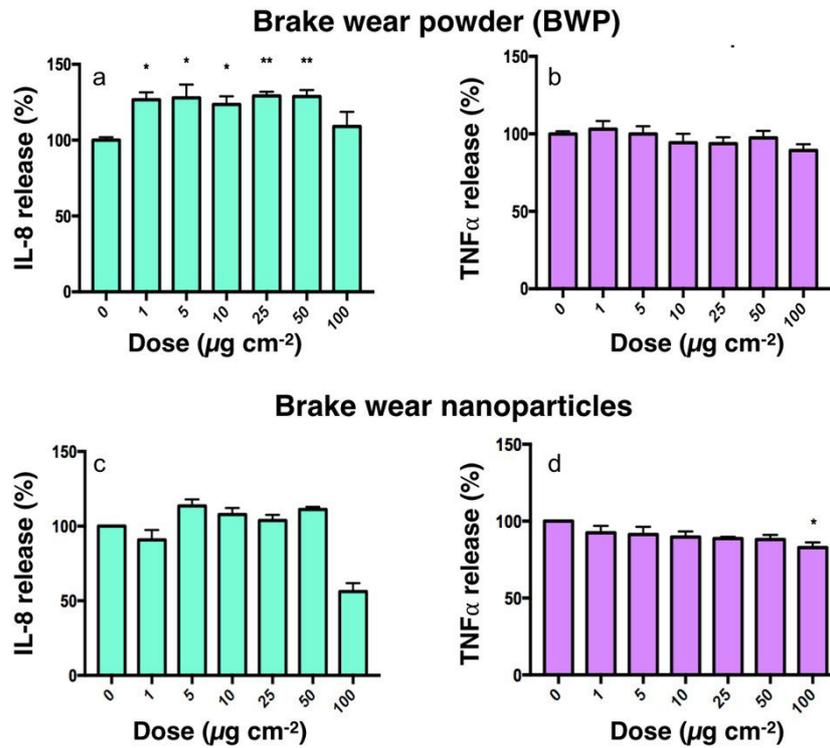


Figure S8: IL-8 and TNF α cytokine release by Calu-3 cells exposed for 24 h to BWP and its nanosize fraction at different concentrations. Cytokine measured by ELISA was used to characterize the pro-inflammatory response after a 24 h exposure. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA and Dunett's post-test to compare particles effects with no exposure. The symbols (#) and (°) refer to the BWP and to its nanosize fraction respectively. Two-way ANOVA complemented by Holm-Sidak post-test was performed to compare the BWP size effects (*).

Supporting Information Figure S9 - Cell viability of Calu-3 cells exposed either to particles or the soluble fraction

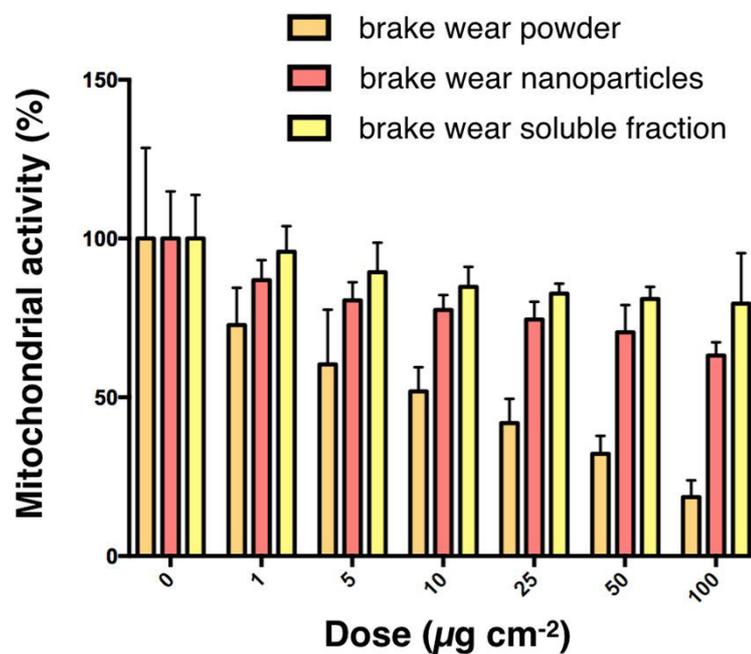


Figure S9: Cell viability of Calu-3 cells exposed for 24h to different concentrations of BWP, their nanosize fraction and the corresponding soluble fraction. Mitochondrial activity reflecting cell viability was assessed using WST-1 assay. The soluble fraction was the supernatant recovered after BWP sonication, filtration and centrifugation.

Supporting Information Figure S10 – Application of the in vitro sedimentation, diffusion and dosimetry model to the brake wear nano- and microparticles

Dosimetry simulation for 1.47 μm BWP particles

Input variables used in the simulation	Unit	Values
Solvent dynamic viscosity	Pa s	0.000783
Density of media	g cm^{-3}	1.0091
Temperature	$^{\circ}\text{C}$	37.0
Density of raw material	g cm^{-3}	5.02
Diameters (d_{0M}) of each existing particle/agglomerate species	μm	1.47
Fractions of agglomerate species	..	1
Agglomerate effective density	g cm^{-3}	1.4
Height of suspension column	mm	3
Initial total concentration of material	mg cm^{-3}	0.1
Total time of simulation	h	2
Height of subcompartment (simulation element)	mm	0.001

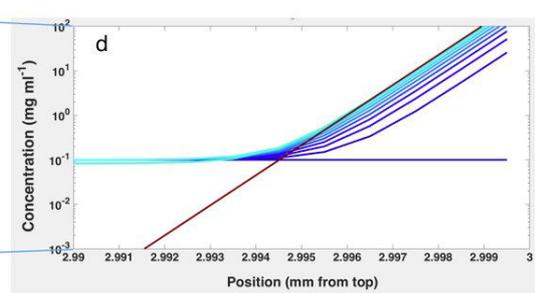
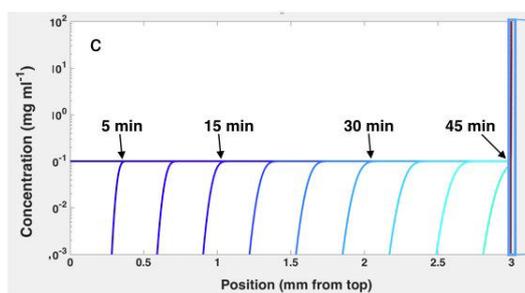
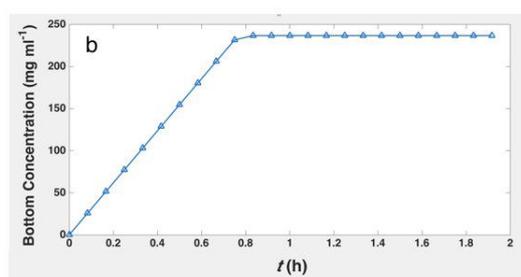
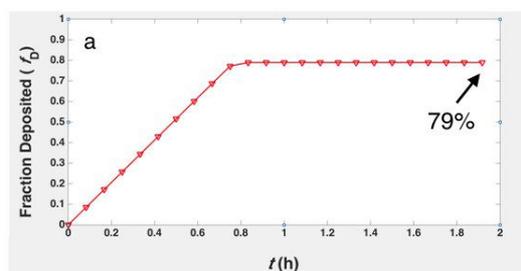


Figure S10A: Table - List of input parameters injected in the in vitro sedimentation, diffusion and dosimetry model reported by DeLoid and coworkers (DeLoid G.M. et al. Nat. Protoc. 2017, 12, 355-371) for 1.5 μm brake wear particles. The size distribution refers to the data from Fig. S1. **a)** The fraction of deposited particles as a function of the time. It was found that after 45 min of incubation the dose delivered to the cells saturates at 79% of the total administered dose. **b)** Bottom concentration as a function of the time. The initial concentration in the dispersion was set at 0.1 g L^{-1} (corresponding to 1 mg cm^{-3} , see Table). **c and d)** Time evolution of the concentration as a function of the position in the sample. The abscissa 3 mm represents the bottom of the cell culture well. The kinetics shows that the sedimentation occurs rapidly, the concentration profiles stabilizing after 45 min. Note that in d) the abscissa has been expended from 2.99 to 3 mm to emphasize that most particles are at the bottom of the well.

Dosimetry simulation for the BWP nano-sized fraction

Input variables used in the simulation	Unit	Values
Solvent dynamic viscosity	Pa s	0.000783
Density of media	g cm^{-3}	1.0091
Temperature	$^{\circ}\text{C}$	37.0
Density of raw material	g cm^{-3}	5.02
Diameters (dH) of each existing particle/agglomerate species	nm	170 / 320 / 1000
Fractions of agglomerate species	..	0.13 / 0.68 / 0.19
Agglomerate effective density	g cm^{-3}	1.4
Height of suspension column	mm	3
Initial total concentration of material	mg cm^{-3}	0.1
Total time of simulation	h	24
Height of subcompartment (simulation element)	mm	0.001

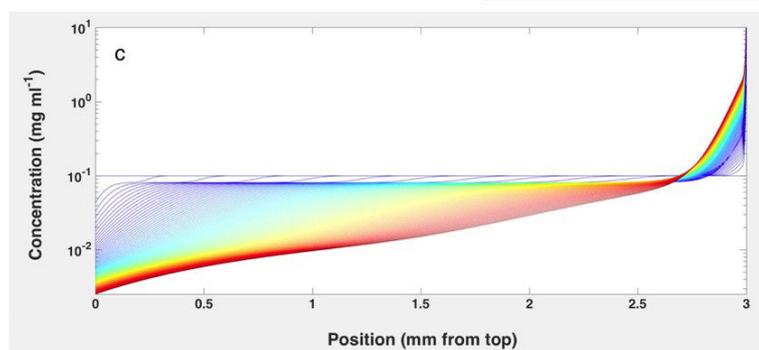
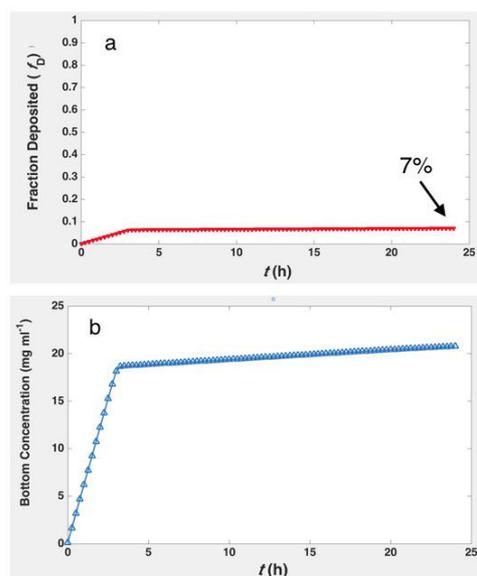


Figure S10B: Table - List of input parameters injected in the *in vitro* sedimentation, diffusion and dosimetry model reported by DeLoid and coworkers (DeLoid G.M. et al. Nat. Protoc. 2017, 12, 355-371) for the brake wear nano-sized fraction. The size distribution refers to the light scattering data in Fig. S5c. **a)** The fraction of deposited particles as a function of the time shows a saturation around 7% of the total administered dose after 24 h. **b)** Bottom concentration as a function of the time. The initial concentration in the dispersion was set at 0.1 g L^{-1} (corresponding to 1 mg cm^{-3}). **c and d)** Time evolution of the concentration as a function of the position in the sample. The abscissa 3 mm represents the bottom of the cell culture well. The different colored curves correspond to different snapshots of gradient concentration.

Supporting Information Figure S11 – Rescaling toxicity assays with the effective dose

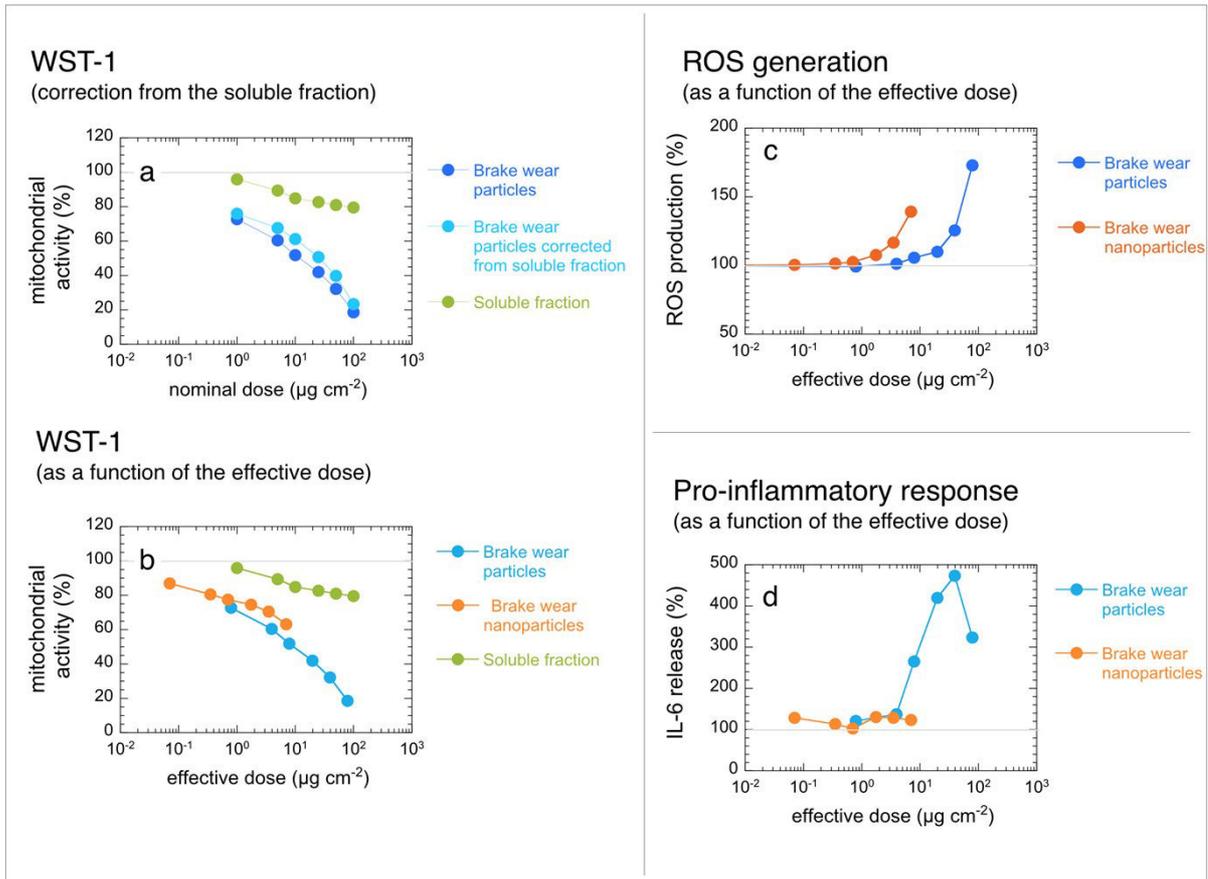


Figure S11: a) Cell viability of BWP particles corrected from the soluble fraction. b) Mitochondrial activity of brake wear nano- and macroparticles expressed as a function of the effective dose. c) Reactive oxygen species production detected by DCFH probe oxidation after 4 h exposure *versus* effective concentration for BWP and its nano-sized fraction. d) Same as in c) for the IL-6 cytokine release measured by ELISA after a 24 h exposure.

3. Résultats complémentaires

La poudre d'usure des freins récupérée auprès des deux fournisseurs a subi une batterie de tests physicochimiques dont la plupart sont présentés dans l'article. Cependant des analyses complémentaires ont été réalisées et sont présentées ci-après. Ainsi, une analyse par diffraction X de la poudre des freins a été réalisée permettant grâce à l'étude des caractéristiques cristallines d'avoir des précisions sur la composition de ces particules. Par ailleurs, une étude de l'effet d'incorporation de protéines sur la stabilité de la fraction nanoparticulaire a été réalisée. Enfin, une mesure d'endotoxines a été réalisée afin d'écartier toute possibilité d'observation d'effets pro-inflammatoires liés à ces contaminants d'origine bactérienne et non aux particules elles-mêmes.

a. Diffraction X

En parallèle des mesures effectuées en fluorescence X, qui permet de connaître la composition élémentaire d'un échantillon mais qui est limitée à des éléments compris entre le sodium et l'uranium), des analyses de diffraction X ont été réalisées car elles permettent d'accéder à la structure cristalline.

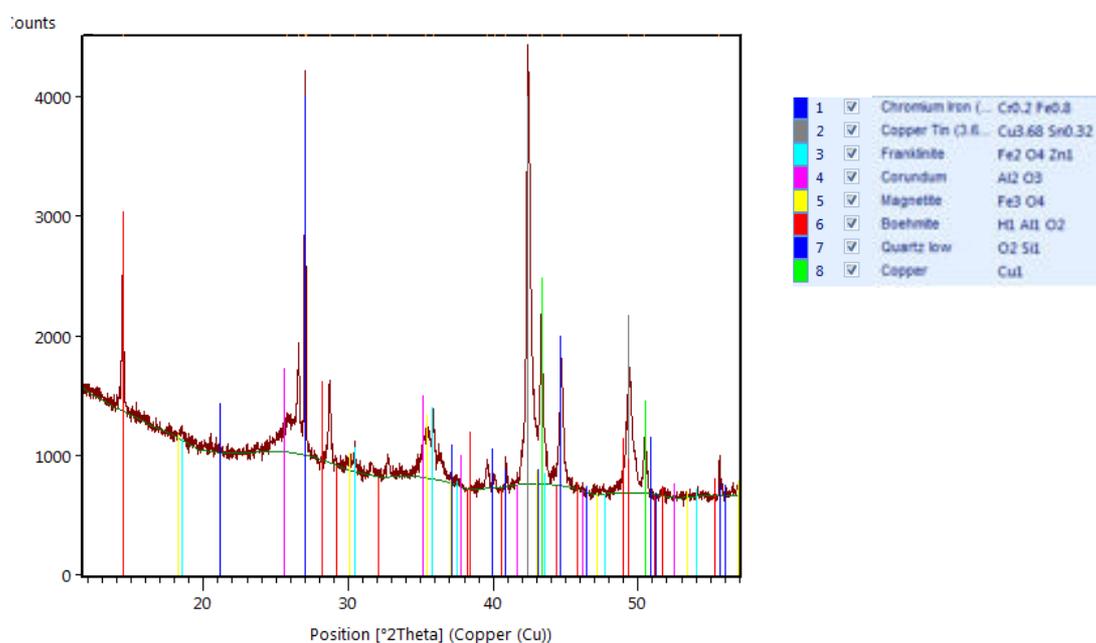


Figure III.2 : Analyse de la poudre d'usure des freins collectée sur dynamomètre par diffraction X Chaque composé est identifiable par des raies d'absorption spécifiques signalées par différentes couleurs reprises en légende

L'analyse par diffraction X de l'échantillon récupéré sur dynamomètre fait apparaître qualitativement des éléments comme le cuivre et des minéraux comme le quartz, la bohémite, la magnétite, le corindon, la franklinite, du bronze, un alliage fer-chrome.

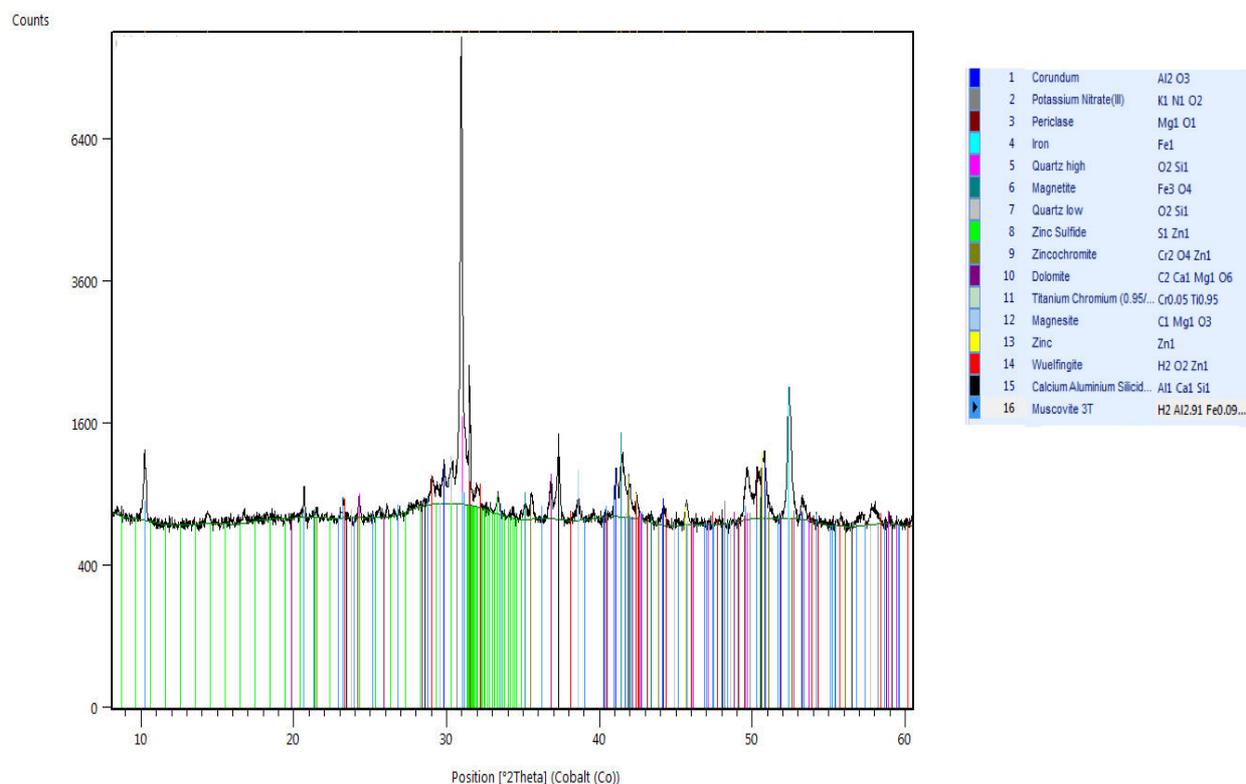


Figure III.3 : Analyse de la poudre d'usure des freins collectée sur véhicule entier par diffraction X Chaque composé est identifiable par des raies d'absorption spécifiques signalées par différentes couleurs reprises en légende.

L'analyse par diffraction X de l'échantillon récupéré sur véhicule entier fait apparaître que le mélange est très complexe. Par ailleurs, la présence élevée en quartz rend l'analyse difficile. Des éléments communs avec ceux retrouvés après collecte sur dynamomètre restent cependant identifiables comme le corindon ou la magnétite.

b. Effet de l'incorporation de protéines sur la stabilité des particules en milieu aqueux

Afin de trouver les meilleures conditions pour assurer la stabilité des suspensions nanoparticulaires, nous avons comparé celles-ci dans l'eau ou bien en incorporant des protéines comme la sérum albumine bovine ou une mucine porcine. Les protéines ont chacune été introduites à la concentration de 1 mg/mL à la suspension de poudre, puis nous avons procédé à la sonication et filtration pour sélectionner la fraction nanoparticulaire.

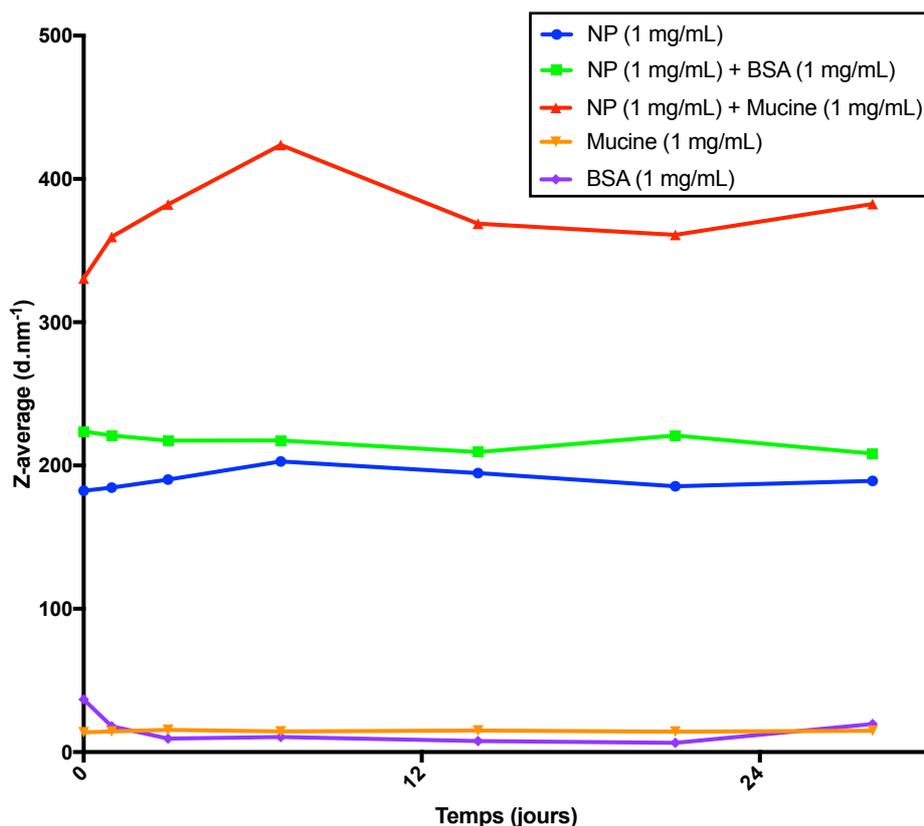


Figure III.4 : Impact de l'introduction de protéines dans le milieu de suspension sur la stabilité des nanoparticules d'usure des freins. La stabilité a été évaluée par la mesure de la DLS à différents temps pendant 30 jours. Z-average correspond au diamètre moyen de la suspension particulaire.

Les résultats présentés Figure III.4 mettent en évidence que la présence de protéines, qu'il s'agisse de la sérumalbumine bovine ou de la mucine porcine, n'améliore pas la stabilité de la suspension nanoparticulaire. En effet, la suspension nanoparticulaire s'avère déjà stable en l'absence de protéines. Par contre, l'ajout de protéines entraîne une augmentation du diamètre moyen des particules en suspension alors qu'un processus préalable de sélection de la taille a été réalisé afin de travailler avec des particules les plus petites possibles.

c. Caractérisation physico-chimique et toxicologique des nanoparticules manufacturées d'oxyde de fer

En parallèle de l'étude des nanoparticules d'usure des freins, des nanoparticules manufacturées d'oxyde de fer (NPs- γ -Fe₂O₃) ont été utilisées au cours de notre étude. Il s'agissait de disposer d'un matériau de référence constitué de fer qui est l'élément le plus présent dans les particules d'usure. Ces NPs- γ -Fe₂O₃ sont moins complexes que les NPs-usure et sont disponibles en abondance permettant d'effectuer les développements méthodologiques

de cette étude. Il y a de plus un certain nombre d'études toxicologiques publiées dans la littérature sur des particules de cette composition.

Mise en suspension des nanoparticules manufacturées

Les NPs- γ -Fe₂O₃ sont des nanoparticules manufacturées commerciales constituées d'oxyde de fer, ayant un diamètre primaire de 50 nm. Afin de disperser au mieux ces nanoparticules dans le milieu de culture une étude de l'état d'agrégation en fonction du scénario de sonication a été entreprise. Les résultats de cette étude sont présentés en Figure III.5.

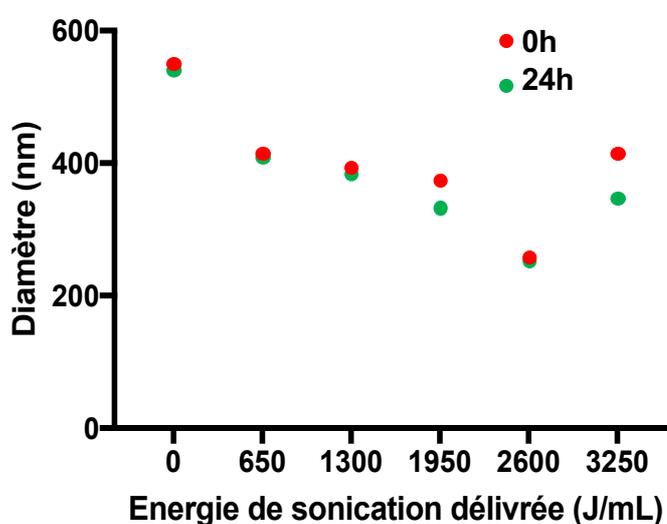


Figure III.5 : Détermination du scénario de sonication pour les NPs- γ -Fe₂O₃ afin d'obtenir une suspension nanoparticulaire stable. La variabilité des diamètres correspond aux variations entre le diamètre juste après la sonication et après 24h à 37°C.

Le but de l'étude présenté en Figure III.5 est de définir le scénario de sonication permettant d'obtenir une suspension nanoparticulaire la plus stable possible avec un diamètre le plus faible possible. En effet, il est possible de remarquer sur la Figure III.5 que les NPs- γ -Fe₂O₃ ont tendance à s'agréger dans le milieu de culture c'est pourquoi un contrôle du mode de mise en suspension est nécessaire afin de prédire au mieux le comportement des nanoparticules lors de leur mise en contact avec les cellules. Ainsi, il a été choisi de suspendre les nanoparticules dans l'eau grâce à une sonication de 2600 J/mL avant de les diluer dans le milieu de culture afin de remplir les critères préalablement décrits.

Etude toxicologique des nanoparticules manufacturées

De la même manière qu'après exposition aux nanoparticules d'usure des freins, les paramètres toxicologiques (viabilité cellulaire, stress oxydant et relargage d'IL-6) des cellules Calu-3 ont été étudiés après 24 heures d'exposition à différentes doses de NPs- γ -Fe₂O₃. Ainsi, comme pour les NPs-usure, la viabilité cellulaire a été étudiée par l'intermédiaire de l'activité mitochondriale. Puis, une étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène consécutive à une exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ a été réalisée. Enfin, un dosage du relargage d'IL-6 a été effectué afin d'indiquer la présence d'une réponse pro-inflammatoire. Les résultats des expérimentations décrites ci-avant sont présentés en Figure III.6.

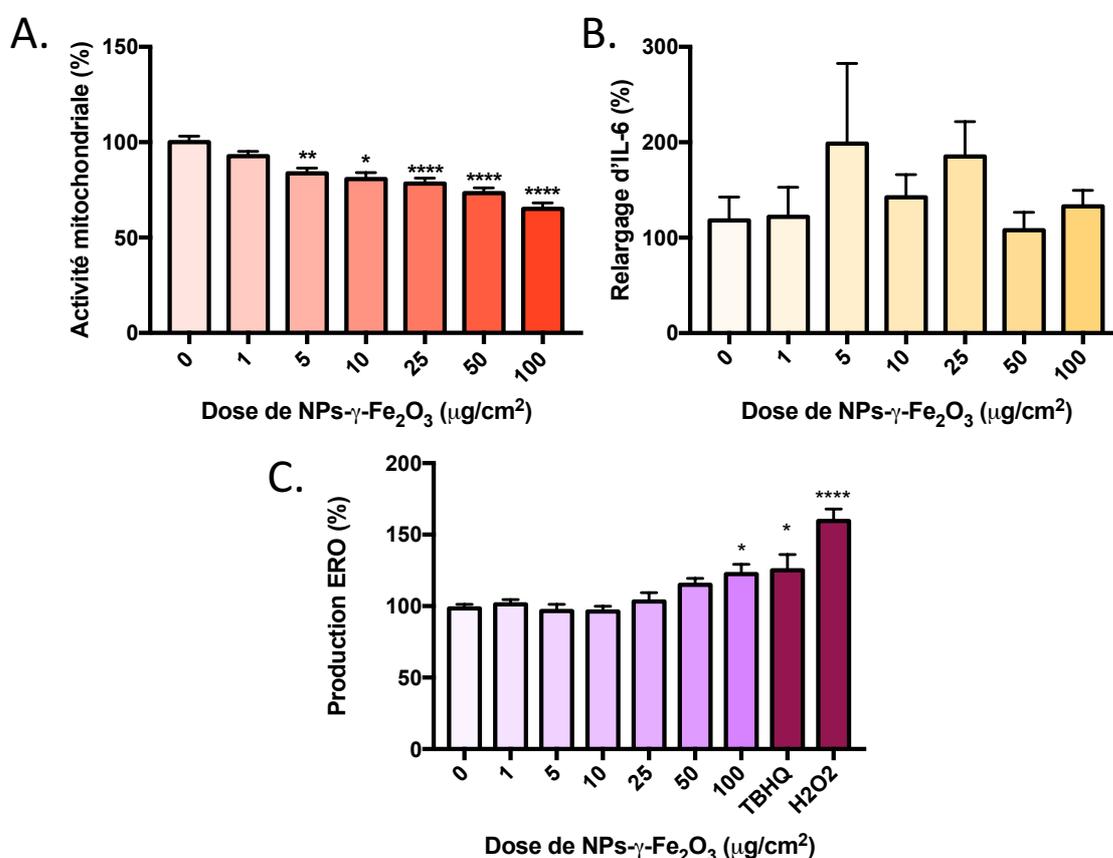


Figure III.6 : Etude des effets biologiques induits par les NPs- γ -Fe₂O₃ sur les cellules Calu-3.

6A : Etude de l'activité mitochondriale reflétant la viabilité cellulaire après 24 h d'exposition des cellules Calu-3 aux NPs- γ -Fe₂O₃. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (100%) (* : différence par rapport au témoin ; * : $p > 0,05$; ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$; Kruskal-Wallis ; $n=6$; $N=3$; Moyenne \pm SD)

6B : Etude du relargage d'IL-6 reflétant la réponse pro-inflammatoire après 24 h d'exposition des cellules Calu-3 aux NPs- γ -Fe₂O₃. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (100%) (Kruskal-Wallis ; $n=6$; $N=3$; Moyenne \pm SD)

6C : Etude de la production d'espèces réactives de l'oxygène reflétant le stress oxydant détectées par l'oxydation de la sonde DCFH₂DA après 4 h d'exposition des cellules Calu-3 aux NPs- γ -Fe₂O₃. Les

résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (100%). TBHQ (TerButyl-HydroQuinone) et H₂O₂ (Peroxyde d'hydrogène) constituent des témoins positifs. (ERO : Espèces Réactives de l'oxygène ; * : différence par rapport au témoin ; * : p>0,05 ; **** : p <0,0001 ; Kruskal-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SD)

Les mesures de viabilité entreprises sur les cellules Calu-3 après 24 heures d'exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ révèlent une toxicité dose dépendante de ces nanoparticules avec une baisse de viabilité de 46 % à la dose de 100 μ g/cm². C'est également pour cette dose que l'on observe une augmentation significative de la production d'espèces réactives de l'oxygène traduisant un stress oxydant qui ne se voit plus aux doses d'exposition plus faibles. Néanmoins, le stress oxydant et la diminution de la viabilité ne sont pas accompagnés d'une réponse pro-inflammatoire. En effet, il n'existe pas de différence significative pour le relargage d'IL-6 entre les cellules témoins et celles ayant été exposées 24 heures à différentes doses de NPs- γ -Fe₂O₃.

d. Mesure d'endotoxines

Afin de vérifier que les effets biologiques induits par les NPs- γ -Fe₂O₃ et les NPs-usure ne sont pas consécutifs à une contamination par les endotoxines, un dosage de ces composés a été entrepris. En effet, en cas de contamination par les endotoxines, les effets biologiques notamment de réponse pro-inflammatoire ne pourraient pas être considérés comme spécifiques des particules. Les résultats de ce dosage sont présentés dans le Tableau III.1.

Tableau III.1 : Dosage des endotoxines présentes dans les poudres testées

Identification	Dosage des endotoxines
Poudre d'usure des freins (1 mg/mL)	2,027 +/- 0,080 UI/mL
NPs-usure (1 mg/mL)	0,253 +/- 0,010 UI/mL
NPs- γ -Fe ₂ O ₃ (1 mg/mL)	0,059 +/- 0,055 UI/mL

Les résultats du dosage d'endotoxines suggèrent que les NPs- γ -Fe₂O₃ manufacturées sont exemptes d'endotoxines. Par ailleurs, si les particules d'usure semblent contaminées par des endotoxines, les NPs-usure en semblent exemptes suite à la sélection de la fraction nanoparticulaire. Il est possible d'expliquer cette contamination par le fait que les NPs-usure sont prélevées en milieu environnemental où les endotoxines sont omniprésentes. Cependant, malgré un dosage parfois positif d'endotoxines, aucune de ces particules n'induit de réponse pro-inflammatoire significative.

4. Discussion-Conclusion

Notre étude a été réalisée sur **des poudres d'usure de freins** provenant soit d'un dynamomètre soit de véhicules utilisés pour des tests en centre d'essais. La caractérisation physico-chimique des 2 types de poudre d'usure n'ayant pas montré de différences majeures, notre étude s'est principalement focalisée sur les particules d'usure des freins collectées sur véhicules (NPs-usure). Ces dernières proviennent de plusieurs types de véhicules et de systèmes de freinage sur lesquels différents scénarii de freinage ont été réalisés tels qu'un freinage brusque, un freinage prolongé, en ligne droite, en courbe, *etc.* Nous disposons ainsi d'un mélange de particules d'usure qui se rapproche des particules pouvant être rencontrées en réalité dans l'environnement urbain.

Nous avons mis en évidence que les deux échantillons de poudre d'usure des freins ont une composition principalement inorganique. En effet, les analyses de thermogravimétrie ont révélé une teneur en matière organique inférieure à 10%. Ces résultats étaient inattendus car les données disponibles sur la structure et la composition des plaquettes de freins (*cf* Chapitre I.1.c) montrent une présence abondante de composés organiques liés à la présence de composants carbonés dans les fibres, les liants et les lubrifiants qui représentent au moins 30% en masse de la garniture de frein. Notre hypothèse sur cette faible teneur en composés organiques est que les hautes températures (jusqu'à 600°C) atteintes lors du processus de freinage sont susceptibles d'entraîner la volatilisation des composés organiques (Kukutschova *et al.* 2011 ; Iijima *et al.* 2008).

Les deux échantillons de poudre d'usure des freins contiennent majoritairement du fer et du cuivre. Les analyses aux rayons X nous ont permis de déterminer la composition élémentaire et cristalline des poudres collectées. Elles ont permis de faire ressortir la présence majoritaire de fer et de cuivre dans le mélange. Les proportions globalement retrouvées en différents métaux sont en accord avec les compositions communes de garnitures de freins faiblement et semi-métalliques utilisées sur le marché européen (*Global Automobile Brake Pad Market Research Report 2017*). Cependant, la composition exacte des plaquettes de freins utilisées dans cette étude n'est pas accessible compte-tenu du secret industriel entourant leur fabrication.

Les poudres d'usure des freins présentent une morphologie très hétérogène et contiennent des nanoparticules. Le processus de freinage consiste en une friction violente des composants du système de freinage lors de la réduction de vitesse. Cette friction qui résulte en une abrasion décroche des morceaux de garniture entraînant la génération de

particules de tailles et formes très diverses que nous avons pu identifier par microscopie. La microscopie électronique à balayage a non seulement permis d'observer les marques d'abrasion sur la plupart des particules mais a surtout permis de constater que de nombreuses petites particules étaient présentes sur les plus grosses particules ou bien étaient enchâssées dans des réseaux de matériel friable. Il est difficile de déterminer si l'assemblage entre les petites particules et les plus grosses est lié à des interactions fortes ou bien résulte d'un simple dépôt lié à la préparation des échantillons pour la microscopie. Il est possible qu'il y ait des interactions magnétiques entre les particules. En effet, à l'approche d'un aimant sur le côté du tube contenant les particules d'usure, nous avons observé un arrangement géométrique de la poudre. Cependant, il est possible de s'interroger sur l'existence d'interactions plus complexes. C'est pourquoi, les processus d'interactions existant entre les différents types de particules présentent dans la poudre d'usure des freins nécessiteraient d'être approfondis. Néanmoins, ces observations ont démontré la présence de particules de taille nanométrique au sein de la poudre d'usure des freins.

Nous avons mis en place une procédure pour isoler la fraction nanométrique de la poudre d'usure des freins. Il n'existe pas de méthode d'extraction standardisée de nano-objets à partir de poudre. Nous avons comme contrainte une quantité limitée de poudre. Afin d'isoler la fraction nanométrique, nous avons opté pour une filtration à partir d'une suspension de poudre ayant fait l'objet d'une sonication. Différents temps de sonication ont été testés afin de trouver la durée et la puissance adéquates non seulement pour dissocier les NPs des grosses particules mais aussi pour obtenir une suspension stable dans le temps. A l'issue de la sonication puis filtration de la suspension sur membrane 0,45 μ m, nous avons vérifié la taille et la stabilité de la suspension nanométrique obtenue par mesure en DLS. Nous avons ainsi isolé des NPs d'un diamètre moyen de 68 nm, taille en accord avec celle des particules les plus petites que nous avons observées comme associées à de plus gros matériaux. Ainsi, la sonication a permis de disperser les particules et la filtration de sélectionner une fraction nanométrique dont la taille est centrée sur 68 nm mais dont l'étendue en taille s'étire de quelques nanomètres à environ 200 nm. Lors de la mise au point de ce protocole, nous avons réalisé les suspensions de poudre, la sonication et la filtration non seulement dans l'eau mais également en présence de protéines (serum albumine et mucines). Cependant nous avons constaté que la présence de protéines n'améliorait pas leur stabilité et conduisait à la formation de NPs de taille plus élevée probablement liée à la formation d'une corona protéique. Ainsi, afin d'éviter la formation d'une corona qui pourrait modifier les propriétés de surface des NPs-usure et atténuer leurs effets comme cela a déjà été montré

(Walkey *et al.* 2014), il a été décidé que les solutions stocks de NPs usure seraient préparées sans protéines. La stabilité des suspensions de NPs fait qu'elles sont utilisables jusqu'à 28 jours après extraction.

Nous avons déterminé que la fraction nanométrique représente 26% de la masse de la poudre. Les nanoparticules ici sélectionnées sont probablement celles que nous avons montrées comme associées aux plus grosses particules lors des observations de microscopie électronique de la poudre d'usure des freins. L'étape de sonication a permis de les décrocher puis la filtration de la suspension a permis de les sélectionner. A ce stade de nos travaux, nous ne savons pas si ces NPs s'associent aux plus grosses particules lors du processus de freinage ou bien si elles sont aéroportées. Elles nous ont paru associées aux grosses particules compte-tenu du mode de collecte que nous avons adopté. Toutefois des études de distribution par classe de taille de l'aérosol produit avec un dynamomètre ont montré l'existence d'une fraction nanométrique (Kukutschova *et al.* 2011).

La poudre issue de l'usure des freins et sa fraction nanométrique affectent la viabilité des cellules Calu-3 respectivement dès 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ces résultats ont pu être comparés avec les données de la littérature qui sont synthétisées dans le tableau III.2. Ainsi, une diminution de la viabilité a déjà été décrite lors de l'exposition de cellules épithéliales alvéolaires A549 à des particules d'usure des freins par Zhao *et al.* en 2015. Dans cette même étude, les particules d'usure testées provenaient d'un véhicule entier et avaient subi un processus d'oxydation lié à leur vieillissement ; ce qui est probablement le cas également pour les particules que nous avons collectées pour notre étude. Une diminution maximale de 75 à 80 % de viabilité est retrouvée à une dose comparable à celle que nous avons utilisée (Zhao *et al.* 2015). Par contre, ces mêmes cellules A549 n'ont pas été affectées lors de l'exposition à un aérosol de particules d'usure des freins fraîchement produit (Gasser *et al.* 2009). Ces différences peuvent être dues à plusieurs paramètres : i) la nature des particules en termes de types de plaquettes de freins et de procédure de collecte (particules âgées versus particules fraîchement générées) ii) des doses d'exposition différentes : la comparaison des doses avec nos conditions expérimentales est difficile à réaliser car Gasser a donné la concentration en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ sans préciser la fraction déposée iii) des modes de culture différents : cellules A549 cultivées en inserts (Gasser *et al.*, 2009) versus cellules cultivées en 2D sur plaques (Zhao *et al.* 2015, Puisney *et al.*, 2018) ce qui conduit à une densité cellulaire très différente. Sur insert les cellules se polarisent, deviennent plus hautes avec une surface apicale réduite et sont plus nombreuses par unité de surface que celles cultivées sur plaques qui ont tendance à s'étaler.

En conséquence pour une même dose d'exposition le nombre de particules/cellule est moindre sur insert.

Connaître la dose de particules appliquée par cellule est important car de celle-ci va dépendre l'induction des effets biologiques. C'est en particulier le cas pour les particules d'usure de freins car nous avons montré qu'il n'y avait pas d'effets de la fraction soluble suggérant que ce sont les interactions particules/cellules qui sont déterminantes pour la toxicité (*cf Figure S9 – Supplementary Informations Article*). Il nous est donc apparu essentiel de définir la dose déposée, et notamment pour approfondir notre interprétation de la différence de toxicité observée entre la poudre d'usure des freins et sa fraction nanoparticulaire lorsque l'on ne considère que les doses nominales de particules. C'est pourquoi, le modèle ISDD a été utilisé afin de déterminer les doses réellement délivrées au niveau des cellules. Une nouvelle comparaison des résultats après une normalisation en accord avec la dose a permis de révéler que les cytotoxicités correspondantes à la poudre d'usure des freins et à sa fraction nanoparticulaire sont similaires.

La poudre issue de l'usure des freins et sa fraction nanométrique induisent un stress oxydant dans les cellules Calu-3 aux doses provoquant une baisse importante de la viabilité cellulaire. Compte-tenu de la composition des particules d'usure de freins, il n'est pas surprenant de constater que la poudre et sa fraction nanoparticulaire induisent une augmentation de l'oxydation de la sonde DCFH₂DA traduisant ainsi une production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les cellules exposées. Nous n'avons pas étudié la spéciation des métaux dans les particules d'usure de freins mais l'observation d'un stress oxydant suggère que les métaux de transition comme le fer et le cuivre sont sous une forme compatible avec leur implication dans la réaction de Fenton (Valko *et al.* 2016). Par ailleurs, Zhao *et al.* ont réalisé des tests acellulaires démontrant le potentiel pro-oxydant de particules d'usure des freins comparables aux nôtres en termes de mode de prélèvement (Zhao *et al.* 2015). D'autre part Gasser *et al.* ont eux aussi démontré une augmentation de l'intensité de la fluorescence de la sonde DCFH₂DA après exposition de cellules A549 à un aérosol de particules d'usure des freins (Gasser *et al.* 2009). En prenant en compte, la composition majoritairement métallique des nanoparticules d'usure des freins, il est possible d'émettre l'hypothèse que la viabilité cellulaire est diminuée en raison d'un stress oxydant lié à un déséquilibre entre la présence de molécules anti-oxydantes et pro-oxydantes (Crobeddu *et al.* 2017). En effet, les ions métalliques peuvent générer des ERO via la réaction de Fenton tout en entraînant une déplétion des thiols anti-oxydants au niveau cellulaire.

La poudre issue de l'usure des freins et dans une moindre mesure sa fraction nanométrique, induisent le relargage de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 par les cellules Calu-3. Le potentiel pro-inflammatoire de ces particules semble donc être limité car il n'a pas été observé de relargage d'IL-8 et de TNF α . Une étude récente a pourtant montré l'augmentation du relargage d'IL-8 après exposition de cellules A549 aux particules d'usure des freins majoritairement organique sans amiante. Cependant, dans cette même étude, aucune modification du relargage d'IL-8 n'a été montrée dans le cas de l'exposition à des particules issues de freins faiblement métalliques dont la composition se rapproche des particules de notre étude (Barosova *et al.* 2018). La composition des particules de freins joue un rôle probable dans leur potentiel pro-inflammatoire. Nous avons dans nos échantillons constaté une contamination de la poudre par des endotoxines mais en quantité insuffisante pour induire réponse pro-inflammatoire importante.

La fraction nanométrique de la poudre issue de l'usure des freins induit un niveau de stress oxydant supérieur à celui retrouvé avec la poudre elle-même. Les études d'autres groupes n'ont pas montré de production d'espèces réactives de l'oxygène au contact de particules comparables. Cependant, les doses étudiées n'étaient pas les mêmes. Pour expliquer la différence retrouvée entre les résultats obtenus avec les particules d'usure des freins comparativement à la fraction nanométrique de ces dernières, il est possible de suggérer des différences d'internalisation et/ou de réactivité de surface (Fu *et al.* 2014).

Les effets cytotoxiques des NPs-usure s'observent à partir de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Différentes études ont estimé que les particules d'usure pouvaient contribuer au niveau ambiant de PM₁₀ à hauteur de 4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Grâce à cette estimation, Barosova *et al.* estiment, en accord avec les paramètres d'exposition, que la concentration en particules d'usure des freins à laquelle nous pouvons être exposée en conditions ambiantes correspond à une exposition à 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de particules. Cependant, en cas de scénario pessimiste cette valeur peut atteindre 180 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Barosova *et al.* 2018). Par ailleurs, en situation professionnelle (fabrication de dispositifs de freinage, entretien des véhicules), il est possible de suggérer que ces doses environnementales seront fortement augmentées.

Tableau III.2 : Inventaire des études in vitro réalisées sur les particules d'usure des freins.

Référence	Echantillonnage des nanoparticules d'usure	Caractéristiques des NPs-usure utilisées	Modèle biologique et méthode d'exposition	Effets biologiques
Gasser et al. <i>Particle Fibre and Toxicology</i> 2009	Type de freins non précisé Différents scénarios de freinage sur dynamomètre Collecte et exposition simultanée en aérosol	Taille : entre 5 nm et 1 µm Composition : Composante métallique 10 fois plus importante que la composante carbonée	Cellules A-549 (lignée alvéolaire) cultivées en interface air-liquide en Transwell® Exposition directe au niveau du système de freinage	Pas de cytotoxicité Pas de réponse pro-inflammatoire : Production d'espèce réactives de l'oxygène Pas de changements significatifs des complexes jonctionnels
Zhao et al. <i>Aerosol Science and Technology</i> 2015	Type de freins non précisé Scénarios de freinage variés Prélèvement sur véhicule entier (collecte manuelle)	Taille : Non étudiée Composition : Teneur élevée en carbone et oxygène, cocktail métallique Potentiel oxydant intrinsèque dose dépendant	Cellules A-549 (lignée alvéolaire) cultivées sur support 2D Exposition dans le milieu de culture	Pas de production d'espèces réactives de l'oxygène malgré un potentiel oxydant intrinsèque positif
Kazimirova et al. <i>Environmental research</i> 2016	Type de freins non précisé Scénarios de freinage non précisés Méthode de prélèvement non précisée	Taille : Non étudiée Composition : présence de carbone amorphe, graphite, barite et hématite, magnétite identifiée par Raman ; teneur élevée en fer	Lymphocytes humains isolés via un donneur Exposition dans le milieu de culture	Potentialité à induire des dommages chromosomiques (formation de micronoyaux)
Barosova et al. <i>Archives of Toxicology</i> 2018	Freins organique sans amiante et faiblement métallique Scénarios induit sur dynamomètre Collecte par impacteur	Taille : 0,25-4 µm Composition : Présence caractéristique d'hématite, de carbone amorphe, graphite, anatase. Analyse élémentaire révèle un cocktail métallique	Coculture de cellules A-549, cellules dendritiques et macrophages Exposition en interface air-liquide (faible volume), deux échelles de doses (conditions ambiantes/aiguës)	Cytotoxicité quelque soit la dose et la fraction en taille étudiée Pas de production d'espèces réactives de l'oxygène Induction de la production d'IL-8 en présence de particules issues de freins organiques et induction de la production d'IL-1β en présence de la fraction non aéroportée de freins faiblement métalliques

Chapitre IV :

Devenir des nanoparticules manufacturées (NPs- γ -Fe₂O₃) et issues de l'usure des freins (NPs-usure) au niveau de l'épithélium respiratoire

Dans notre étude, nous nous interrogeons sur le devenir des nanoparticules au niveau de la barrière respiratoire et en particulier sur leur capacité à traverser cette barrière. Cette problématique implique d'une part de disposer d'un modèle de cellules respiratoires capables de reconstituer une barrière épithéliale bien jointive et d'autre part de cultiver les cellules dans un dispositif permettant de collecter les particules ayant traversé la barrière. Les systèmes de culture classiques sur plastique dites 2D ne permettent pas d'atteindre ces critères. C'est pourquoi nous avons choisi de reconstituer un modèle de barrière respiratoire grâce à une culture longue durée en chambre à deux compartiments constituant une culture dite 3D. Nous avons utilisé la lignée Calu-3 pour reconstituer la barrière épithéliale bronchique *in vitro*.

Bien que nous ayons déjà caractérisé les réponses des cellules Calu-3 à l'exposition aux NPs-usure (Chapitre III), celles-ci ont été obtenues en culture 2D et il a donc été nécessaire de vérifier dans la même gamme de doses testées (1 à 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) s'il y avait une toxicité pour les cultures 3D. Nous avons déterminé s'il y avait une atteinte de la perméabilité épithéliale, une cytotoxicité ou encore une réponse pro-inflammatoire qui seraient susceptibles de moduler la translocation. En effet, nous souhaitons pouvoir déterminer si le passage se produit sur un épithélium intègre ce qui suggérerait un passage transcellulaire ou bien s'il se produit uniquement sur un épithélium dont les jonctions sont altérées et/ou où les cellules meurent permettant alors un passage paracellulaire.

La translocation a été quantifiée en utilisant une technique de pointe : la sp-ICP-MS (pour *Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Le recours à cette technique innovante a impliqué de nombreuses mises au point tant pour les expérimentations que pour le traitement des résultats. Dans ce contexte l'utilisation des nanoparticules manufacturées

d'oxyde de fer (NPs- γ -Fe₂O₃) a permis de calibrer la méthode puisque l'évaluation de la translocation des NPs-usure s'est faite en considérant l'élément Fer par l'intermédiaire de l'isotope Fe⁵⁶.

I. La lignée Calu-3 en culture 3D : Modèle de barrière épithéliale bronchique

1. Introduction et concept

Une culture en chambre à deux compartiments aussi appelée *Transwell*® (TW), a été choisie pour nos travaux. Il s'agit d'un dispositif comprenant une membrane polymérique séparant deux compartiments comme présenté en Figure IV.1. La membrane polymérique, le plus souvent constituée de polyester ou de polycarbonate, est poreuse et supporte la culture cellulaire. Nous avons choisi une porosité importante de 3,0 μ m afin de favoriser le transfert des particules transloquées du pôle basal des cellules vers le compartiment basal de la chambre. Les cellules ont un apport en nutriments à la fois par leur pôle apical et basal. C'est ce double apport qui permet la polarisation des cellules et le développement de caractéristiques spécifiques.

La barrière respiratoire peut être reconstruite *in vitro* à partir de cellules humaines des différents niveaux de l'arbre respiratoire (cellules nasales, bronchiques ou alvéolaires) qui sont soit des lignées ou des cultures primaires. Pour nos travaux, ce sont des cellules bronchiques humaines de la lignée Calu-3 qui ont été choisies puisqu'une étude comparative de plusieurs lignées réalisées auparavant au laboratoire avait montré ses atouts pour les études de translocation (George *et al.* 2015). Les cellules Calu-3 ont été cultivées en *Transwell*® pendant 14 jours afin d'obtenir un épithélium bronchique différencié. En effet, l'épithélium présente des cellules polarisées productrices de mucus, ayant des microvillosités apicales et qui sont reliées par des jonctions serrées permettant d'assurer la cohésion et l'étanchéité du feuillet épithélial reconstruit.

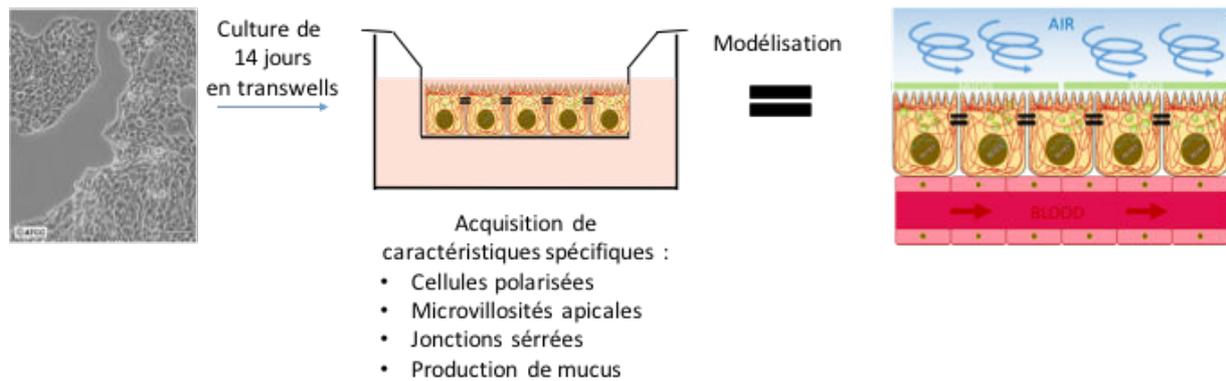


Figure 1 : Concept général de modélisation de la barrière épithéliale respiratoire. Les cellules Calu-3 provenant d'un adénocarcinome bronchique sont cultivées pendant 14 jours au sein d'une chambre à deux compartiments afin d'acquies un phénotype différencié. Les cellules sont polarisées, produisent du mucus, ont des microvillosités apicales et sont jointes par une ceinture de jonctions serrées qui permet ainsi d'obtenir une barrière épithéliale modélisant l'épithélium respiratoire bronchique humain.

Ce mode de culture, nous permet d'obtenir un épithélium qui modélise bien l'épithélium bronchique pouvant être retrouvé dans les voies respiratoires humaines. En préalable à l'étude de la translocation des NPs présentée en dernière partie de ce chapitre, il était nécessaire de caractériser les effets des NPs-usure et NPs- γ -Fe₂O₃ sur la barrière épithéliale respiratoire en fonction des concentrations d'exposition. Ainsi, différents paramètres cellulaires ont été étudiés : la cytotoxicité, la perméabilité, le relargage de cytokines et l'expression de protéines clés de l'épithélium.

2. Résultats

a. Caractéristiques des cellules Calu-3 en culture 3D

La technique de culture mise en place étant complexe, il est nécessaire de vérifier si les épithéliums cultivés ont acquis les critères de différenciation souhaités. C'est pourquoi, nous avons déterminé à partir de quelle durée de culture les propriétés de barrière étaient atteintes en mesurant la résistance électrique transépithéliale et le passage paracellulaire d'un marqueur fluorescent (Figure IV.2) qui rendent compte de la mise en place des jonctions serrées. Ces mesures ont été complétées par l'immunomarquage de la protéine ZO-1 associée à ces jonctions (Figure IV.3). Nous avons également vérifié le phénotype mucosécréteur des cellules Calu-3 en culture 3D par l'immunomarquage de la mucine MUC5AC (Figure IV.4). Enfin la microscopie électronique à transmission nous a permis de vérifier l'ultrastructure de ces cellules cultivées sur membrane poreuse et notamment de vérifier leur polarisation et la présence des granules de mucus et des jonctions serrées.

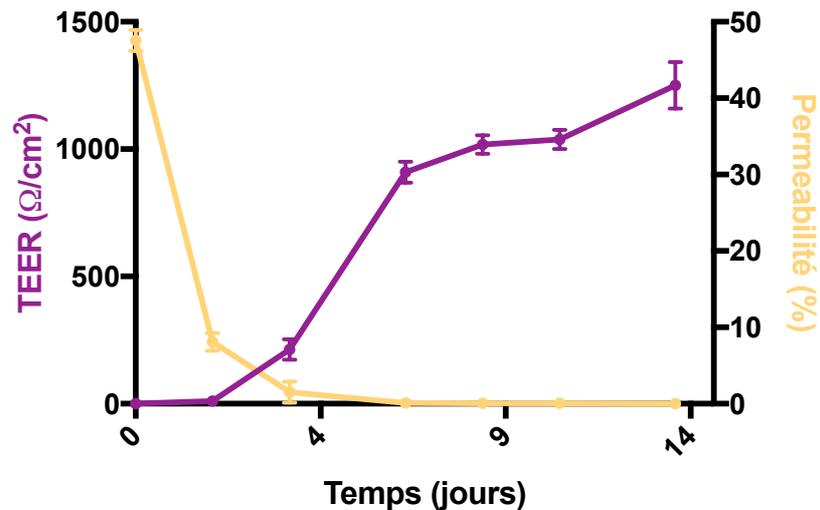
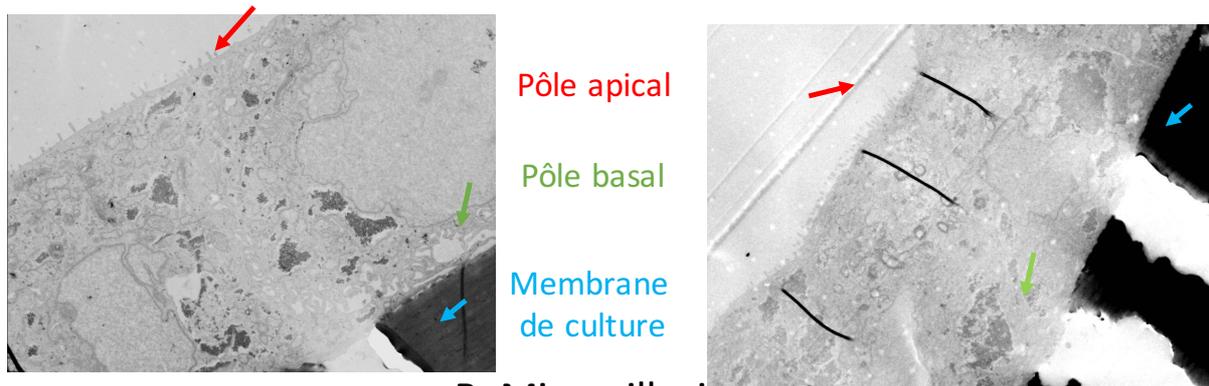


Figure IV.2 : Suivi de la mise en place de la barrière épithéliale avec les cellules Calu-3 pendant 14 jours de culture en Transwell® par deux méthodes : mesure de la résistance trans-épithéliale (courbe violette) et mesure du passage paracellulaire de Lucifer Yellow (courbe jaune) (Moyenne \pm SD, n=11)

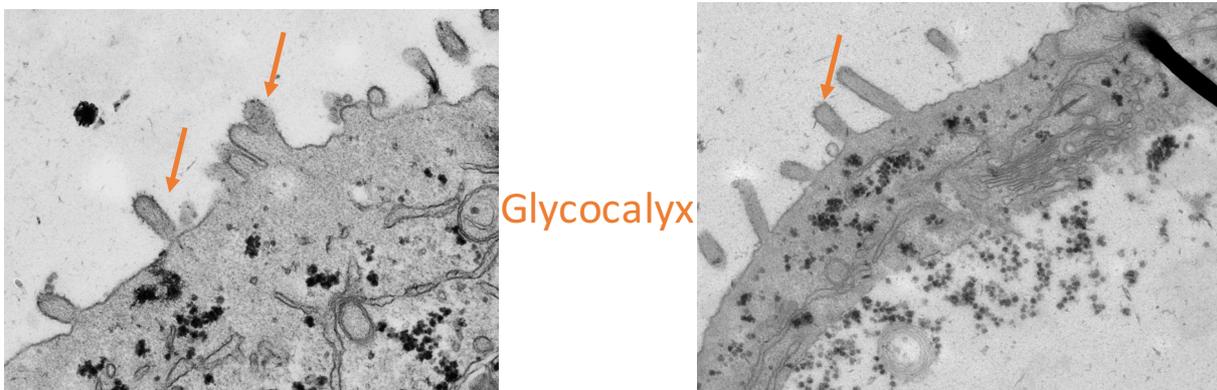
Afin de déterminer à partir de quand les cellules Calu-3 cultivées en 3D forment une barrière étanche, nous avons mesuré régulièrement sur 14 jours après la mise en culture sur les inserts, la résistance électrique transépithéliale (TEER) et le passage paracellulaire d'un colorant qui ne pénètre pas les cellules pour une exposition de courte durée : le Lucifer Yellow (LY). Sur la Figure IV.2, on observe que la TEER (courbe violette) augmente au cours du temps traduisant l'acquisition progressive de la fonction de barrière. Ainsi dès 5 jours, une valeur de résistance de 350 ohm/cm² est atteinte et s'accroît encore les jours suivants pour atteindre plus de 1000 ohm/cm². La mesure en parallèle de la fluorescence du LY dans le compartiment basal montre que celle-ci devient très faible dès 3 jours puis nulle les jours suivants. La superposition des 2 courbes montre la cohérence des résultats : à 3 jours, la TEER commence à augmenter alors que la fluorescence du LY devient très basse. Puis les jours suivants, la TEER augmente fortement alors que le LY n'est plus détectable dans le compartiment basal. Afin d'être sûr d'avoir une barrière robuste nous avons choisi de travailler par la suite sur des cellules cultivées depuis 14 jours sur le *Transwell*®.

La Figure IV.3 présente différentes photos de microscopie électronique à transmission de cellules Calu-3 qui ont été réalisées après 14 jours de culture en *Transwell*® afin de vérifier l'ultrastructure de l'épithélium reconstruit.

A. Cellules polarisées



B. Microvillosités



C. Complexes jonctionnels

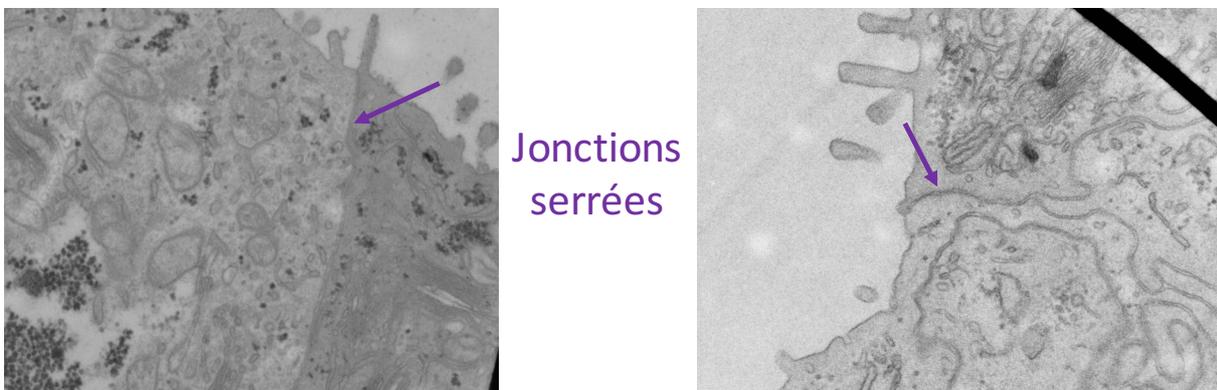


Figure IV.3 : Etude des caractéristiques de différenciation des cellules Calu-3 après 14 jours de culture en *Transwell*® par microscopie électronique à transmission

IV.3.A : Images présentant la polarisation des cellules (pôle apical (flèche rouge), pôle basal (flèche verte)) cultivées sur membrane *Transwell*® (flèche bleue)

IV.3.B : Images présentant les microvillosités présentes au pôle apical des cellules avec leur glycocalyx (flèche orange)

IV.3.C : Images présentant les jonctions serrées (flèches violettes) qui assurent l'étanchéité de l'épithélium respiratoire

La Figure IV.3.A permet de visualiser que les cellules se sont bien polarisées lors de la période de culture. En effet, il est possible de voir que les cellules sont ancrées grâce à un agencement complexe sur la membrane poreuse tandis que des microvillosités caractéristiques

sont distinguables au niveau apical. Ces microvillosités grossies dans la Figure IV.3.B permettent de voir également le glycocalyx associé. Il est aussi possible d'observer les jonctions serrées, structures essentielles à la fonction de barrière de l'épithélium respiratoire (cf Chapitre I.5.a.i), qui sont situées au pôle apical de la cellule (Figure IV.3.C). Celles-ci ont également été visualisées grâce à la réalisation d'un immunomarquage de la protéine ZO-1 qui leur est associée (Figure IV.4.A). On observe un marquage continu sur le pourtour des cellules qui constituent le tapis épithélial. Le marquage de l'actine montre un réseau dense au niveau basal ; tandis qu'au niveau apical, sont remarquables à la fois un réseau cortical et un marquage fin pouvant correspondre aux microvillosités (Figure IV.4.C). L'ensemble de ces observations attestent de la polarisation des cellules Calu-3 après 14 jours de culture en *Transwell*®.

La différenciation des cellules Calu-3 en culture 3D a également été évaluée par la présence de mucus en réalisant des immunomarquages de la protéine MUC5AC, mucine majoritaire au niveau bronchique. Un marquage punctiforme est observé soulignant les granules de mucus intracellulaires (Figure IV.4.B). Ce marquage est hétérogène selon les cellules.

b. Impact des nanoparticules sur les cellules Calu-3 en culture 3D

Pour pouvoir interpréter les résultats de l'étude de la translocation des NPs, il a été nécessaire de caractériser les effets induits par celles-ci dans la gamme de concentrations utilisées (1 à 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et pour une exposition de 24h. En effet, selon les concentrations, il est possible qu'une cytotoxicité, une atteinte des jonctions ou une réponse pro-inflammatoire se mettent en place. Dans le cas d'une altération de la barrière, la translocation paracellulaire indépendante d'un mécanisme actif pourrait se produire.

Cytotoxicité des nanoparticules sur les cellules Calu-3 en culture 3D

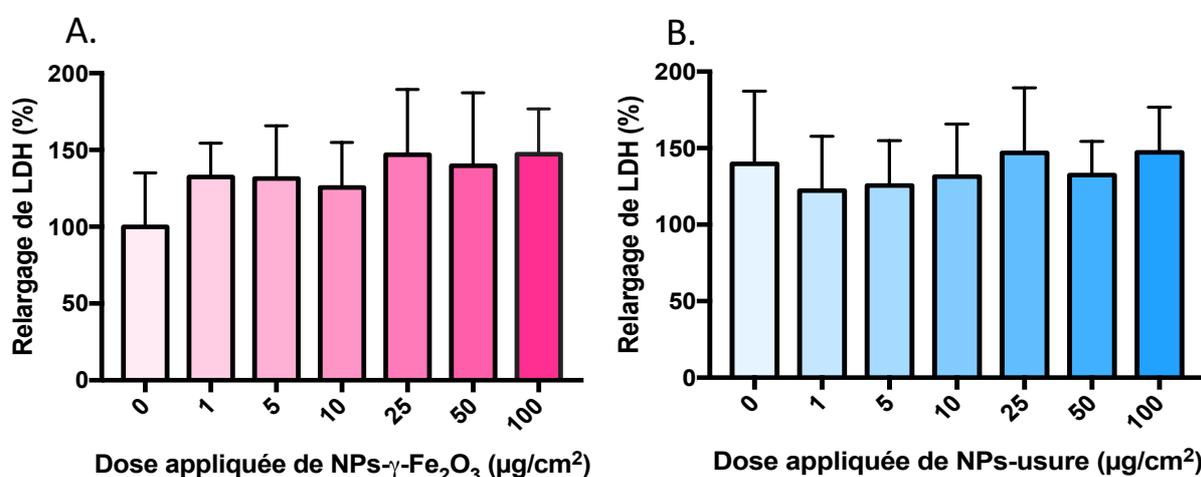


Figure IV.5 : Etude de la cytotoxicité des NPs- γ -Fe₂O₃ et NPs-usure pour les cellules Calu-3 après 24 heures d'exposition. Dosage enzymatique du relargage de LDH dans le milieu de culture cellulaire après 24 heures d'exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ (A) et NPs-usure (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (100%). (Kruskall-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SD)

La figure IV.5 présente le taux de relargage de LDH en fonction de la dose appliquée de nanoparticules pendant 24 heures au niveau apical des cellules Calu-3 cultivées en 3D. Si de petites variations sont notables ces dernières ne sont pas significatives. Ainsi, nos mesures montrent qu'il n'y a pas de cytotoxicité à 24h des NPs-usure et des NPs- γ -Fe₂O₃ pour les cellules Calu-3 exposées jusqu'à 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Profil de relargage cytokinique des cellules Calu-3 en culture 3D après exposition aux nanoparticules

Afin de compléter l'étude de l'impact des NPs-usure et des NPs- γ -Fe₂O₃ sur les cellules Calu-3 cultivées en 3D, nous avons étudié l'induction d'une réponse pro-inflammatoire qui a été évaluée par l'étude du relargage de 3 cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF α).

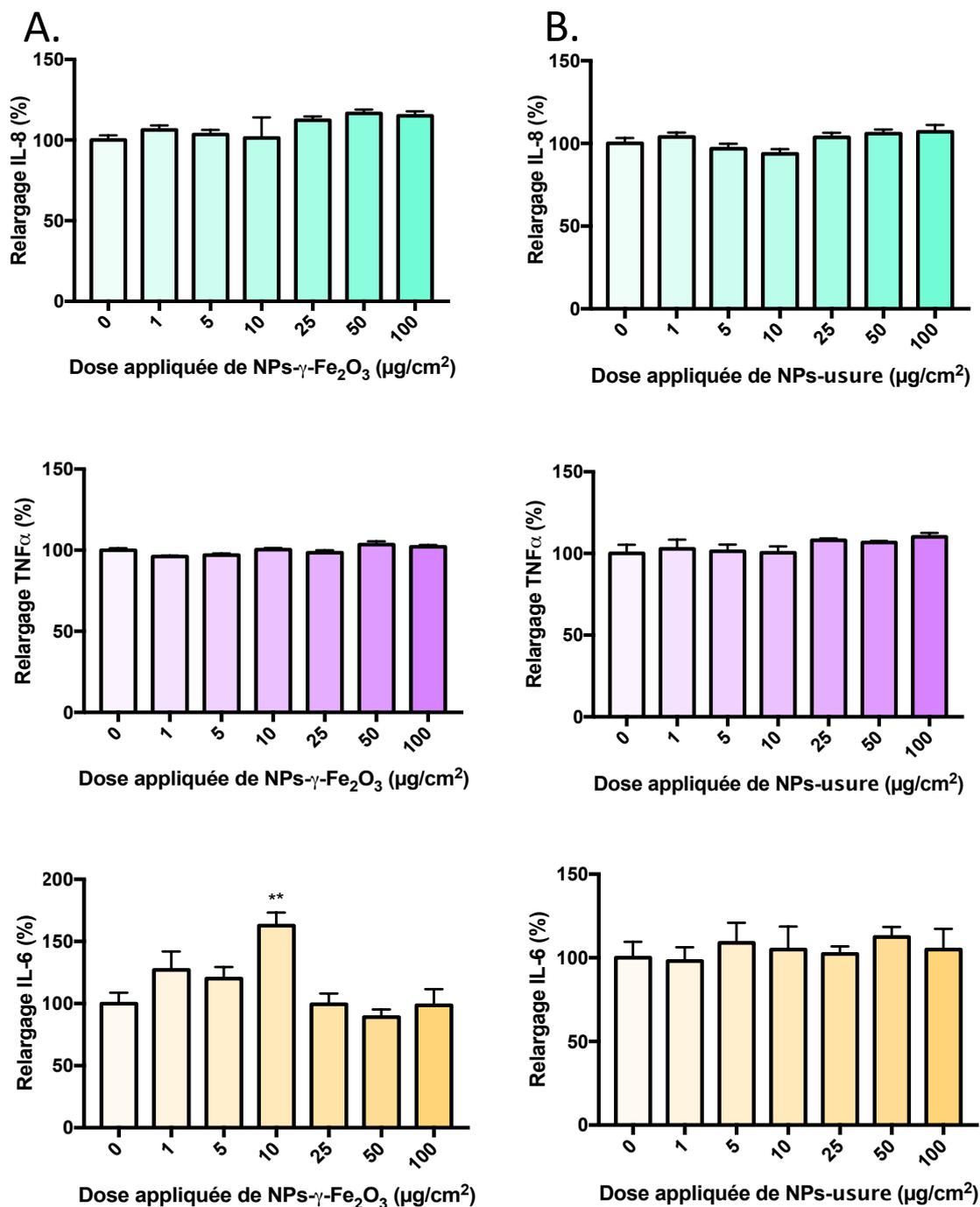


Figure IV.6 : Etude de la réponse pro-inflammatoire des cellules Calu-3 après 24 heures d'exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ et NPs-usure. Dosage par ELISA du relargage des cytokines pro-inflammatoires IL-8, TNF- α et IL-6 dans le milieu de culture cellulaire après 24 heures d'exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ (A) et NPs-usure (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (100%). (Kruskal-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SEM)

Les résultats présentés en Figure IV.6 montrent que les quantités d'IL-6, IL-8 et TNF α relarguées ne sont globalement pas significativement différentes de celle du témoin après exposition aux NPs-usure (figure IV.5.B) ou aux NPs- γ -Fe₂O₃ (figure IV.5.A). Les valeurs de relargage du témoin s'élèvent respectivement à 400, 1600 et 70 pg/mL pour chacune des cytokines.

Effets des nanoparticules sur l'intégrité de la barrière épithéliale

Nous avons étudié si une exposition de 24h aux NPs modifiait la perméabilité de l'épithélium au Lucifer Yellow en faisant une mesure de la fluorescence de ce composé dans le compartiment basal avant ou après une exposition de 24h aux NPs.

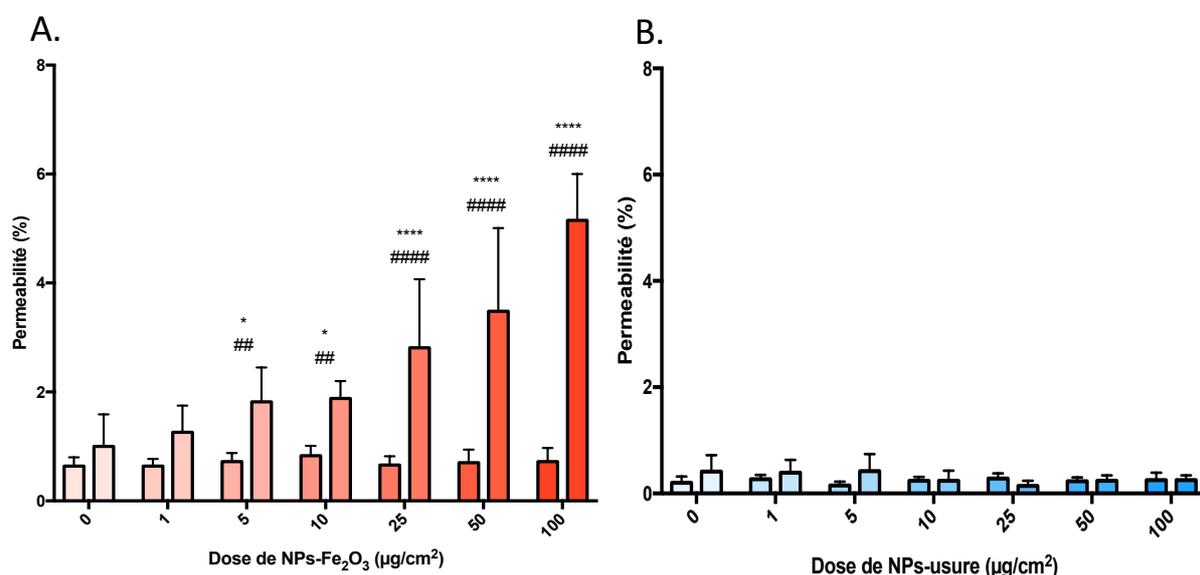


Figure IV.7 : Etude de l'impact de 24 heures d'exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ (A) et NPs usure (B) sur les complexes jonctionnels des cellules Calu-3 cultivées en *Transwell*®.

L'efficacité des complexes jonctionnels qui permettent d'assurer la fonction de barrière de l'épithélium respiratoire est étudiée via la perméabilité au Lucifer Yellow du modèle de cellules Calu-3. Etude de la perméabilité avant et après exposition à différentes doses de nanoparticules (Kruskall-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SD* : différence par rapport au témoin après exposition ; # : différence relative à l'exposition ; * : p>0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 ; **** : p<0,0001)

Les résultats présentés en figure IV-7A montrent que l'exposition de 24 heures aux NPs- γ -Fe₂O₃ entraîne une augmentation significative de la perméabilité. En effet, la perméabilité avant exposition située autour de 1% est augmentée jusqu'à plus de 5% pour la dose maximale de NPs- γ -Fe₂O₃. Cependant, bien que significative et significativement dose dépendante, cette perméabilité reste en-dessous du seuil de 10% (valeur mesurée lors d'une confluence de 100% mais avant apparition des jonctions serrées) qui est considéré comme la valeur critique pour prétendre à une atteinte de la perméabilité de l'épithélium. Par ailleurs,

l'exposition de 24 heures aux NPs-usure ne montre pas d'atteinte de l'étanchéité épithéliale (figure IV-7B) démontrant que les complexes jonctionnels sont préservés. Ces résultats sont en accord avec l'absence de cytotoxicité observée.

Nous avons complété ces mesures par une étude immunocytochimique axée sur la détection des jonctions serrées avec le marqueur ZO-1 et celle du cytosquelette avec le marquage de l'actine et de la tubuline. Les résultats de cette étude sont présentés en Figure IV.8. En ce qui concerne ZO-1, il n'est pas observé de modifications de marquage dans les cultures traitées aux NPs par rapport aux cultures témoins (Figure IV.8) ce qui est en accord avec les mesures de la perméabilité LY présentés en Figure IV.5.

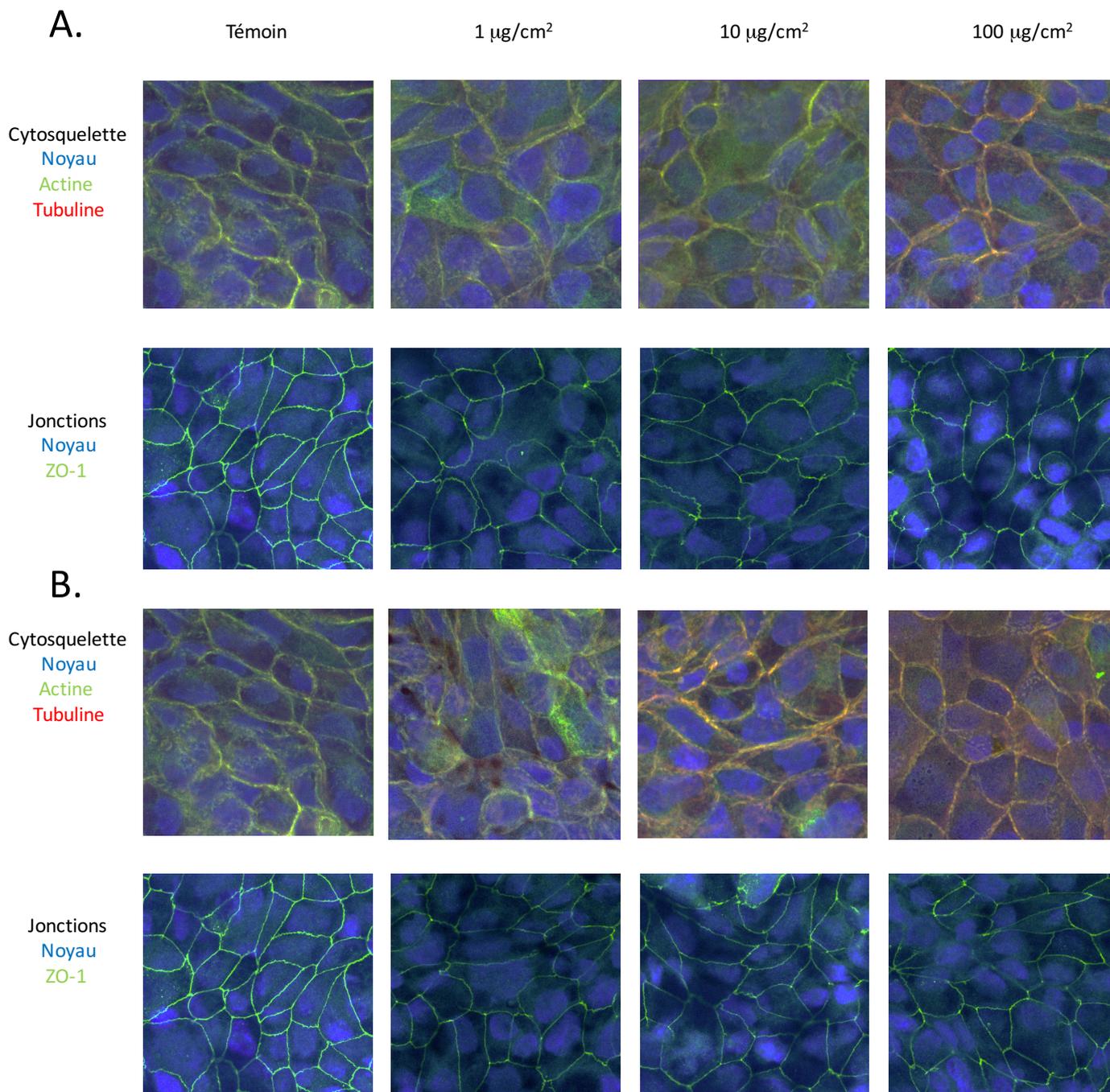


Figure IV.8 : Immunodétection des composants du cytosquelette et des jonctions intercellulaires des cellules Calu-3 en culture 3D après exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ (A) et aux NPs-usure (B). Images représentatives de chacune des conditions testées. Pour le cytosquelette, le marquage vert correspond à l'actine, le rouge à la tubuline et le bleu aux noyaux révélés par le DAPI. Pour les jonctions, le marquage vert correspond à ZO-1, principale protéine des jonctions serrées et le bleu aux noyaux révélés par le DAPI. Ces images prises au microscope confocal correspondent à une coupe optique de 0,65 μm , coupe centrale issue d'un Z-stack de 9 coupes.

A la plus forte dose d'exposition aux NPs, il semble qu'il y ait une augmentation du marquage de la tubuline puisque la coloration rouge prend l'avantage sur la coloration verte

par rapport aux autres marquages (Figure IV_8). Cependant, aucun processus de quantification permettant d'affirmer ce phénomène n'a été mis en œuvre.

En résumé, l'exposition des cellules Calu-3 en culture 3D aux NPs usure ou aux NPs- γ -Fe₂O₃ n'induit pas de cytotoxicité ni une réponse pro-inflammatoire consécutive à l'exposition de 24h à ces nanoparticules jusqu'à 100 μ g/cm². Il n'a pas non plus été mis en évidence une perte d'intégrité de la barrière épithélium par atteinte des jonctions serrées ou modifications du cytosquelette.

3. Discussion-Conclusion

Nous avons confirmé la différenciation des cellules Calu-3 en épithélium respiratoire polarisé présentant les caractéristiques requis à la modélisation de la barrière épithéliale respiratoire. Grâce à une culture de 14 jours en *Transwell*®, les cellules Calu-3 forment un épithélium respiratoire différencié. Cet épithélium présente un cytosquelette organisé en faveur de la polarisation cellulaire avec un ancrage marqué à la membrane de culture au niveau basal et la présence de microvillosités au niveau apical. Par ailleurs, les cellules Calu-3 produisent du mucus ce qui est un autre paramètre preuve de différenciation. Enfin, les cellules se sont organisées en un épithélium jointif grâce à la mise en place des jonctions serrées. En résumé, les cellules Calu-3 cultivées en *Transwell*® représentent un modèle expérimental adapté pour modéliser la barrière épithéliale respiratoire et l'on peut envisager leur utilisation pour l'étude de la perméabilité de la barrière à certains composés. Ce modèle a déjà été utilisé pour l'étude de la translocation de NPs polymériques (polystyrène simples et modifiées – Geys *et al.* 2006) mais aussi de NPs métalliques (CeO₂, ZnO – Cohen *et al.* 2014 ; SiO₂-FITC – George *et al.* 2015 ; SiO₂, TiO₂ – George *et al.* 2015). Ainsi, il nous a paru pertinent d'utiliser ce modèle de par ses caractéristiques, sa disponibilité au laboratoire et sa reconnaissance dans la littérature afin de réaliser notre étude de passage.

Nous avons démontré que les nanoparticules issues de l'usure des freins (NPs-usure) et les nanoparticules manufacturées d'oxyde de fer (NPs- γ -Fe₂O₃) n'entraînent pas d'altération de la barrière épithéliale respiratoire. En effet, après 24 heures d'exposition aux NPs, les cellules Calu-3 ne présentent pas d'atteinte de leur viabilité et ne montrent pas de signes d'induction d'une réponse pro-inflammatoire. Par ailleurs, ni la structure du cytosquelette, ni la perméabilité ou les jonctions serrées ne sont affectées par l'exposition aux NPs. Nous avons néanmoins observé que la perméabilité épithéliale était un peu augmentée

dans les cultures exposées pendant 24h aux NPs- γ -Fe₂O₃ mais celle-ci reste en dessous de 10% qui est considéré comme un seuil critique pour envisager une atteinte de l'étanchéité épithéliale. Cette valeur de 10% est celle mesurée lors d'une confluence de 100% mais avant identification des jonctions serrées par le marquage ZO-1. Cette observation s'apparente à celle faite par Schulze et al. qui ont étudié l'incidence de différentes nanoparticules métalliques sur la perméabilité des cellules Calu-3. Ils ont observé une diminution globale de la TEER traduisant une augmentation de la perméabilité après exposition pour chaque type de nanoparticules testées (ZrO₂, TiO₂, AlOOH, CeO₂). Cependant cette diminution n'était significative que pour les nanoparticules de ZrO₂ et comme dans notre étude, cette augmentation de perméabilité n'a pas dépassé le seuil critique entraînant un défaut d'étanchéité de la barrière. D'ailleurs, dans leur étude ils n'ont pas montré de passage de ces nanoparticules à travers la barrière respiratoire (Schulze *et al.* 2011).

Nous n'avons pas observé l'induction d'une réponse pro-inflammatoire lors de l'exposition aux NPs-usure contrairement à ce qui a été mis en évidence par l'équipe de Barosova (Barosova *et al.*, 2018). En effet, elle a montré que cette induction est dépendante de la composition de la garniture de frein utilisée pour traiter un épithélium 3D fait de co-cultures de cellules alvéolaires et de cellules immunitaires (cellules dendritiques et macrophages). Ainsi des NPs-usure de freins organiques sans amiante provoquent une augmentation du relargage d'IL-8 après 24 heures d'exposition ce qui n'est pas le cas pour les NPs-usure issues de garnitures faiblement métalliques. Par contre, les 2 types de garniture sont cytotoxiques quelle que soit leur taille à des doses comparables aux nôtres, ce que nous n'avons pas constaté avec le modèle Calu-3.

L'ensemble des résultats présentés dans la première partie de ce chapitre permettent de mettre en évidence que les cellules Calu-3 après 14 jours de culture en Transwell® s'imposent comme un modèle pertinent de barrière épithéliale respiratoire. Cette dernière n'est pas significativement affectée par une exposition de 24 heures aux deux types de particules même jusqu'à des concentrations élevées de 100 μ g/cm². Ceci signifie que si une translocation est observée elle découlera probablement d'une transcytose des nanoparticules. Les résultats de l'étude de translocation sont présentés ci-après.

I. Devenir des nanoparticules au niveau de la barrière épithéliale respiratoire

1. Concept général et méthodologies

Le développement d'effets systémiques après l'inhalation de nanoparticules est un phénomène connu qui peut s'expliquer par la capacité de ces nanoparticules à passer la barrière air-sang et ainsi rejoindre la circulation systémique pour atteindre des organes secondaires (Brook *et al.* 2010). La translocation peut aussi conduire à une accumulation des particules dans l'interstitium pulmonaire contribuant alors au remodelage des voies aériennes (Churg *et al.* 2013). La translocation au niveau de l'appareil respiratoire a été démontrée pour différents types de nanoparticules que ce soit après une inhalation ou une instillation (Annexe 2). Cependant les mécanismes impliqués dans la translocation restent mal compris et la quantification est difficile. C'est la raison pour laquelle des modèles *in vitro* sont utilisés pour répondre à ces questions. De plus ces modèles *in vitro* doivent permettre d'évaluer la translocation pour une grande diversité de nanoparticules tout en limitant l'expérimentation animale.

Dans le cas d'études *in vitro*, l'étude de la translocation de particules consiste à évaluer la capacité de passage des nanoparticules à travers la barrière épithéliale reconstituée en chambre à deux compartiments.

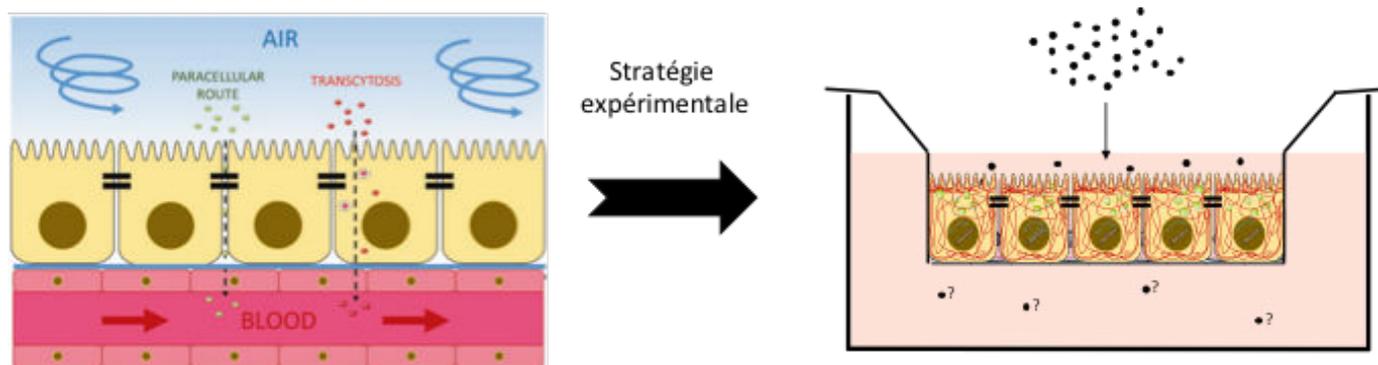


Figure IV.9 : Modélisation expérimentale pour l'étude de la translocation de particules inhalées. Deux voies de translocation sont connues le passage par transcytose (à l'intérieur des cellules) et la voie paracellulaire (entre les cellules). Dans les deux cas, les particules traversent la barrière respiratoire pour rejoindre le compartiment systémique. Dans une chambre à deux compartiments, le côté respiratoire est modélisé dans le compartiment apical et le côté sanguin par le compartiment basal. Les nanoparticules sont appliquées sur la barrière respiratoire par le niveau apical et s'il y a translocation, elles se retrouveront au niveau basal.

La quantification de la translocation nécessite de pouvoir détecter les nanoparticules avec un niveau de sensibilité suffisant. Il est possible d'exploiter les propriétés physico-chimiques des nanoparticules telles que la fluorescence ou la radioactivité ; ce qui est fait classiquement pour les nanoparticules manufacturées dont on contrôle la synthèse. Les NPs-usure, sous-produits des activités anthropogéniques, sont un mélange complexe qui ne présente pas ces propriétés. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser une méthode dérivant de la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Il s'agit de la sp-ICP-MS où le préfixe « sp » est l'abréviation de « *Single Particle* ». Dans la suite nous l'appellerons sp-ICP-MS. Il s'agit d'une méthode innovante, considérée comme une méthode de haute résolution conçue pour la détection et la distinction d'élément traceur non seulement sous forme soluble mais également sous forme particulaire. C'est ce qui fait l'intérêt de cette méthode dans notre problématique puisque ce que nous souhaitons étudier c'est la translocation de NPs métalliques et non des formes solubles des métaux constitutifs. Cette méthode est encore peu diffusée et nous avons eu l'opportunité de pouvoir collaborer avec l'équipe Biogéochimie environnementale de l'Institut de Physique du Globe de Paris qui dispose de l'instrument et des compétences pour la mise en œuvre et l'interprétation des données.

Le principe de base de cette méthode est représenté par la Figure IV.10 L'échantillon est introduit dans le plasma par un système de nébulisation. Une seule partie de l'échantillon est introduite au sein du plasma, cette quantité est calculée par l'intermédiaire de l'efficacité de transport qui entre en compte dans la détermination de la concentration en nanoparticules. Au sein du plasma, les particules sont brûlées et ionisées. Il est à noter que la matrice de l'échantillon peut affecter le potentiel d'ionisation ainsi que l'efficacité de nébulisation. Les ions sont extraits et l'analyseur en masse s'assure de la sélection de l'ion d'intérêt dont la quantité est finalement mesurée grâce à un détecteur électronique.

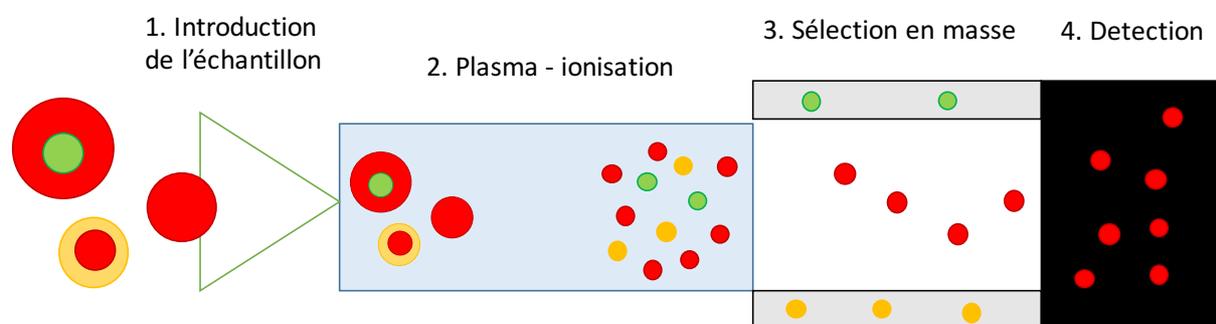


Figure IV.10 : Représentation schématique du principe technique de l'analyse en sp-ICP-MS. Les particules représentées sont composées de plusieurs éléments, chacun étant représenté par une couleur.

Une fois introduites dans le plasma, ces dernières sont brûlées et ionisées. Les ions sont transférés au niveau de la sélection en masse seuls ceux de l'élément d'intérêt ici représentés en rouge arrivent au détecteur pour être quantifiés.

Cependant, l'analyse des signaux émis en sp-ICP-MS font pour l'instant l'objet de méthodes en cours de développement afin de pouvoir être interprétés. Un logiciel expérimental a été développé mais ce dernier n'est pas adapté au traitement de grandes séries d'échantillons comme c'est le cas dans l'étude présentée ici. De plus, l'application de la sp-ICP-MS aux milieux biologiques complexes (milieux de culture cellulaire) reste pour l'instant peu usuelle, augmentant la difficulté d'adaptation nécessaire au traitement des signaux. C'est pourquoi nous avons développé une méthode d'analyse progressive intégrant un étalonnage externe.

2. Résultats

a. Analyse des signaux de sp-ICP-MS

Calibration de la méthode par étalonnage externe

Le signal obtenu en sp-ICP-MS consiste en une série d'intensités collectées en fonction du temps (Figure IV.11). Ces intensités, d'amplitudes différentes, correspondent à un nombre d'ions traceurs détectés à un moment précis par le détecteur. Dans ce signal on distingue trois sous-groupes d'événements : les intensités faibles correspondant au bruit de fond de l'échantillon, les intensités moyennes correspondant au fer dissous globalement présent dans l'échantillon et les intensités fortes qui représentent des nanoparticules. En effet, lors de leur désintégration dans le plasma, les particules deviennent un amas d'ions facilement différenciables des quantités de fer sous forme atomique présent dans l'échantillon. Par ailleurs, la quantité d'ions détectés est proportionnelle à la taille de la particule détectée. Dans notre étude l'isotope 56 du Fer (Fe⁵⁶) a été choisi comme traceur.

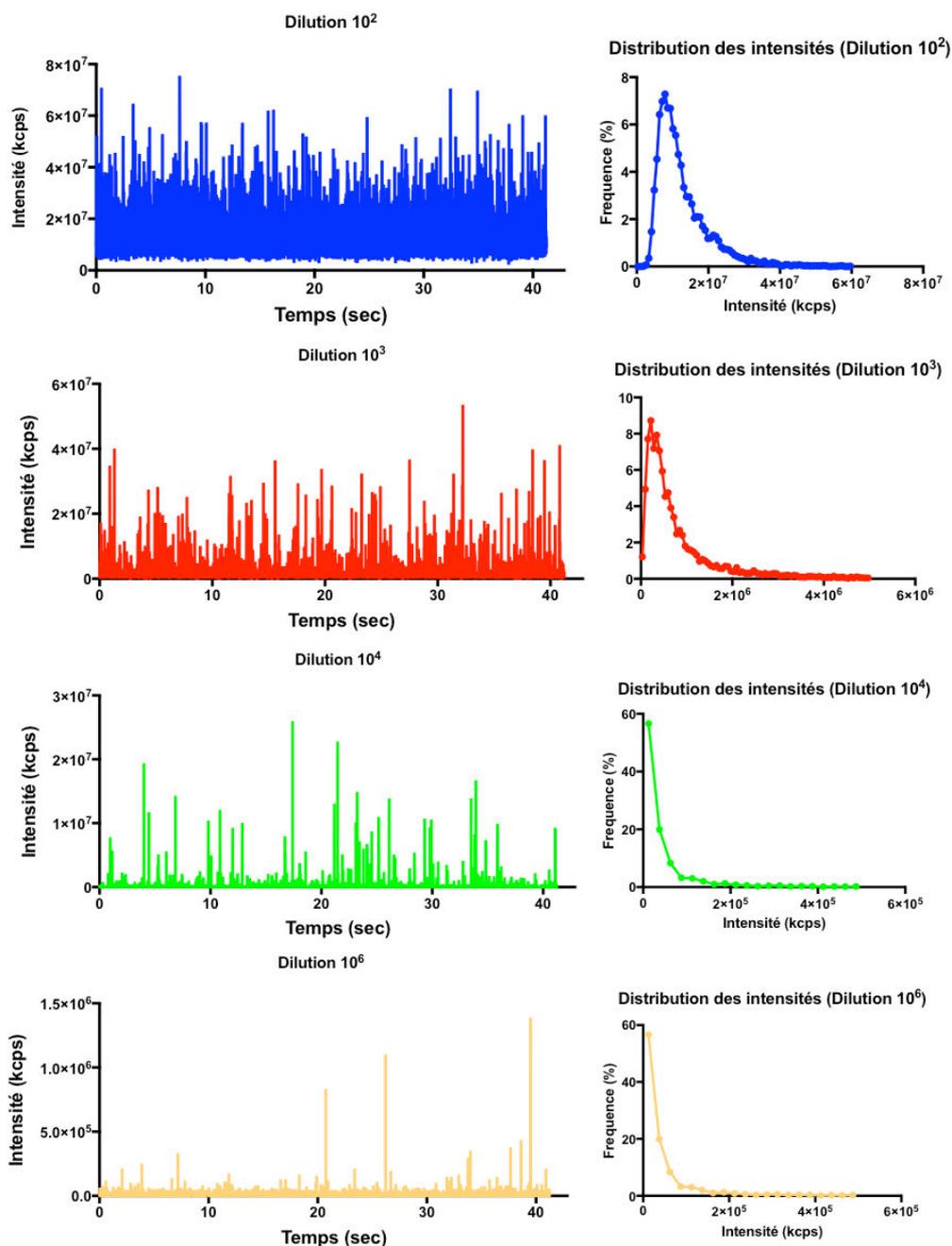


Figure IV.11 : Signal type obtenu lors de l'analyse en sp-ICP-MS. Les signaux d'analyses de sp-ICP-MS correspondent à l'enregistrement des intensités en nombre de coups détectées au cours du temps. Ces intensités sont proportionnelles à la concentration en Fe⁵⁶. On estime que tous les pics au-dessus de 10⁶ sont associés à des particules individuelles. Chaque pic peut être assimilé à une particule dont la taille est proportionnelle à la hauteur du pic.

Dans une première partie on étudie les intensités intégrées sur le temps total de la mesure (45 s). Afin de calibrer la méthode, nous avons effectué un étalonnage externe en utilisant des suspensions de particules de concentrations connues. Ces suspensions, tant les NPs- γ -Fe₂O₃ que les NPs-usure, correspondent aux suspensions appliquées ultérieurement au niveau apical de notre système de culture.

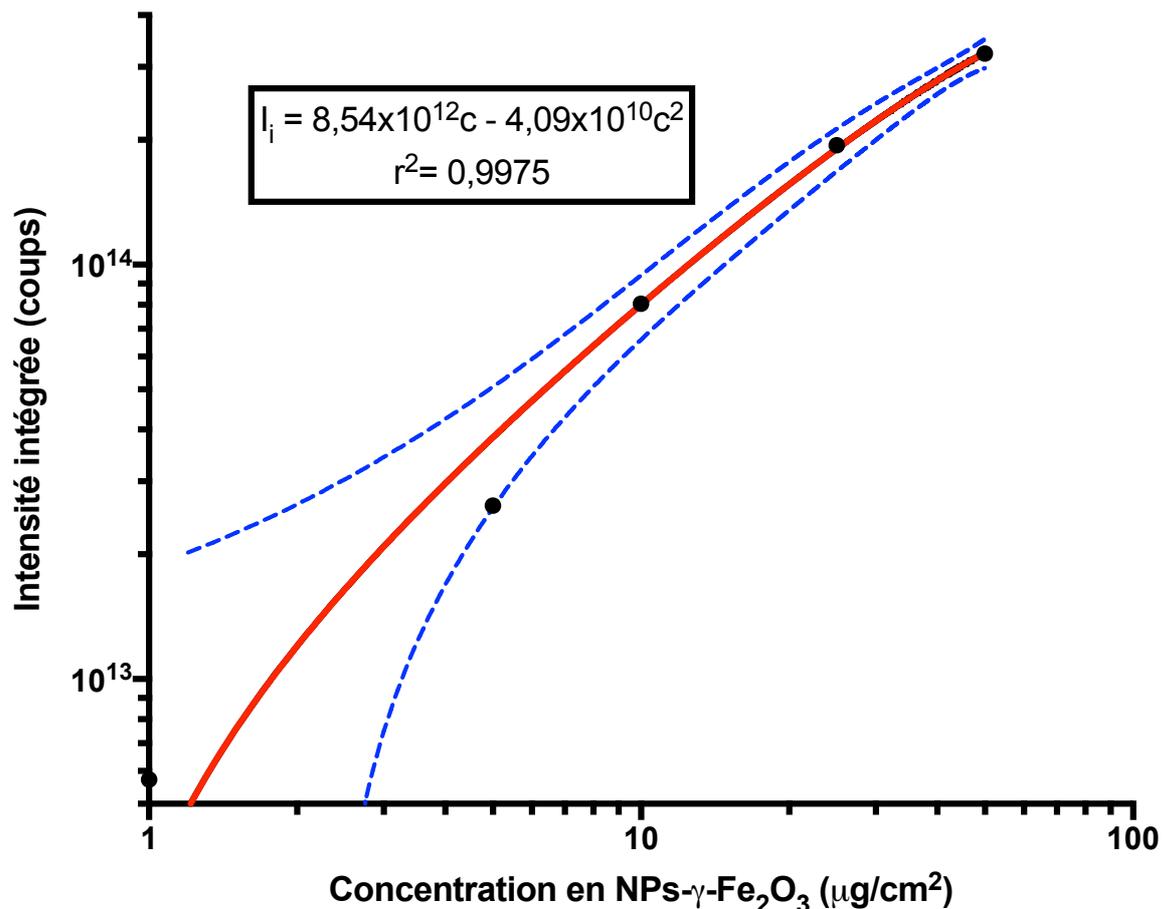


Figure IV.12 : Intensité intégrée en fonction de la concentration en NPs- γ -Fe₂O₃ dans le milieu de culture. La courbe d'étalonnage ici présentée doit permettre de définir la concentration en particules des échantillons dont les intensités seront mesurées en sp-ICP-MS. Le tracé plein en rouge représente la courbe d'étalonnage, le tracé en pointillés bleus correspond à l'intervalle de confiance à 95%. La courbe en rouge est proche d'une loi linéaire, modifiée par un terme quadratique pour tenir compte du comportement à hautes concentrations.

La figure IV.12 présente l'intensité intégrée en fonction du temps après correction des dilutions appliquées aux échantillons relatives aux exigences de la méthode d'analyse. Cette dernière,

permet de montrer que le lien entre l'intensité intégrée et la concentration théorique en NPs-Fe₂O₃ de l'échantillon est régie par la loi suivante :

$$I_i (\text{nombre de coups}) = 8,54 \times 10^{12} c (\mu\text{g}/\text{cm}^2) - 4,09 \times 10^{10} c (\mu\text{g}/\text{cm}^2)^2$$

L'intensité intégrée I_i est donc liée à la concentration c par une loi polynomiale de degré 2. Pour tenir compte de la géométrie du *Transwell*® les concentrations déterminées au niveau apical et basal ont été ajustées en termes de volume et superficie. En effet, le *Transwell*® possède deux compartiments différents : le compartiment apical qui contient 300 μL pour une surface de 1,12 cm^2 et le compartiment basal qui contient un volume de 1500 μL pour 3,8 cm^2 .

L'étalonnage externe de la méthode de sp-ICP-MS montre que la concentration en fer et l'intensité intégrée sont liées par une loi polynomiale de degré 2 qui sera utilisée pour déterminer la concentration en fer des échantillons en fonction des intensités mesurées pendant les analyses.

Analyse des signaux d'intensités intégrées : Cas des échantillons de milieux collectés après exposition a des nanoparticules d'oxyde de fer (NPs- γ -Fe₂O₃)

Après 24 heures d'exposition des cellules Calu-3 aux NPs- γ -Fe₂O₃, les surnageants apicaux et basaux des *Transwells*® sont collectés pour analyse par sp-ICP-MS. Dans un premier temps, les intensités intégrées des échantillons ont été analysées. Les résultats de cette comparaison sont présentés en Figure IV.13.

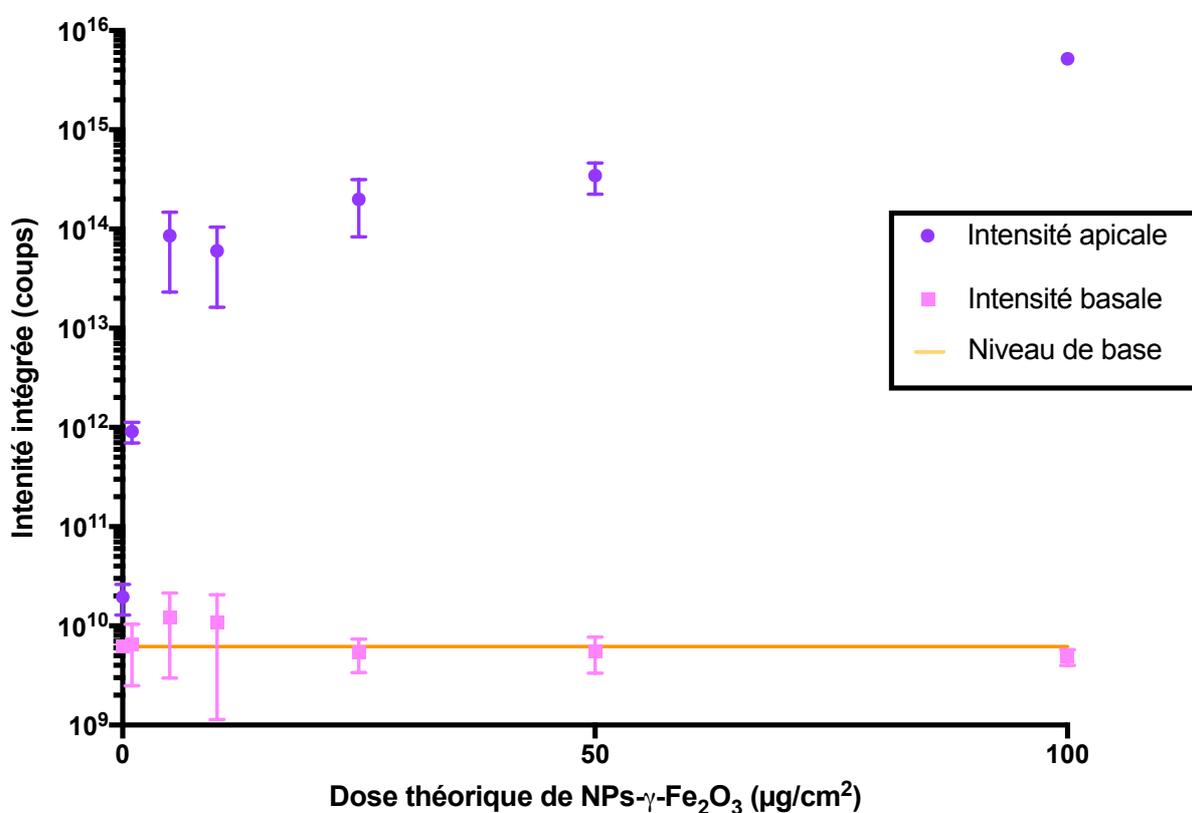


Figure IV.13 : Visualisation de l'échelle de différence entre les intensités apicales et basales (Moyenne \pm SD ; n=3 ; N=3)

La Figure IV.13 présente une visualisation des niveaux d'intensité détectés en basal et en apical. Il apparaît sur cette figure qu'il existe un rapport important pouvant atteindre 10⁵ entre les intensités mesurées au niveau apical et celles mesurées au niveau basal. De plus, les valeurs mesurées en basal au-dessus de 25 μ g/cm² sont situées sous le niveau de base correspondant à

une mesure effectuée sur du milieu sans nanoparticules ayant été en contact avec les cellules. Cette figure suggère que le taux de translocation des nanoparticules est très faible.

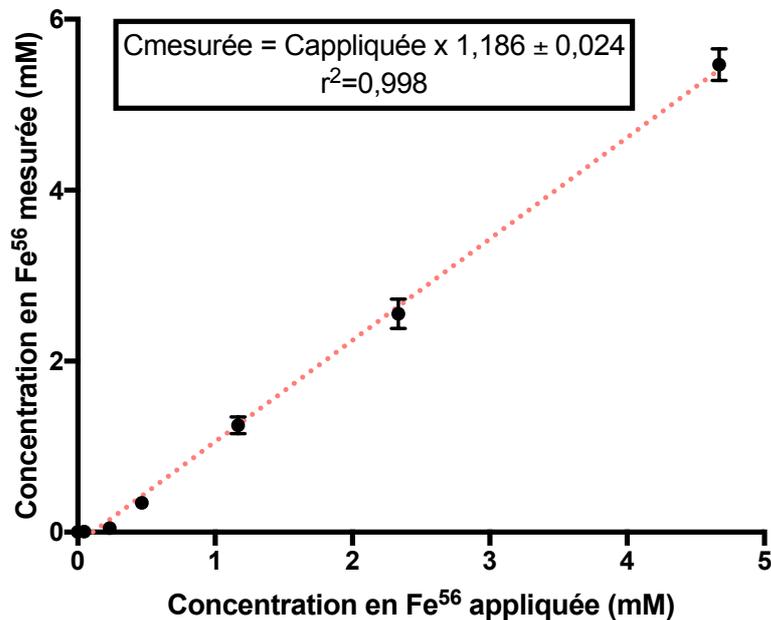


Figure IV.14 : Relation entre la concentration mesurée par sp-ICP-MS et la concentration théorique appliquée au niveau apical (Moyenne \pm SD ; n=3 ; N=3)

La figure IV.14 montre la relation entre la concentration mesurée par sp-ICP-MS dans le milieu apical après 24 heures de contact avec les cellules et la concentration théorique appliquée au niveau apical. La concentration théoriquement appliquée au niveau apical est sensiblement différente de celle retrouvée lors de la mesure. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les suspensions de la courbe de calibration n'ont pas été en contact avec les cellules. En effet, la quantité de fer supplémentaire (10%) pourrait provenir des sécrétions cellulaires. Par ailleurs, ces résultats suggèrent que le passage des nanoparticules d'oxyde de fer à travers la barrière respiratoire semble très limité. En effet, les concentrations mesurées ne sont pas inférieures aux concentrations théoriquement appliquées, effet qui serait attendu dans le cas d'une internalisation/translocation massive de particules. Ces résultats confirment les observations de la Figure IV.13.

La quantité de particules retrouvée dans les échantillons de l'étude de translocation est correctement corrélée avec l'équation établie lors de la calibration.

La concentration en fer représentant la quantité de NPs- γ -Fe₂O₃ est largement supérieure dans le compartiment apical par rapport au compartiment basal (ratio jusqu'à 10⁵)

Analyse des signaux d'intensités intégrées : Cas des échantillons de milieux collectés après exposition a des nanoparticules d'usure des freins (NPs-usure)

De la même façon que pour les échantillons collectés après exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ ; après 24 heures d'exposition aux NPs-usure, les surnageants basaux et apicaux des dispositifs de culture ont été collectés. Après analyse par sp-ICP-MS, les signaux ont été soumis au même traitement que celui présenté précédemment. Ainsi, dans un premier temps les intensités intégrées collectées ont été comparées. Les résultats de cette comparaison sont présentés en Figure IV.15.

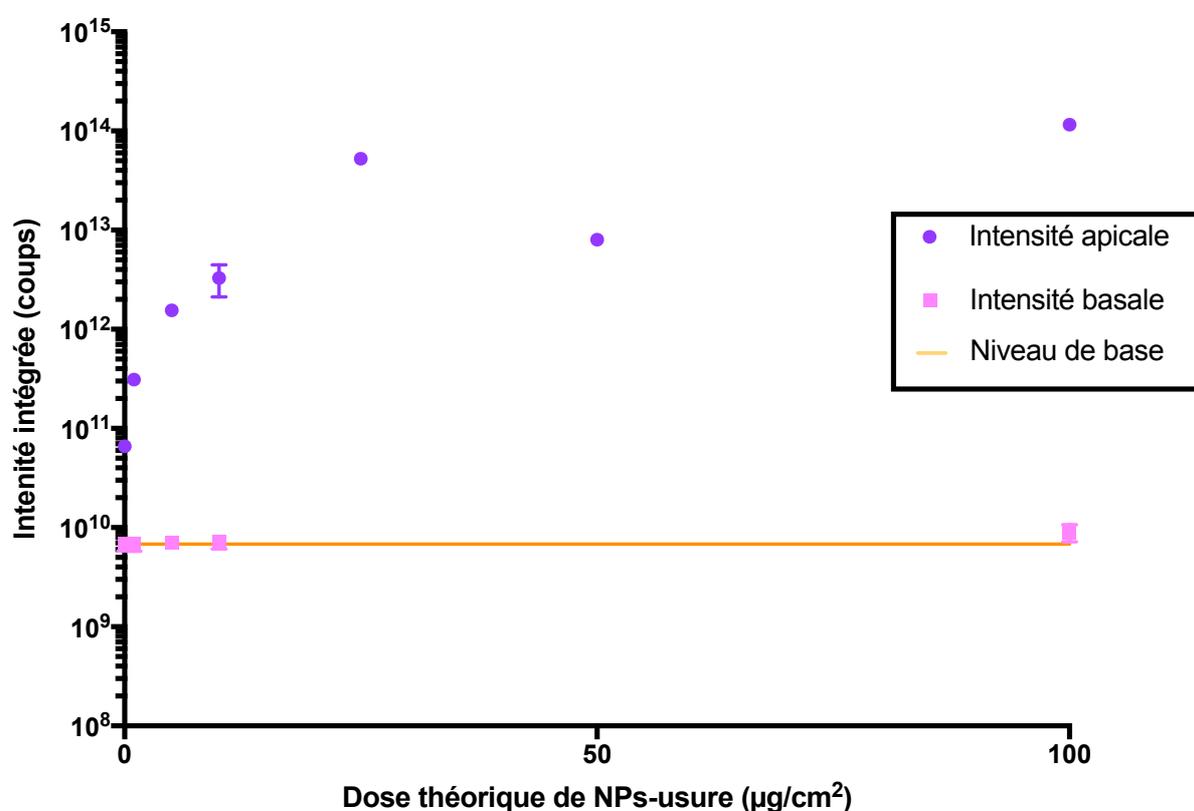


Figure IV.15 : Visualisation de l'échelle de différence entre les intensités apicales et basales (Moyenne \pm SD ; n=3 ; N=3)

Les résultats de la Figure IV.15 permettent de visualiser le facteur existant entre les intensités, correspondant à la concentration en Fe⁵⁶, retrouvées dans les milieux apicaux, où sont initialement introduites les nanoparticules de notre étude, et les milieux basaux situés en aval après la barrière respiratoire reconstituée. Ici, il apparaît que les niveaux des signaux basaux et apicaux correspondants aux concentrations en Fe⁵⁶ respectivement détectées dans chaque compartiment sont très différents. En effet, comme pour les NPs- γ -Fe₂O₃, un ratio conséquent

(pouvant atteindre un facteur de 10^4) est notable entre les deux signaux. Ainsi, comme suggéré précédemment pour les NPs- γ - Fe_2O_3 , le niveau de translocation des nanoparticules d'usure des freins semble très faible. De plus, certaines valeurs mesurées au niveau basal sont situées sous le niveau de base correspondant à une mesure effectuée sur du milieu sans nanoparticules ayant été en contact avec les cellules. Ici encore, il est possible de noter que les valeurs en Fe^{56} détectées dans le milieu basal sont très proches du niveau de base correspondant à une mesure effectuée sur du milieu de culture cellulaire exempt de nanoparticules.

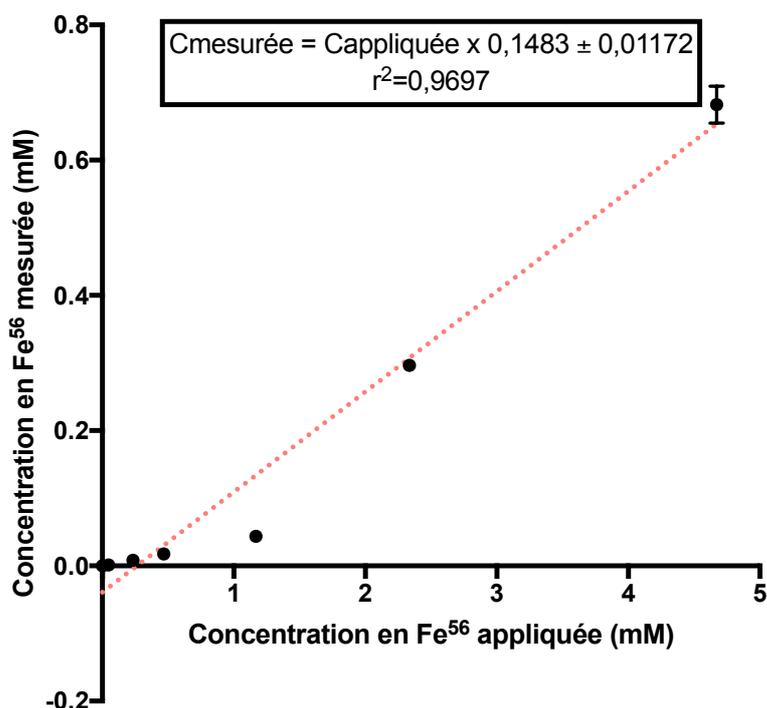


Figure IV.16 : Relation entre la concentration mesurée par sp-ICP-MS et la concentration théorique appliquée au niveau apical (Moyenne \pm SD ; n=3 ; N=3)

Grâce à la figure IV.16, il est possible d'établir le rapport de concentration entre l'élément Fe^{56} mesuré et les NPs-usure théoriquement introduites au niveau apical en début d'expérience. Ainsi, le Fe^{56} détecté correspond à 14,8% de la quantité introduite en début d'expérience. Contrairement au NPs- γ - Fe_2O_3 , il y a une différence importante entre la quantité de Fe^{56} mesurée et celle théoriquement introduite. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les NPs-usure ne sont pas constituées que de Fe^{56} . En effet, lors de l'analyse par fluorescence X (Chapitre III.2), il a été démontré que le fer ne représentait en masse que 30% des éléments constitutifs des particules d'usure des freins. Par ailleurs, l'analyse par fluorescence X ne

permet de détecter que les atomes entre le sodium (Na) et l'uranium (U). Ainsi, les éléments tels que le carbone, l'azote, l'oxygène ou encore le lithium ne sont pas détectés et pourrait donc expliquer la différence de pourcentage massique par rapport à celui introduit.

La quantité de particules de NPs-usure retrouvée dans les échantillons de l'étude de translocation est en lien avec les précédentes analyses effectuées sur la poudre d'usure des freins.

Comme pour les NPs- γ -Fe₂O₃, la présence de NPs-usure, reflétée par la concentration en fer, est largement inférieure dans le compartiment basal par rapport au compartiment apical.

b. Caractéristiques des nanoparticules de l'étude translocation

La taille des particules étudiées en sp-ICP-MS est étroitement liée à l'intensité détectée. En effet, l'intensité détectée correspond à une quantité d'atome de fer détectée en fonction du temps. Ainsi, dans le cas d'intensité élevée se différenciant du bruit de fond, il est possible de rapprocher la taille des particules à la quantité d'atomes de fer détectés. Ici, les données collectées n'ont pas permis de caractériser la distribution en taille des particules détectées. En effet, la faible quantité de particules détectées ne permet pas l'obtention d'une statistique suffisante pour caractériser la distribution en taille des particules. Par ailleurs, le bruit de fond élevé et la faible taille des particules sont des obstacles à cette caractérisation. En effet, les particules étant globalement de petite taille, leurs signaux sont difficilement différenciables de celui du milieu de culture sans particules.

c. Détermination des ratios de translocation

La mesure des concentrations de Fe⁵⁶ retrouvées tant au niveau apical que basal des dispositifs de culture cellulaire s'inscrit dans une problématique précise. En effet, l'objectif de ces travaux est de savoir si les nanoparticules de notre étude peuvent potentiellement traverser la barrière respiratoire. Par ailleurs, dans le cas d'une translocation, nos travaux s'intéressent à la quantité de nanoparticules transloquées par l'intermédiaire d'un ratio de translocation en % par rapport à la quantité préalablement introduite.

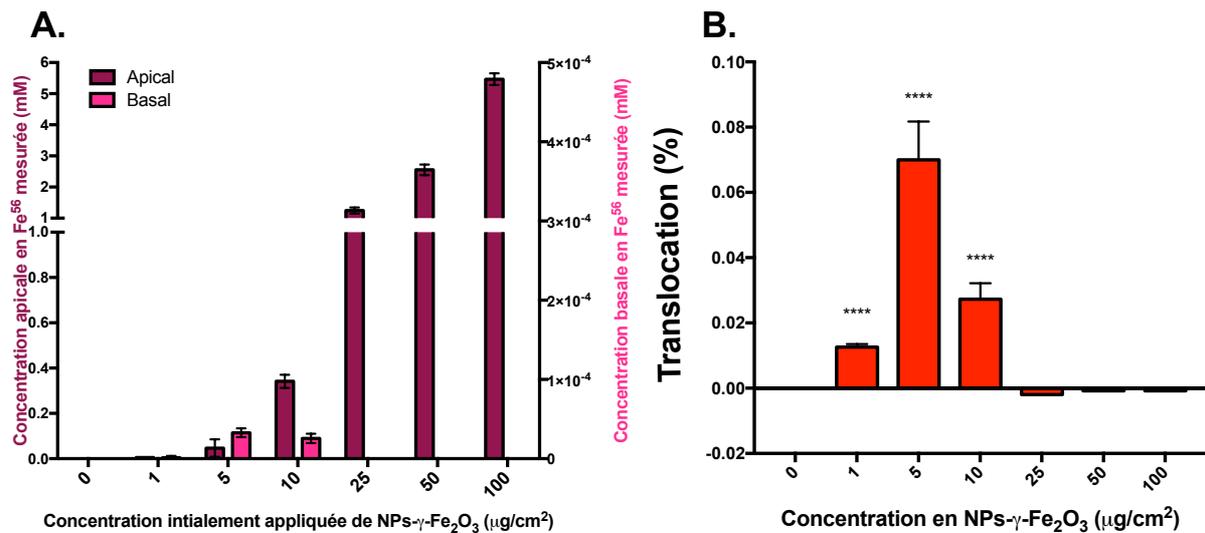


Figure IV.17 : Translocation des NPs- γ -Fe₂O₃

IV.17A : Concentrations en fer respectivement dosées dans les milieux apicaux et basaux en fonction de la concentration en NP initialement introduite

IV.17B : Taux de translocation des NPs- γ -Fe₂O₃ (Kruskall-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SD ; * : différence par rapport au témoin ; **** : p<0,0001)

La Figure 17A présente les différentes concentrations en fer retrouvées en fonction des doses de NPs- γ -Fe₂O₃ introduites en début d'expérimentation. Cette figure met en évidence que les concentrations basales en fer sont basses confirmant le constat préétabli en visualisant les différences d'intensité mesurées entre les deux niveaux (Figure IV.13). Par ailleurs, malgré les faibles concentrations en Fe⁵⁶ détectées au niveau basal, une translocation significative est retrouvée aux faibles doses. En effet, le ratio de translocation des NPs- γ -Fe₂O₃ à travers la barrière épithéliale respiratoire pour les doses appliquées de 1,5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ est significativement différent de zéro.

Aux faibles doses, les NPs- γ -Fe₂O₃ sont retrouvées en quantité significative dans le compartiment basal témoignant d'une translocation. Cette translocation bien que significative reste très faible (0,02 à 0,07%).

Ce phénomène n'est pas retrouvé aux doses les plus importantes.

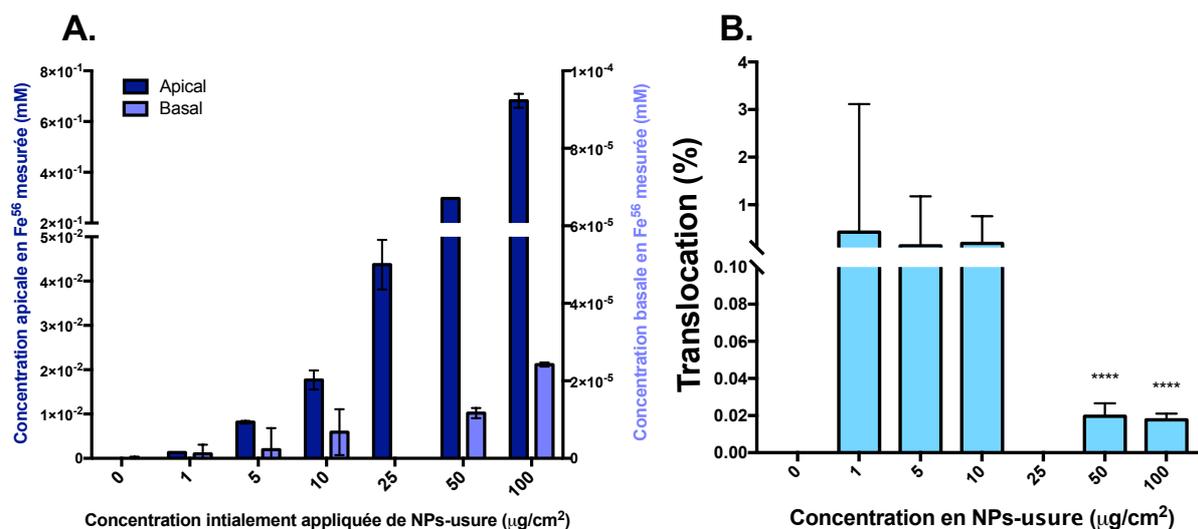


Figure IV.18 : Translocation des NPs-usure

IV.18A : Concentrations en fer respectivement dosées dans les milieux apicaux et basaux en fonction de la concentration en NP initialement introduite

IV.18 B : Taux de translocation des NPs-usure (Kruskal-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SD ; * : différence par rapport au témoin ; **** : p<0,0001)

La Figure IV.18 présente les différentes concentrations en fer retrouvées en fonction des doses de NPs-usure introduites en début d'expérimentation. Cette figure met en évidence que les concentrations basales en fer sont basses confirmant le constat préétabli en visualisant les différences d'intensité mesurées entre les deux niveaux (Figure IV.15). Par ailleurs, malgré les faibles concentrations en Fe⁵⁶ détectées au niveau basal, une translocation significative est retrouvée aux fortes doses. En effet, les ratios de translocation des NPs-usure à travers la barrière épithéliale respiratoire pour les doses appliquées de 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sont significativement différents de zéro.

Une translocation significative des NPs-usure est détectée après l'exposition à de fortes doses. Cette translocation bien que significative reste très faible (environ 0,02 %) comme dans le cas des NPs- γ -Fe₂O₃.

Ce phénomène n'est pas retrouvé aux doses les plus faibles. En effet, le signal détecté à ces doses n'est pas significatif.

3. Discussion-Conclusion

Nous avons mis en évidence que la sp-ICP-MS est une méthode pertinente pour l'analyse de nanoparticules en milieu biologique. Nous nous sommes tournés vers cette méthode car nos nanoparticules d'intérêt ne présentaient pas de propriétés de fluorescence ou de radioactivité dont la détection est très sensible. Ce sont ces approches qui ont jusqu'à présent été privilégiées pour la majorité des études *in vivo* et *in vitro* de translocation, mais elles concernaient des nanoparticules manufacturées qui pouvaient être façonnées pour intégrer un marqueur de détection (Puisney *et al.* 2018). Les NP-usure sont des sous-produits d'un processus mécanique dont la composition est hétérogène mais principalement métallique. Nous aurions pu utiliser la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) comme Bachler *et al.* 2015 dans une étude *in vitro* (Bachler *et al.* 2015) ou comme Shinohara *et al.* 2015 dans une étude *in vivo* (Shinohara *et al.* 2015). Dans ces deux études, ce sont des particules d'or qui ont été détectées grâce à cette méthode très sensible qui consiste au dosage d'élément traceur après dissolution préalable de la matrice dans lequel ce dernier est présent. Cependant cette méthode soulève deux problématiques : i) les formes particulaires et dissoutes de l'élément traceur ne sont pas distinguables ; ii) afin que le signal spécifique produit par l'élément traceur sous forme NPs soit significativement différent du niveau de base, il doit être en concentration faible au niveau de la matrice biologique (dispersant) . C'est la raison pour laquelle nous nous sommes tournés vers la sp-ICP-MS. Elle offre une meilleure résolution en permettant à la fois de doser des niveaux très faibles d'élément traceur et d'en différencier les formes particulaires et dissoutes.

Dans notre étude, nous avons choisi le fer comme élément traceur car c'est le composant métallique majoritaire des NPs-usure. Cependant, le fer est aussi un élément constitutif présent en concentration importante dans les cultures cellulaires. En effet, la facilité qu'a l'atome de fer à perdre et gagner des électrons en fait un élément important participant à une grande variété de réactions biochimiques. Par ailleurs, il s'agit du quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre et dans le cadre de l'évolution et d'un environnement riche en oxygène, ce dernier s'est inscrit comme un élément aux propriétés redox parfaites pour s'intégrer dans le transport de l'oxygène expliquant ainsi sa forte contribution aux processus biochimiques des cellules eucaryotes (Kaplan et Ward. 2013). En milieu biologique, le fer endogène est présent complexé à diverses molécules et n'est pas sous forme particulaire. La méthode sp-ICP-MS nous a ainsi permis de détecter le fer nanoparticulaire des NPs-usure capables de passer la barrière respiratoire. C'est à notre connaissance la première fois que ce type de méthode est

utilisé non seulement pour détecter les nanoparticules métalliques en milieu biologique mais aussi pour quantifier la translocation. En conséquence nous avons été confrontés à un manque de méthode de traitement des signaux adaptée à notre problématique. Afin de faciliter les mises au point, nous avons travaillé en parallèle avec des NPs- γ -Fe₂O₃ manufacturées.

La caractérisation des nanoparticules ayant traversé l'épithélium respiratoire reste difficile à étudier. En effet, les nanoparticules détectées au niveau basal sont en faible nombre ce qui ne permet pas d'obtenir une distribution en taille fiable. D'ailleurs, Lee *et al.* ont démontré que la caractérisation du diamètre des nanoparticules par sp-ICP-MS était dépendante de nombreux paramètres. Ainsi, le diamètre minimum caractérisable dépend de la sensibilité de l'appareil, du niveau de bruit de fond et de la densité des particules étudiées. Dans leur étude portant sur le diamètre minimum détectable (*D_{min}*) de particules différentes en termes de composition avec plus de 40 éléments traceurs, Lee *et al.* ont montré que le *D_{min}* dans le cas de particules de Fe₂O₃ se situe autour de 90 nm (Lee *et al.* 2014). Dans ce cas le diamètre est une approximation mathématique relative au nombre d'atomes détectés. Ici les nanoparticules manufacturées (NPs- γ -Fe₂O₃) de notre étude ont une taille primaire inférieure au *D_{min}*. Les particules détectées sont donc des agrégats de ces nanoparticules. Par ailleurs, pour les NPs-usure, leur composition très complexe rend l'approximation du diamètre difficile puisque le fer ne représente que 30% en masse de la composition des nanoparticules. Cependant, les travaux de Lee *et al.* nous permettent aussi d'expliquer le peu de particules détectées dans le compartiment basal. En effet, les caractéristiques de l'épithélium respiratoire impliquent que seules les plus petites particules peuvent traverser ce dernier. En perspective de cette étude, il est possible de suggérer des modifications expérimentales afin de pouvoir caractériser les nanoparticules qui traversent la barrière épithéliale respiratoire. En effet, la collecte d'une quantité plus importante d'échantillon permettrait de s'affranchir d'une dilution et de détecter plus de matériel. Par ailleurs, si cette amélioration n'est pas suffisante, une accumulation de la translocation sur plusieurs jours pourrait être envisagée. Enfin, l'accumulation de nanoparticules traversantes par expositions répétées est aussi une alternative.

Nous avons mis en évidence que les nanoparticules manufacturées d'oxyde de fer (NPs- γ -Fe₂O₃ - taille primaire : 50 nm) et les nanoparticules issues de l'usure des freins (NPs-usure) ont la capacité de traverser l'épithélium respiratoire. En effet, pour les NPs-usure nous avons estimé qu'elles peuvent traverser l'épithélium respiratoire à hauteur de 0,02%

lorsqu'il est exposé aux plus fortes doses (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Par contre, pour les NPs- γ -Fe₂O₃, un taux de translocation significatif de 0,015 à 0,08% a été estimé mais uniquement lors de l'application de faibles doses de 1 à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ceci pourrait être lié à un état d'agrégation différent des NPs quand elles sont à faibles concentrations par rapport aux fortes concentrations. L'étanchéité de l'épithélium respiratoire assurée par des jonctions serrées fonctionnelles fait que ce sont les plus petites particules/agrégats de particules qui sont les plus susceptibles de traverser cet épithélium. Le rôle de la taille dans la translocation a été montré dans plusieurs études *in vivo* (Puisney *et al.* 2018, synthèse des études de translocation dans cet article situé en Annexe 2). Ainsi Kreyling *et al.* ont démontré que la translocation de nanoparticules d'or après instillation intratrachéale chez le rat était inversement corrélée avec la taille des particules (Kreyling *et al.* 2014). Cette équipe a confirmé cette relation inverse que les NPs soient administrées par inhalation ou par instillation intratrachéale chez la souris et le rat (Bachler *et al.* 2015). La taille est le facteur déterminant de la translocation et prime sur la composition des NPs (Choi *et al.*, 2010, Puisney *et al.*, 2008). Ces études ont prouvé le phénomène de translocation mais ont aussi montré que les taux de translocation sont faibles. Toutefois, ces études ont généralement été réalisées après des expositions uniques. Or les expositions étant généralement chroniques, une translocation répétée peut conduire à des accumulations dans des organes secondaires.

Nous avons obtenu avec les NPs-usure et les NPs- γ -Fe₂O₃ des taux de translocation très faibles (0.015 à 0.8%) qui sont bien plus faibles que ceux (10%) qui ont été observés avec des nanoparticules de SiO₂ et TiO₂ également testées sur une barrière épithéliale reconstituée avec les cellules Calu-3 (George *et al.* 2015). Par contre, ils sont proches de ceux obtenus toujours avec le modèle Calu-3 pour des nanoparticules de CeO₂ et SiO₂ (0,0025–0,025%) (Cohen *et al.* 2014). Dans ces 3 études la méthode de détection des NPs était différente. En effet, si Cohen *et al.* ont utilisé la radioactivité, George *et al.* ont utilisé la fluorescence et nous avons utilisé la sp-ICP-MS. Pour autant il est difficile d'attribuer ces différences de taux de translocation aux méthodes de détection et sont plus probablement liées à la nature des NPs. Il est possible de suggérer une influence de la charge des nanoparticules puisque George *et al.* ont constaté une baisse de translocation de NPs de SiO₂ chargées positivement par rapport à des NPs de SiO₂ chargées négativement (George *et al.* 2015). Rappelons que dans ces études sur *Transwell*®, les NPs sont mesurées dans le compartiment apical et dans le compartiment basal sans savoir comment se répartissent les NPs entre les cellules et la membrane du *Transwell*®. Il est possible

que selon leurs propriétés de surface, les NPs soient plus ou moins piégées dans la membrane du *Transwell*® conduisant alors à une mésestimation de la translocation dans le compartiment basal. L'autre limite du système Transwell est que la densité de pores est limitée. Ainsi même si les nanoparticules ont traversé l'épithélium respiratoire, ces dernières peuvent être retenues par la membrane si elles ne sont pas exocytées au niveau d'un pore conduisant alors à une sous-estimation de la translocation.

Chapitre V :

Impact de l'exposition aux nanoparticules sur la protection de la barrière épithéliale respiratoire

1. Introduction et concept

La sécrétion de mucus constitue un mécanisme de protection de l'épithélium respiratoire au niveau trachéo-bronchique. En piégeant les microorganismes et les poussières/particules présentes dans l'air inhalé, il permet grâce à l'action conjointe des cellules ciliées, l'élimination de ces agents exogènes. L'efficacité de cette clairance muco-ciliaire nécessite que la quantité et les propriétés du mucus soient étroitement régulées. Ainsi dans la mucoviscidose, maladie génétique touchant le canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), la mauvaise hydratation du mucus conduit à modifier les propriétés viscoélastiques du mucus et à empêcher l'épuration muco-ciliaire amenant à des infections opportunistes chroniques (Boucher *et al.* 2000). Dans les pathologies inflammatoires chroniques comme l'asthme et les BPCO (Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive), une hypersécrétion muqueuse couplée à une métaplasie muqueuse provoque une accumulation du mucus dans les voies aériennes menant à une obstruction bronchique (Adrianifahanana *et al.* 2006).

Bien que les particules soient normalement piégées dans le mucus pour ensuite être évacuées grâce au battement ciliaire, certaines échappent à ce mécanisme, en particulier pour les nanoparticules. Il a été montré que ces dernières ont une capacité à diffuser à travers le mucus leur permettant alors d'interagir avec les cellules sous-jacentes (Schuster *et al.* 2013).

La capacité des nanoparticules à moduler la production du mucus nous est apparue comme un phénomène légitime à poser. En effet, il a déjà été montré que de nombreux xénobiotiques comme les particules contenues dans la fumée de cigarette, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les particules fines et ultrafines conduisent à une surproduction de mucus. (Shao *et al.* 2004, Chiba *et al.* 2011, Val *et al.* 2013) Plus récemment, ce phénomène a été observé après exposition de différents modèles respiratoires à des NPs (Chen *et al.* 2011, Ko *et al.* 2016, Park *et al.* 2016).

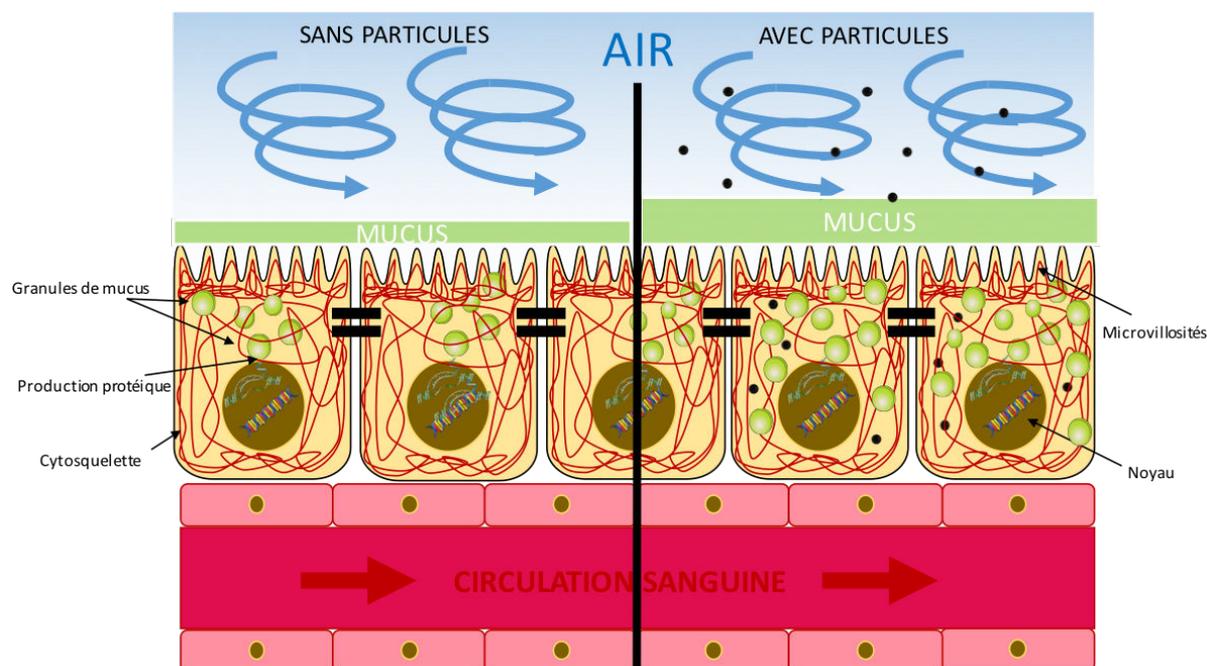


Figure V.1 : Effets de l'exposition aux nanoparticules sur la production de mucus par l'épithélium respiratoire humain. L'exposition aux NPs est susceptible de moduler l'expression des gènes des mucines et la synthèse protéique mais également de compromettre la sécrétion par interférence des NPs présentes dans le cytoplasme lors du trafic des granules de mucus et leur exocytose. La résultante de ces interactions pourrait être une baisse ou bien une hypersécrétion de mucus telle que schématisée sur la partie droite de la figure.

Nous avons donc souhaité tester l'hypothèse que les nanoparticules inhalées qui auraient traversé la barrière muqueuse et seraient internalisées au niveau cellulaire pourraient perturber le processus de protection épithéliale en modulant la production du mucus. Il s'agit de déterminer si les NPs peuvent modifier l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des mucines tout en s'interrogeant également sur une action possible sur la sécrétion du mucus. En effet, l'encombrement du cytoplasme par les NPs pourrait perturber le trafic des granules de mucus voire leur exocytose par interférence avec le cytosquelette. Il a déjà été observé que les NPs d'oxyde de fer provoquent un remodelage du cytosquelette d'actine et des microtubules avec un réseau microtubulaire plus compact dû au raccourcissement des microtubules (Soenen *et al.* 2010).

Dans ce but, nous avons exposé pendant 24 heures les cellules Calu-3 en culture 3D, par leur face apicale aux NPs-usure et aux NPs- γ -Fe₂O₃. L'impact sur la production de mucus a été évalué par l'étude de l'expression tant au niveau des transcrits que de la protéine de MUC5AC qui est avec MUC5B, la mucine majoritaire au niveau de l'appareil respiratoire.

L'expression des transcrits *MUC5AC* a été mesurée par RT-qPCR. L'expression de la protéine MUC5AC a été suivie par immunomarquage de la protéine et quantification du signal par analyse des images acquises en microscopie confocale.

De plus pour approfondir l'étude des mécanismes d'induction de MUC5AC par les NPs, nous avons recherché s'ils faisaient intervenir la voie du récepteur à l'EGF connue pour contrôler l'expression de cette mucine. Ceci a pu être évalué en utilisant des inhibiteurs de cette voie tout en recherchant si l'exposition aux NPs induisait le relargage de ligands de l'EGFR.

2. Résultats

a. Impact de l'exposition aux nanoparticules sur l'expression des transcrits du gène *MUC5AC*

Le niveau d'expression du gène *MUC5AC* a été évalué par RT-qPCR à partir de cellules Calu-3 exposées pendant 24h à une gamme de doses croissantes de NPs-usure et NPs- γ -Fe₂O₃. Les traitements ont été réalisés sur des cellules Calu-3 en culture depuis 15 jours et présentant une TEER supérieure à 500 Ω /cm². La veille du traitement, le milieu de culture des épithéliums est remplacé par du milieu de culture dépourvu de sérum.

Après 24 heures d'exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃, on remarque une augmentation dose dépendante de l'expression de *MUC5AC* (Figure V.2). Cette augmentation, très significative à la plus forte dose d'exposition (exposition à 100 μ g/cm² de NPs- γ -Fe₂O₃), montre un niveau d'expression 8 fois plus élevé que le niveau d'expression constitutif (sans exposition) de *MUC5AC*.

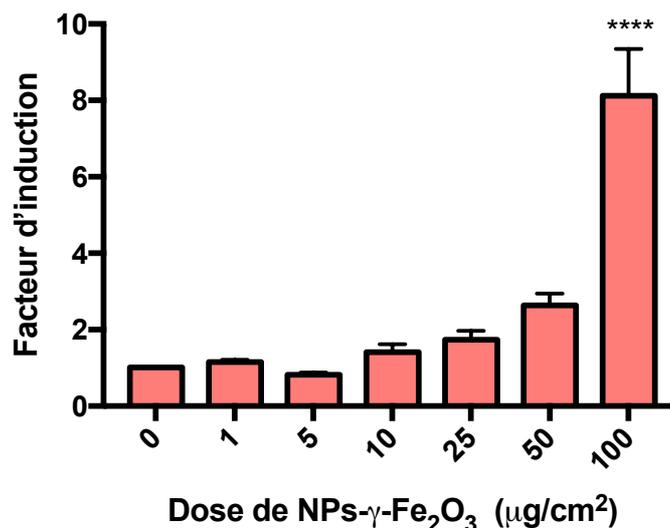


Figure V.2 : Niveau d'expression du gène *MUC5AC* au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition à différentes concentrations de NPs- γ -Fe₂O₃. Les résultats sont exprimés en facteur d'induction par rapport au témoin normalisé à 1. (* : différence par rapport au témoin ; **** : <0,0001 ; Kruskal-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SEM)

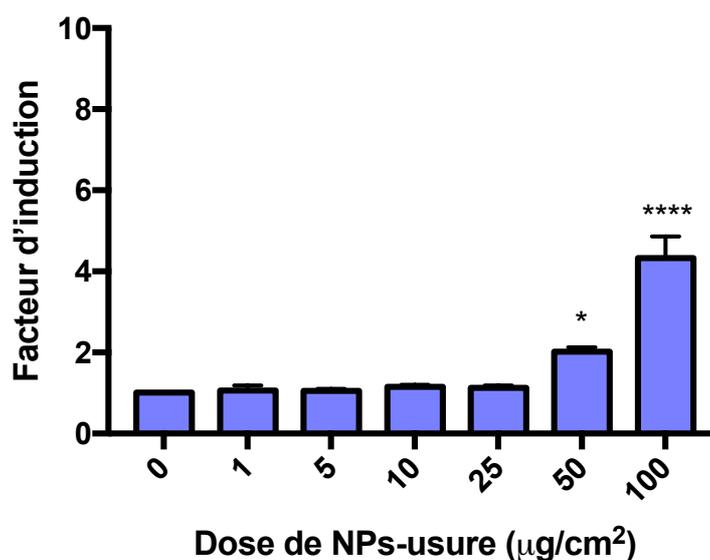


Figure V.3 : Niveau d'expression du gène *MUC5AC* au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition à différentes concentrations de NPs-usure. Les résultats sont exprimés en facteur d'induction par rapport au témoin normalisé à 1. (* : différence par rapport au témoin ; **** : <0,0001 ; Kruskal-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SEM)

Après 24 heures d'exposition aux NPs-usure, une augmentation du niveau d'expression de *MUC5AC* est notable aux plus fortes doses (Figure V.3). En effet, à partir d'une exposition de 50 μ g/cm², le niveau d'expression apparaît significativement deux fois plus important que le

niveau de base du témoin. Pour la dose de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ce facteur d'induction atteint la valeur de 5 et est significativement différent de celui à toutes les autres doses.

En résumé, les NPs-usure et les NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ induisent l'expression de *MUC5AC* mais cette induction n'est significative qu'aux plus fortes doses. A la dose maximale, on observe alors des facteurs d'induction qui sont respectivement de 5 et 8.

Afin de déterminer si cette modulation de l'expression de *MUC5AC* a des répercussions à l'échelle protéique, un immunomarquage de la protéine *MUC5AC* sur les cellules Calu-3 exposées aux nanoparticules a été réalisé.

b. Impact de l'exposition aux nanoparticules sur l'expression de la protéine *MUC5AC*

Le niveau d'expression de la protéine *MUC5AC* a été évalué par immunocytochimie et quantification d'images réalisées sur un microscope confocal. Les conditions d'exposition sont les mêmes que celles utilisées pour l'étude de l'expression des transcrits. Une analyse quantitative des images obtenues en microscopie confocale a été entreprise. Cette méthode consiste à quantifier le signal obtenu pour le mucus (surface de signal « vert »). Cette surface est quantifiée sur les 3 coupes optiques médianes de chaque assemblage. Les intensités dépendantes de la surface sont ensuite intégrées et moyennées selon 5 champs afin d'être comparées.

Les observations microscopiques montrent clairement que l'immunomarquage de *MUC5AC* concerne de plus en plus de cellules lorsque la dose de NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ augmente (Figure V.4A). On observe également que le nombre de granules de mucus par cellules augmente.

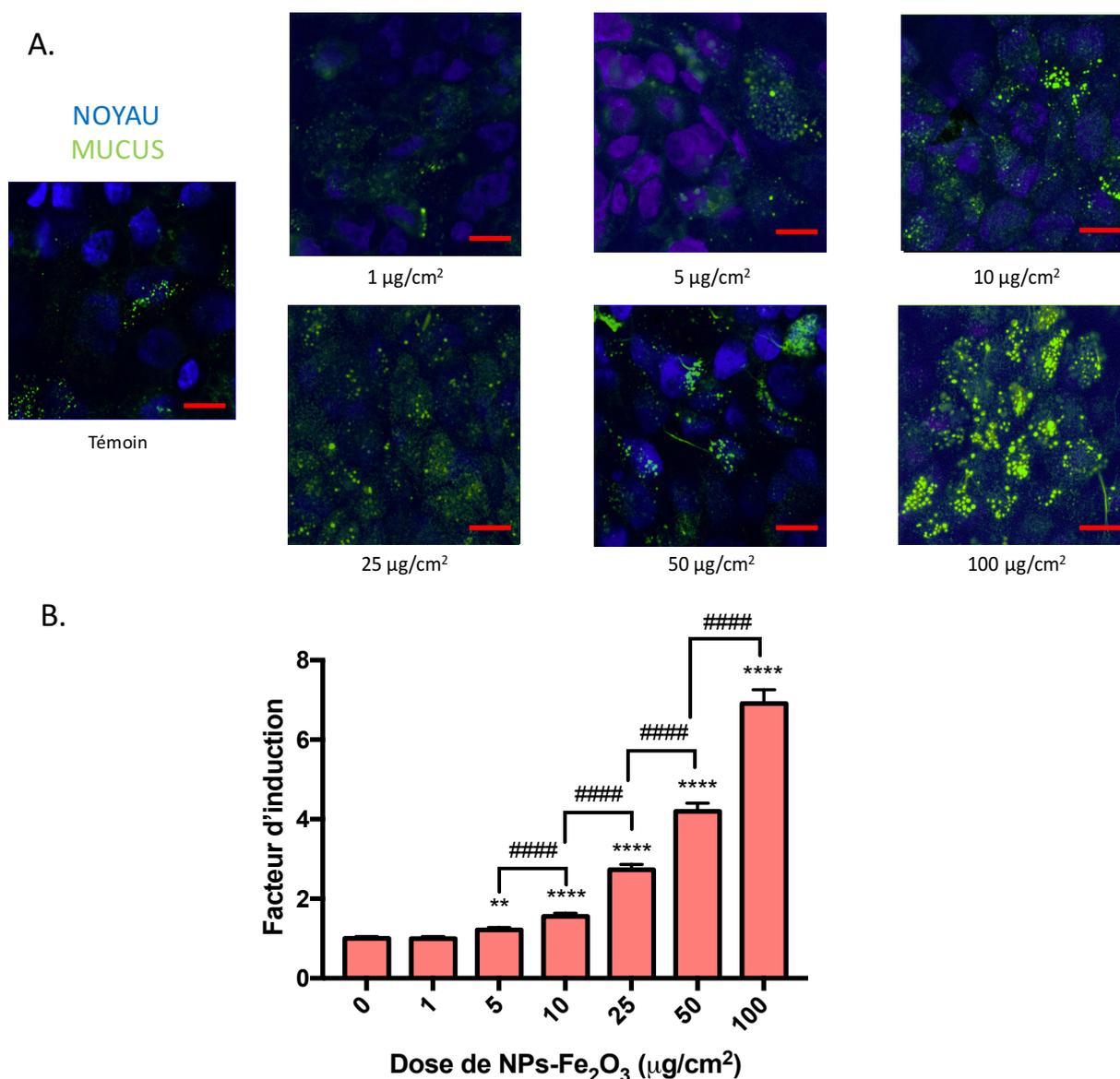


Figure V.4 : Immunodétection de la protéine MUC5AC au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition aux NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

4A : Images représentatives de chacune des conditions testées. Le marquage vert correspond à MUC5AC et le bleu aux noyaux révélés par le DAPI. Ces images prises au microscope confocal correspondent à une coupe optique de $0,65 \mu\text{m}$, coupe centrale issue d'un Z-stack de 9 coupes. (Echelle : $10 \mu\text{m}$)

4B : Niveau d'expression de la protéine MUC5AC en fonction de la dose, déterminé après analyse quantitative des images acquises en microscopie confocale. (FC : Fold Change ; One-way ANOVA post test de Dunnett ; N=5 champs de $n = 22 \pm 4$ cellules ; Moyenne \pm SD ; Objectif : 40X – immersion à huile ; * : différence par rapport au témoin ; # : différence entre les doses ; ** : $p < 0,01$; ****/#### : $p < 0,0001$)

Après 24 h d'exposition aux NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, on remarque une augmentation dose dépendante du niveau de fluorescence lié à l'immunodétection de la protéine MUC5AC (Figure V.4B). Cette augmentation s'avère significative dès les doses les plus faibles ce qui n'avait pas été observé lors de l'étude des transcrits. De plus on observe des différences significatives à chaque augmentation de doses. On remarquera que l'exposition à $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

entraîne une augmentation de l'expression protéique de MUC5AC d'un facteur 8 par rapport au témoin, ce qui correspond à un facteur d'induction concordant avec celui observé lors de l'étude des transcrits.

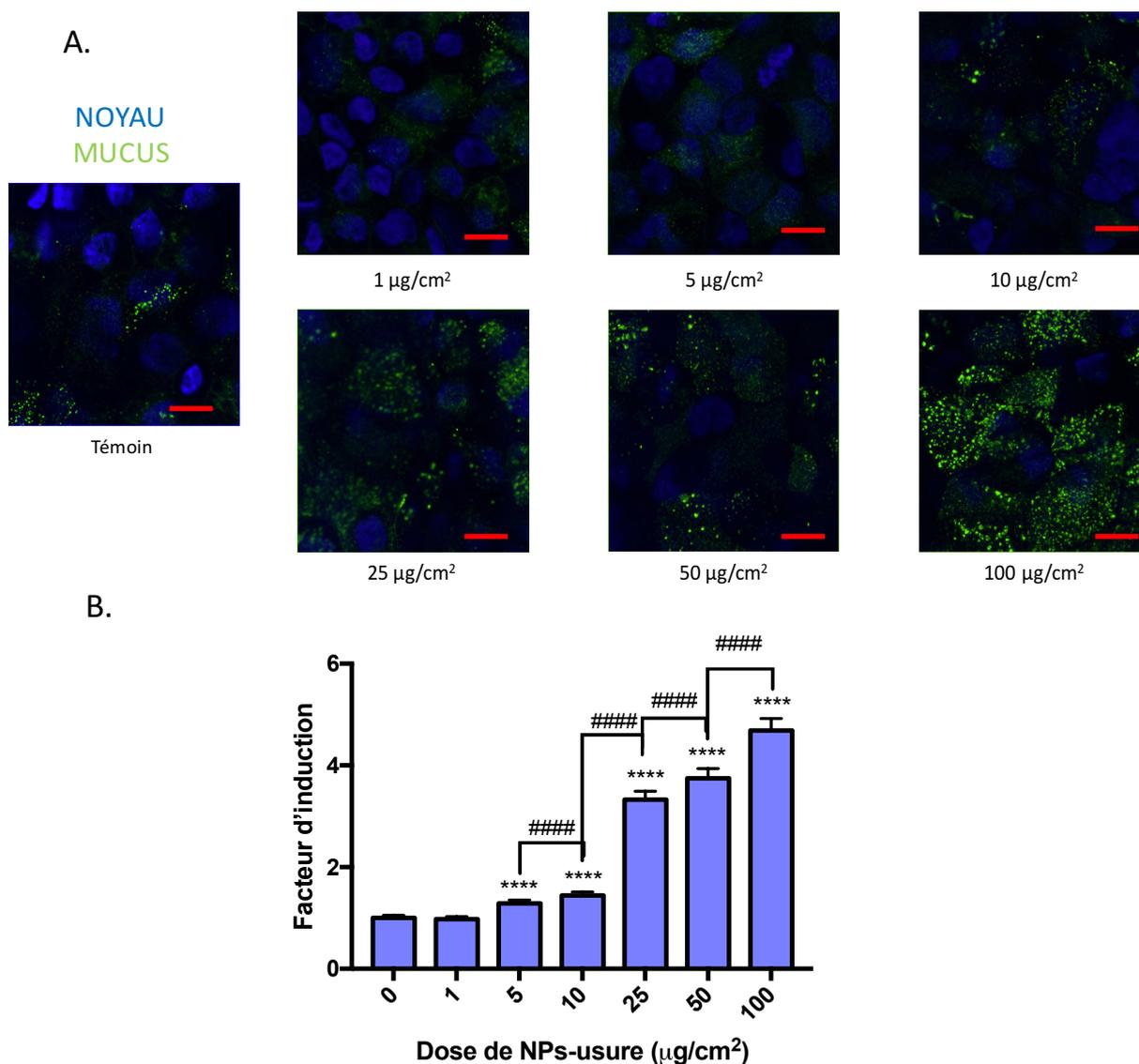


Figure V.5 : Immunodétection de la protéine MUC5AC au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition aux NPs-usure.

5A : Images représentatives de chacune des conditions testées. Le marquage vert correspond à MUC5AC et le bleu aux noyaux révélés par le DAPI. Ces images prises au microscope confocal correspondent à une coupe optique de 0,65 µm, coupe centrale issue d'un Z-stack de 9 coupes. (Echelle : 10 µm)

5B : Niveau d'expression de la protéine MUC5AC en fonction de la dose, déterminé après analyse quantitative des images acquises en microscopie confocale. (FC : Fold Change ; One-way ANOVA post test de Dunett ; N=5 champs de n= 22 +/- 4 cellules ; Moyenne ± SD ; Objectif : 40X – immersion à huile ; * : différence par rapport au témoin ; # : différence entre les doses ; ****/#### : p<0,0001)

Le marquage résultant de l'immunodétection de la protéine MUC5AC après exposition des cellules Calu-3 pendant 24 heures aux NPs-usure montre une augmentation du nombre de vésicules correspondant aux granules de mucus. Si les granules de mucus concernent de plus en plus de cellules, elles sont aussi plus nombreuses dans chaque cellule prise séparément.

Comme avec les NPs- γ -Fe₂O₃, après 24 h d'exposition aux NPs-usure, on remarque une augmentation du niveau de fluorescence liée à l'immunodétection de la protéine MUC5AC en fonction de la dose et cette augmentation s'avère également significative dès les doses les plus faibles (Figure V.5B). A la plus forte dose (100 μ g/cm²), le facteur d'induction est de 5 par rapport au témoin et donc concordant avec celui observé lors de l'étude des transcrits MUC5AC.

En résumé, l'exposition des épithéliums respiratoires Calu-3 aux nanoparticules, tant les NPs-usure que les NPs- γ -Fe₂O₃, entraîne une hausse de l'expression protéique de MUC5AC. Cette expression protéique augmente de manière dose-dépendante et est significative dès les plus faibles doses.

c. Mécanismes impliqués dans la régulation de MUC5AC

Rôle des ligands du récepteur à l'EGF

Différentes voies de signalisation peuvent contribuer à l'induction de l'expression de *MUC5AC* (cf Chapitre I.5.a.ii). En particulier, la voie du récepteur à l'EGF (EGFR) est connue pour contrôler l'expression de *MUC5AC* et l'implication des ligands de l'EGFR dans les mécanismes d'induction de *MUC5AC* par les condensats de fumée de cigarette et les PM_{2,5} a déjà été démontrée (Val *et al.* 2012). C'est la raison pour laquelle nous avons étudié si dans nos conditions de culture et d'exposition aux NPs, il y avait une augmentation du relargage de différents ligands de l'EGFR à savoir le TGF α et l'amphiréguline. Les conditions de culture sont les mêmes que précédemment puisque les milieux de culture sur lesquels les dosages ELISA de ces 2 ligands ont été réalisés, ont été prélevés lors des études de l'expression des transcrits.

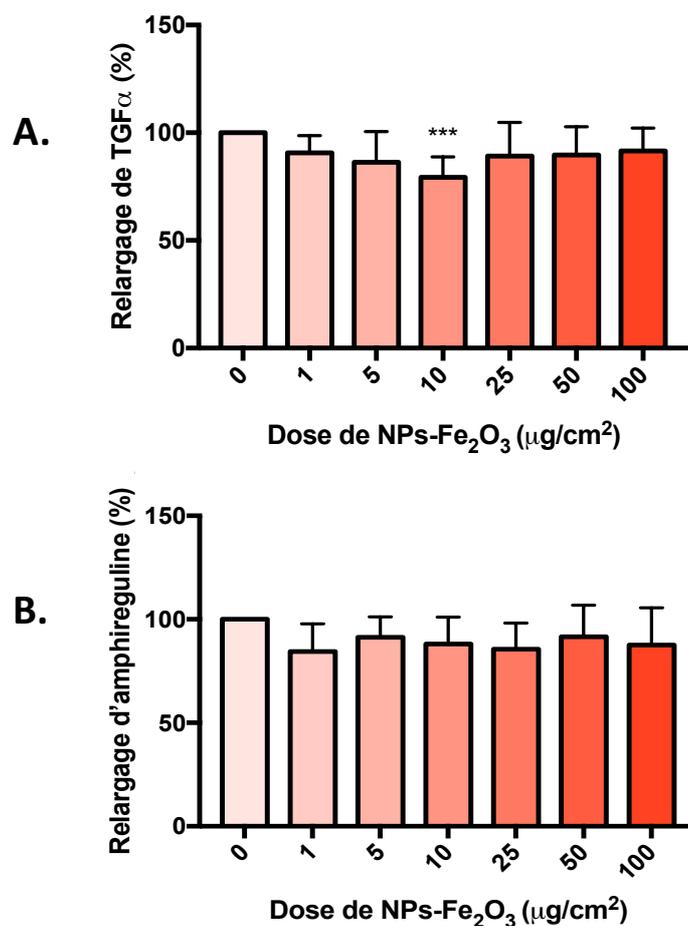


Figure V.6 : Dosage par ELISA des quantités de TGFα (A) et d'amphiréguline (B) relarguées dans les surnageants apicaux de cellules Calu-3 exposées pendant 24h aux NPs-γ-Fe₂O₃. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au témoin (100%). (Kruskall-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne ± SEM ; * : différence par rapport au témoin ; *** : p<0,001)

Après 24 h d'exposition des cultures Calu-3 à différentes doses de NPs-γ-Fe₂O₃, il n'est pas observé de modification significative du relargage tant du TGFα que de l'amphiréguline (Figure V.6). Les niveaux constitutifs de production sont respectivement d'environ 50 et 1000 pg/mL pour le TGFα et l'amphiréguline.

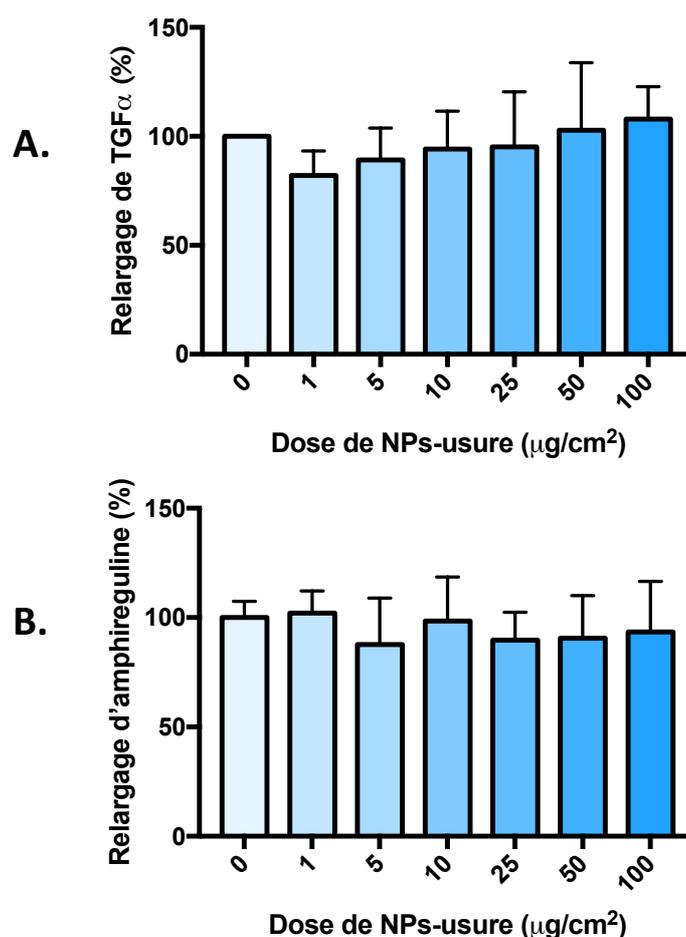


Figure V.7 : Dosage par ELISA des quantités de TGFα (A) et d'amphiréguline (B) relarguées dans les surnageants apicaux de cellules Calu-3 exposées pendant 24h aux NPs-γ-Fe₂O₃. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au témoin (100%). (Kruskal-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne ± SEM ; * : différence par rapport au témoin ; *** : p<0,001)

L'étude avec les NPs-usure aboutit aux mêmes résultats : il n'y a pas d'augmentation du relargage de l'amphiréguline et du TGFα après 24 h d'exposition à différentes doses de NPs.

En résumé, les relargages de TGFα et d'amphiréguline par les cultures Calu-3 restent inchangés après 24 h d'exposition tant aux NPs-γ-Fe₂O₃ qu'aux NPs-usure.

Ces résultats suggéreraient que la voie de l'EGFR ne serait pas impliquée dans l'induction de *MUC5AC* par les NPs. Néanmoins afin de vérifier ces résultats, nous avons utilisé une autre approche basée sur l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique ou d'un anticorps bloquant la liaison de ligands à l'EGFR.

Implication de la voie EGFR : Inhibition pharmacologique et immunologique

Afin de déterminer si l'expression de *MUC5AC* dans les cellules Calu-3 exposées aux NPs est sous le contrôle de la voie de signalisation du récepteur à l'EGF, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de cette voie, l'AG1478 (Figure V.8.B). L'AG1478 est une tyrphostine qui inhibe l'activité tyrosine kinase du récepteur et prévient ainsi toute signalisation en aval. Puis, afin de déterminer les modalités de l'activation du récepteur, nous avons utilisé un anticorps neutralisant c'est à dire qui bloque la fixation des ligands sur le récepteur (Figure V.8.C). Ceci doit permettre de déterminer si l'activation du récepteur est dépendante de la fixation d'un ligand ou si elle est indépendante de ces ligands comme cela a déjà été montré pour les espèces activées de l'oxygène (Figure V.8.A). (Burgel *et al.* 2004)

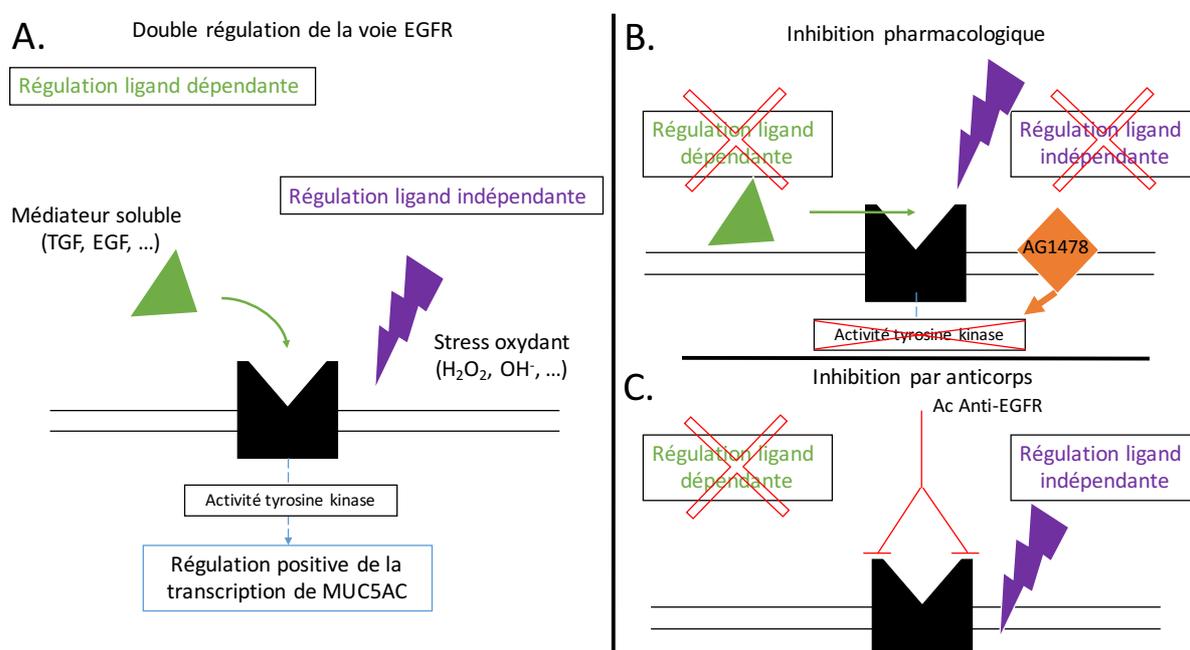


Figure V.8 : La voie de signalisation du récepteur à l'EGF (EGFR) et les outils d'étude des modalités de son activation (adapté de Burgel *et al.* 2004)

8A : Le récepteur à l'EGF (EGFR) peut être activé par la fixation de ses ligands tels que le TGF α , l'EGF, l'amphiréguline, mais aussi de façon indépendante de ses ligands en condition de stress oxydant. Son activation engendre une cascade de signalisation en aval qui va conduire à l'expression du gène *MUC5AC*

8B : approche méthodologique pour déterminer le rôle de l'EGFR dans l'expression de *MUC5AC* grâce à l'utilisation de l'AG1478. Cet inhibiteur va inactiver l'activité tyrosine kinase du récepteur engendrant ainsi un blocage des deux voies d'activation possibles.

8C : approche méthodologique pour déterminer le rôle de l'EGFR dans l'expression de *MUC5AC* grâce à l'utilisation d'un anticorps neutralisant. La fixation de l'anticorps engendre un empêchement stérique qui bloque toute possibilité de fixation au récepteur bloquant ainsi la voie ligand dépendante d'activation d'EGFR.

Les cellules Calu-3 ont été pré-exposées pendant 30 minutes à l'AG1478 (10 μ M) ou à l'anticorps neutralisant l'EGFR (0,5 μ g/mL) puis les NPs ont été ajoutées pendant 24h à l'issue desquelles l'expression des transcrits et de la protéine MUC5AC ont été évalués selon

les mêmes méthodes que celles utilisées précédemment. L'étude s'est focalisée sur l'exposition à 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs, dose pour laquelle un effet significatif a été observé à la fois sur l'expression des transcrits et de la protéine MUC5AC.

L'AG1478, antagoniste du récepteur EGFR, a été utilisé pour bloquer son activation et donc la production de MUC5AC si celle-ci est dépendante de la voie de l'EGFR. En parallèle, l'AG9 (10 μM), forme inactive de l'AG1478 a été utilisé pour vérifier la spécificité d'action de ce dernier. Les résultats présentés en Figure V.9 montrent qu'en présence d'AG1478, l'expression de *MUC5AC* est totalement abolie après exposition tant aux NPs-usure qu'aux NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Cette abolition significative est sélective et validée par le fait que l'AG9 (forme inactive d'AG1478) n'entraîne pas de changement significatif de l'expression de *MUC5AC* lorsque les cellules sont exposées soit aux NPs-usure ou aux NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Ces données démontrent que l'expression de *MUC5AC* induite par les 2 types de NPs est dépendante de la voie de l'EGFR.

Nous avons ensuite utilisé un anticorps neutralisant l'EGFR afin de bloquer l'activation du récepteur par la fixation d'un ligand. Afin de contrôler la spécificité de cet anticorps, nous avons également utilisé un anticorps non spécifique de souris (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les résultats présentés en Figure V-9A montrent que l'utilisation de l'anticorps neutralisant l'EGFR entraîne une baisse significative de l'expression de *MUC5AC* après exposition tant aux NPs-usure qu'aux NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ mais avec un effet plus important pour les premières. Cette diminution significative est sélective et validée par le fait que l'utilisation d'un anticorps non spécifique n'entraîne pas d'effet significatif de l'expression de MUC5AC dans les conditions expérimentales de l'étude. Ces résultats sont similaires lorsque l'on considère l'expression protéique (figure V-9B). Ces résultats indiquent que la hausse d'expression de *MUC5AC* induite par l'exposition aux NPs est dépendante de la voie EGFR dont l'activation est en grande partie liée à la fixation de ligands.

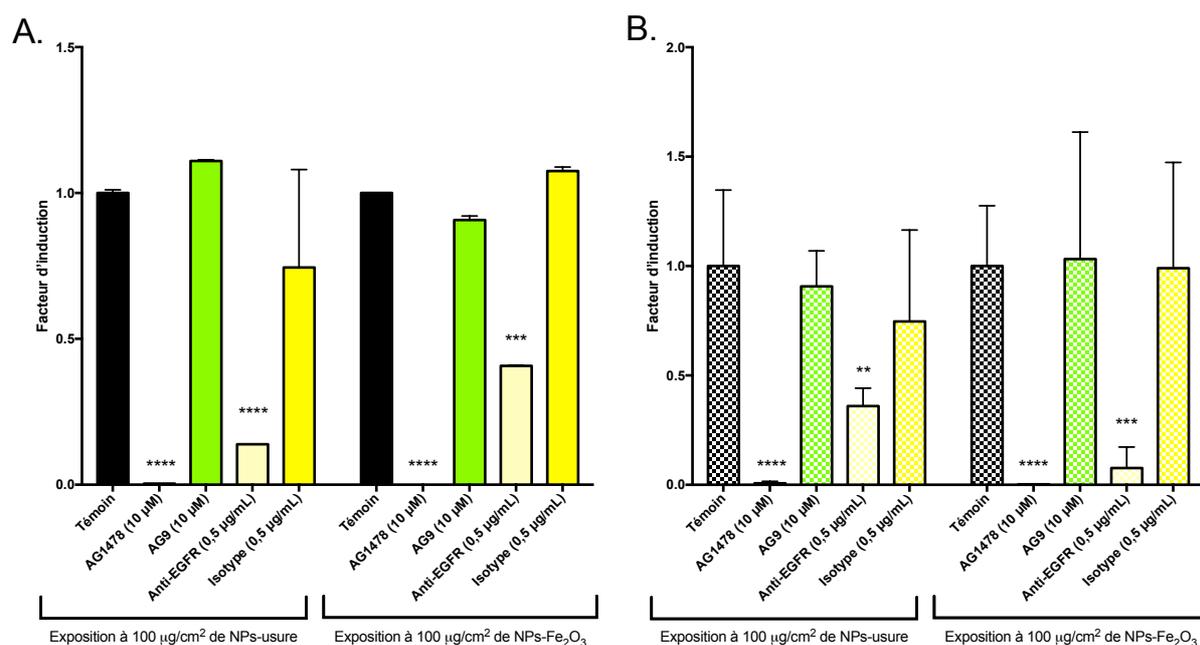


Figure V.9 : Niveau d'expression des transcrits (A) et de la protéine MUC5AC (B) au niveau de l'épithélium Calu-3 après 24 h d'exposition aux NPs- γ -Fe₂O₃ et NPs-usure. Les nanoparticules ont été appliquées sur les cultures en présence d'inhibiteurs spécifiques de la voie EGFR introduits dans le milieu de culture 30 minutes avant les nanoparticules (Kruskall-Wallis ; n=6 ; N=3 ; Moyenne \pm SEM ; * : différence par rapport au témoin ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 ; **** : p<0,0001)

3. Discussion

Nous avons mis en évidence que les NPS- γ -Fe₂O₃ et les NPs-usure induisent l'expression des transcrits MUC5AC et de la protéine MUC5AC dans les cellules Calu-3 après 24h de traitement. La capacité de nanoparticules à réguler l'expression de MUC5AC par des cellules respiratoires a déjà été observée pour d'autres types de nanoparticules métalliques, notamment d'oxyde de cuivre (CuO). Ainsi, Ko *et al.* ont montré que les NPs CuO induisent l'expression de MUC5AC dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée NCI-H292) (Ko *et al.* 2016). La même équipe a également démontré que ces NPs CuO après instillation intranasale chez la souris, induisent la production de mucus et de façon plus importante chez des souris rendues asthmatiques (Park *et al.* 2016). De plus dans ces 2 études, la contribution de la voie de signalisation des MAPK dans l'expression de MUC5AC a été confirmée. Ces données sont cohérentes avec nos résultats car l'activation des MAPK est en aval de l'activation de l'EGFR.

Nous avons également mis en évidence que la régulation transcriptionnelle de MUC5AC par les NPS- γ -Fe₂O₃ et NPs-usure dans les cellules Calu-3 implique la voie de l'EGFR.

En effet, grâce à l'utilisation de l'AG1478, inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, nous avons constaté une inhibition totale de l'expression de *MUC5AC* induite par les NPs. De plus en utilisant l'anticorps neutralisant l'EGFR, nous avons observé une baisse de l'expression de *MUC5AC* permettant de conclure que l'activation de l'EGFR par les NPs passe en partie par la fixation de ligands. Pourtant de façon surprenante, les dosages de TGF α et de l'amphiréguline n'ont pas montré d'augmentation du relargage de ces ligands de l'EGFR lors de l'exposition des cellules aux NPs. Il ne s'agit peut-être pas des ligands de l'EGFR impliqués dans l'activation de ce récepteur par les NPs. Il serait donc souhaitable de doser les autres ligands tels que l'EGF et l'épiréguline. Pour exclure totalement le rôle potentiel de l'amphiréguline et du TGF α , il faudrait refaire une expérience en utilisant des anticorps dirigés contre ces protéines. L'expression de *MUC5AC* par les NPs n'étant pas totalement inhibée lors de l'incubation avec l'anticorps neutralisant l'EGFR, ceci suggère que ce récepteur pourrait également être activé en l'absence de ligands et en l'occurrence à cause d'un stress oxydant. Afin de tester cette hypothèse, il serait nécessaire de refaire l'expérience avec des anti-oxydants.

Nous avons constaté que l'induction de l'expression des transcrits *MUC5AC* par les NPs se produit uniquement à une forte concentration de NPs alors que celle de la protéine *MUC5AC* apparaît dès les faibles concentrations testées et augmente de façon concentration dépendante. Ceci pourrait signifier qu'en dehors d'une régulation transcriptionnelle, une régulation traductionnelle et/ou post-traductionnelle puisse également être provoquée par l'exposition aux NPs. L'absence de corrélation entre l'ARNm et la protéine *MUC5AC* a déjà été observée (Bonser et Erle, 2017). Par ailleurs l'accumulation de la protéine *MUC5AC* dans les cellules exposées aux NPs pourrait être liée à un défaut de sécrétion de la protéine. L'exocytose des granules sécréteurs fait intervenir le cytosquelette (Davidovich *et al.* 2010) et des études protéomiques réalisées sur des cellules alvéolaires exposées à des NP de SiO₂ ont montré une modulation de l'expression de protéines impliquées dans l'organisation et la régulation du réseau d'actine (Okoturo-Evans *et al.* 2013). La sécrétion de *MUC5AC* est contrôlée par le calcium. Chen *et al* ont montré que les NPs de TiO₂ stimulent la sécrétion des mucines par des cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée ChaGo-K1) et que c'était associé à une augmentation intracellulaire de Ca²⁺ (Chen *et al.* 2011). Afin de déterminer si les NPs modulent la quantité de *MUC5AC* secrétés, nous avons essayé de la doser, mais la taille de cette glycoprotéine rend difficile la réalisation des électrophorèses et nos travaux préliminaires n'ont pas donné de résultats concluants.

Plusieurs études ont montré que l'environnement cytokinique inflammatoire est déterminant dans le niveau de production de mucus. Dans les études de Ko et Park, citées plus haut, la production de mucus induite par les NPs de CuO est associée à un état inflammatoire (Ko *et al.* 2016, Park *et al.* 2016). Cependant dans nos conditions, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation du relargage des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et TNF α lors de l'exposition des cellules Calu-3 aux NPs-usure et NPs- γ -Fe $_2$ O $_3$.

L'induction de l'expression des transcrits se produisant à des doses différentes de celles de la protéine et l'absence d'induction de la sécrétion de ligands de l'EGFR et de médiateurs pro inflammatoires constituent un faisceau d'indices qui suggèrent qu'en plus de la régulation transcriptionnelle de *MUC5AC* par les NPS, d'autres niveaux de régulation puissent intervenir lors de la maturation et la sécrétion de la protéine. Compte-tenu de la complexité de ces processus avec par exemple l'intervention d'une vingtaine de médiateurs dans le processus de sécrétion des granules de mucus, des travaux supplémentaires seront nécessaires pour conforter ces hypothèses.

Chapitre VI :

Impact de l'exposition aux nanoparticules sur la réparation de la barrière épithéliale respiratoire

1. Introduction et concept

L'épithélium respiratoire constitue une interface entre le milieu extérieur et la circulation systémique. Cependant, l'air inhalé n'est jamais pur mais est plus ou moins chargé en microorganismes, particules et espèces chimiques susceptibles d'induire des agressions. Des agressions répétées et/ou sévères peuvent mener à la mort cellulaire et à la perte d'intégrité de la barrière respiratoire. Un processus de réparation se met alors en place pour reconstruire l'épithélium respiratoire lésé (Coraux *et al.* 2005).

La réparation épithéliale est un processus complexe comme évoqué dans le Chapitre I.5.b. En effet, pour aboutir à la remise en place d'une barrière fonctionnelle, on assiste à une migration des cellules saines en bordure de la zone lésée pour combler rapidement l'espace laissé vacant ainsi qu'à une prolifération cellulaire compensatrice. Ces processus sont stimulés par plusieurs dizaines de médiateurs (Coraux *et al.* 2005).

L'exposition aux particules étant chronique, ces dernières peuvent s'accumuler dans les cellules. L'encombrement du cytoplasme par les NPs internalisées est susceptible de perturber les fonctions du cytosquelette impliqué dans les processus de migration cellulaire et de prolifération. Notre objectif a été de déterminer dans quelle mesure un épithélium surchargé en NPs est capable d'assurer sa fonction de réparation (Figure VI.1).

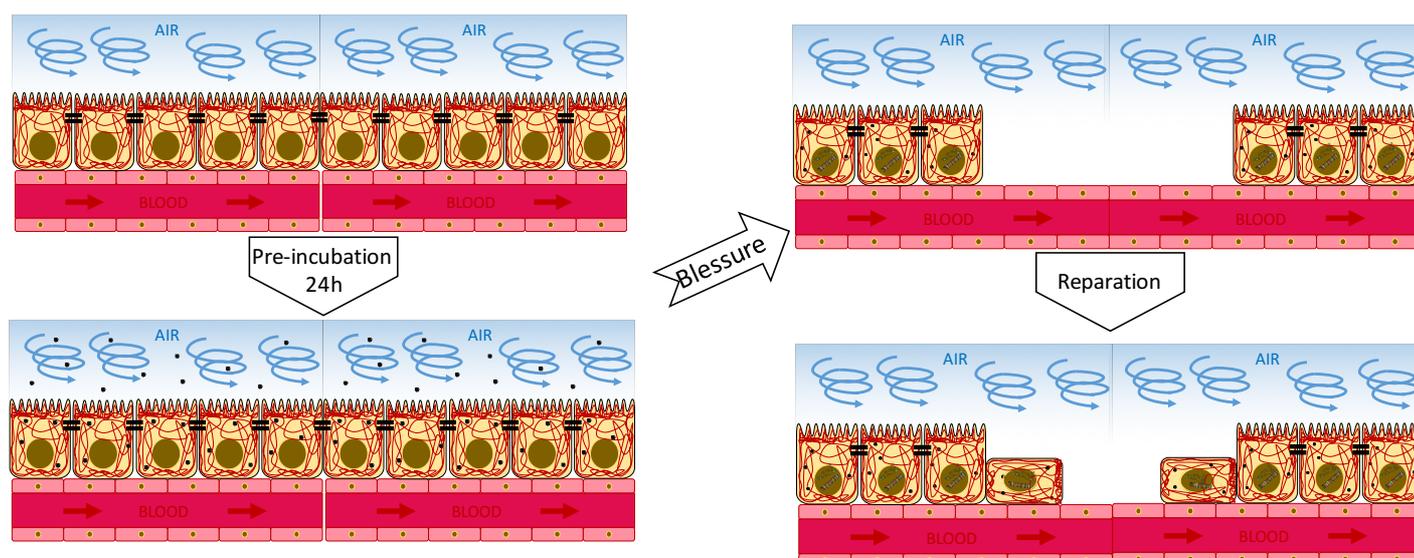


Figure VI.1 : Effets de l'exposition aux nanoparticules sur la réparation de l'épithélium respiratoire humain. L'accumulation de NPs dans les cellules épithéliales exposées chroniquement aux NPs est susceptible de moduler leurs capacités de réparation. La présence de NPs internalisées pourrait altérer le fonctionnement des éléments du cytosquelette (microfilaments d'actine, microtubules) impliqués dans la mobilité et division cellulaire.

Dans ce but, les cellules Calu-3 en culture 3D ont été exposées pendant 24h à une gamme de concentrations de NPs-usure et NPs- γ -Fe₂O₃, puis une blessure a été réalisée dans le tapis épithélial. La migration cellulaire a été suivie par vidéomicroscopie afin de déterminer s'il y avait des modifications de la vitesse de réparation épithéliale. La prolifération cellulaire a été évaluée par l'étude de l'incorporation de BrdU, un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en phase S du cycle cellulaire et qui est donc annonciateur de la division cellulaire.

2. Résultats

a. Etude de la vitesse de réparation épithéliale

Afin d'étudier la vitesse de réparation de l'épithélium respiratoire, une étude de vidéomicroscopie a été entreprise. Afin de réaliser cette étude, les épithéliums Calu-3 cultivés 14 jours en TW ont été exposés 24 heures aux nanoparticules. Ensuite, une blessure a été réalisée dans le tapis épithélial et l'évolution de cette blessure a été suivie par vidéomicroscopie pendant 72 heures.

Mise au point de la méthode de vidéomicroscopie

Compte-tenu du mode de culture en 3D des cellules Calu-3, nous avons dû dans un premier temps mettre au point la méthodologie qui devait s'adapter à la présence de la membrane du TW.

La membrane sur laquelle les cellules sont cultivées, imperméable à la lumière, ne permet pas une observation des cellules en transmission. C'est pourquoi l'incorporation d'un marqueur fluorescent a été entreprise. Deux types de marqueurs ont été testés (Figure VI.2) : le CellTrace™ et le Cell Tracker™. Il s'agit de composés qui ont la capacité de pénétrer dans les cellules où ils sont ensuite transformés en composés qui restent séquestrés dans la cellule et sont transmis aux cellules filles. Notre choix final s'est porté sur le CellTracker™ en raison de sa photosensibilité plus faible et de son meilleur contraste. L'intérêt de ce composé est i) qu'il n'est pas toxique et permet ainsi de suivre les cellules sur plusieurs jours, ii) qu'il est stable c'est-à-dire que sa photosensibilité est réduite et qu'il n'y a donc pas d'atténuation importante de la fluorescence sur la durée du test iii) qu'il est transmis aux cellules filles en cas de prolifération. Ce dernier point n'était pas dommageable pour l'étude car ce n'est pas l'intensité de fluorescence du tapis qui était mesurée mais l'aire non couverte de cellules.

Afin d'obtenir la meilleure résolution lors de l'observation de la réparation épithéliale, un microscope Plein Champ équipé d'une caméra grand angle a été utilisé. C'était le seul dispositif disponible à la plateforme ImagoSeine de l'Institut Jacques Monod qui était compatible avec l'observation sur *Transwell*®.

Enfin nous avons dû travailler à l'obtention d'une blessure reproductible réalisable sans altérer la membrane, support de la culture cellulaire. Deux types de blessure ont été testés : une blessure chimique à l'aide d'1 μL NaOH concentré et une blessure mécanique à l'aide d'une pointe de cône de 100 μL (Figure VI.2). Malgré le faible volume de NaOH utilisé, la zone lésée représente une surface importante. Les deux bords de la blessure chimique ne sont alors pas observables simultanément dans le champ optique et ne permettent pas de mesurer la vitesse de réparation de manière optimale. De plus, la blessure chimique peut altérer la membrane de culture et induire des effets cytotoxiques aux cellules situées en périphérie de la blessure. Par contre, l'utilisation d'une pointe de cône couplée à une pompe pour réaliser une blessure mécanique permet l'obtention d'une blessure fine ($864 \pm 38\mu\text{m}$) et le maintien de l'intégrité de la membrane support et des cellules en bordure de la blessure car les cellules lésées sont éliminées par aspiration. C'est cette méthode que nous avons retenu.

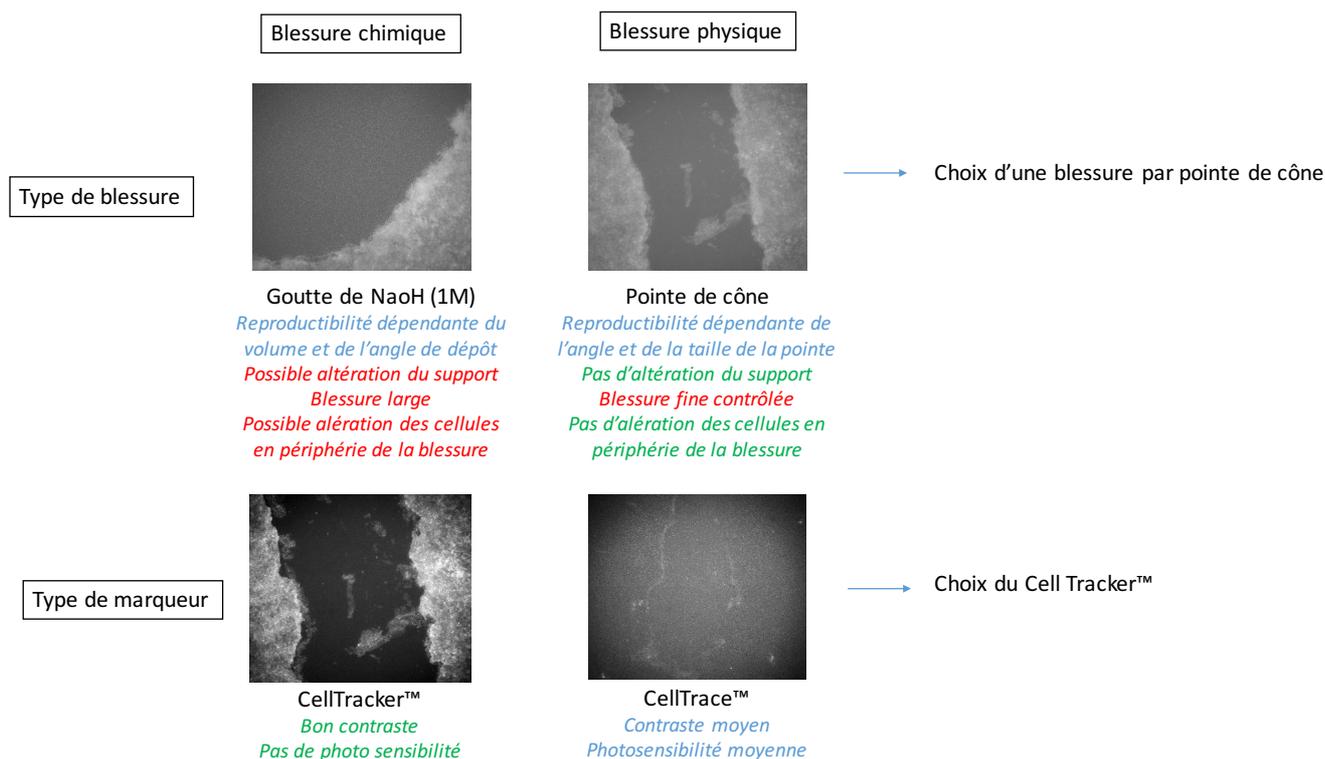


Figure VI.2 : Stratégie expérimentale mise en œuvre pour les observations en vidéomicroscopie. Pour le type de blessure, il a été choisi de réaliser une blessure grâce à une pointe de cône car ce type de blessure n'engendre pas d'atteinte ni du support, ni des cellules en périphérie de blessure. Par ailleurs, la blessure physique offre une meilleure résolution d'observation et une meilleure reproductibilité que la blessure chimique. Pour le type de marqueur fluorescent, il a été choisi d'utiliser le Cell Tracker™ qui offre un bon contraste et n'est pas photosensible donc permet des observations microscopiques de longue durée.

Les épithéliums cultivés 14 jours en TW et pré-exposés 24 heures aux nanoparticules NPs- γ -Fe₂O₃ et NPs-usure ont donc été marqués grâce au Cell Tracker™ puis blessés grâce à une pointe de cône de 100 μ L. La blessure obtenue permet une observation de la réparation épithéliale toutes les 30 minutes pendant 72 heures sans atténuation de la fluorescence jusqu'à cicatrisation de la blessure.

Afin de quantifier, la vitesse de réparation de la blessure, une méthode de quantification de l'aire de la blessure en fonction du temps a été entreprise. La grande quantité de données à traiter a nécessité la mise en place d'un processus de quantification automatique dont le principe est présenté en Figure VI.3.

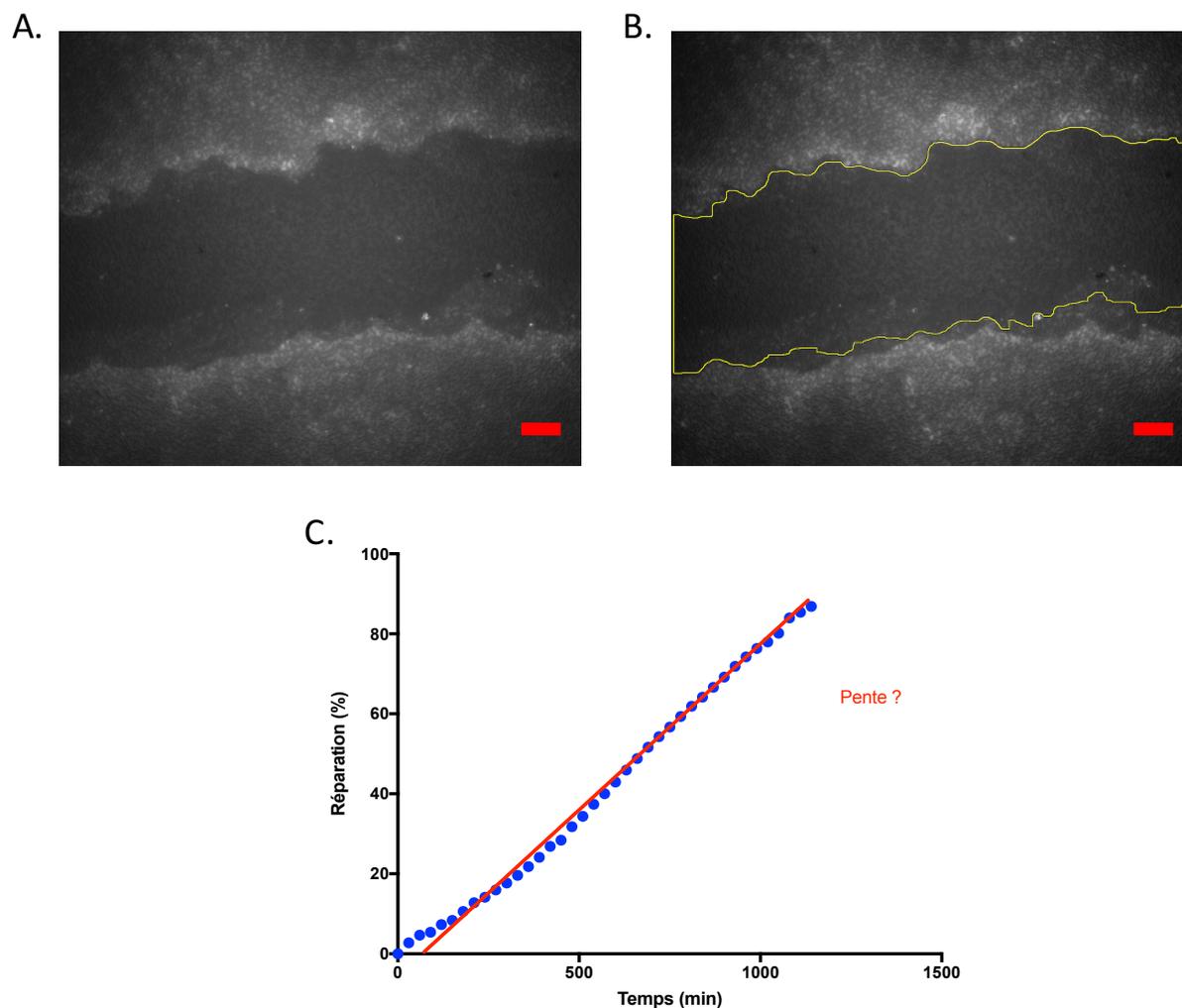


Figure VI.3 : Détermination de la vitesse de réparation épithéliale. Les images obtenues par le microscope plein champ (A) sont détournées automatiquement grâce à une méthode d'analyse focalisée sur la texture. En effet, la membrane de culture et le tapis cellulaire ne renvoient pas la même intensité de lumière ce qui permet de les différencier en terme de « texture » (B). L'aire mesurée au cours du temps est transformée en pourcentage de réparation afin de connaître la vitesse de réparation au cours du temps grâce à une approximation de la dérivée de la phase linéaire de réparation (C). (Echelle : 100 μm)

L'ensemble de ces mises au point, nous a conduit à définir le protocole suivant pour l'étude des effets des NPs : Les épithéliums cultivés 14 jours en TW et pré-exposés 24 heures aux nanoparticules NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et NPs-usure ont été marqués grâce au Cell Tracker™ puis blessés grâce à une pointe de cône de 100 μL . La culture est observée par un microscope Plein Champ équipé d'une caméra grand angle et d'une enceinte thermostatée. La réparation épithéliale est suivie toutes les 30 minutes pendant 72 heures jusqu'à cicatrisation de la blessure. La vitesse de comblement de la blessure est mesurée par analyse d'image par mesure de l'aire de la blessure au cours du temps.

Vitesse de réparation des épithéliums pré-exposés aux nanoparticules.

Le suivi de la réparation tout comme l'examen des vitesses de réparation dans les épithéliums témoins et exposés à des doses croissantes de NPs- γ -Fe₂O₃ et NPs-usure sont présentés en Figure VI.4. Les images présentées en Figure VI.4 A et B montrent l'évolution de la réparation épithéliale à différents intervalles de temps. Ces images ayant été réalisées avec des épithéliums exposés aux plus fortes doses de NPs- γ -Fe₂O₃ et NPs-usure, il est possible d'identifier la présence de particules sur les images. Les différentes photographies permettent de voir que l'épithélium de cellules Calu-3 est capable de refermer une blessure induite par action mécanique en une trentaine d'heures. La cinétique de réparation est liée à la surface initiale de la blessure. C'est pourquoi, une normalisation par rapport à la taille initiale de la blessure est intégrée dans le processus de traitement.

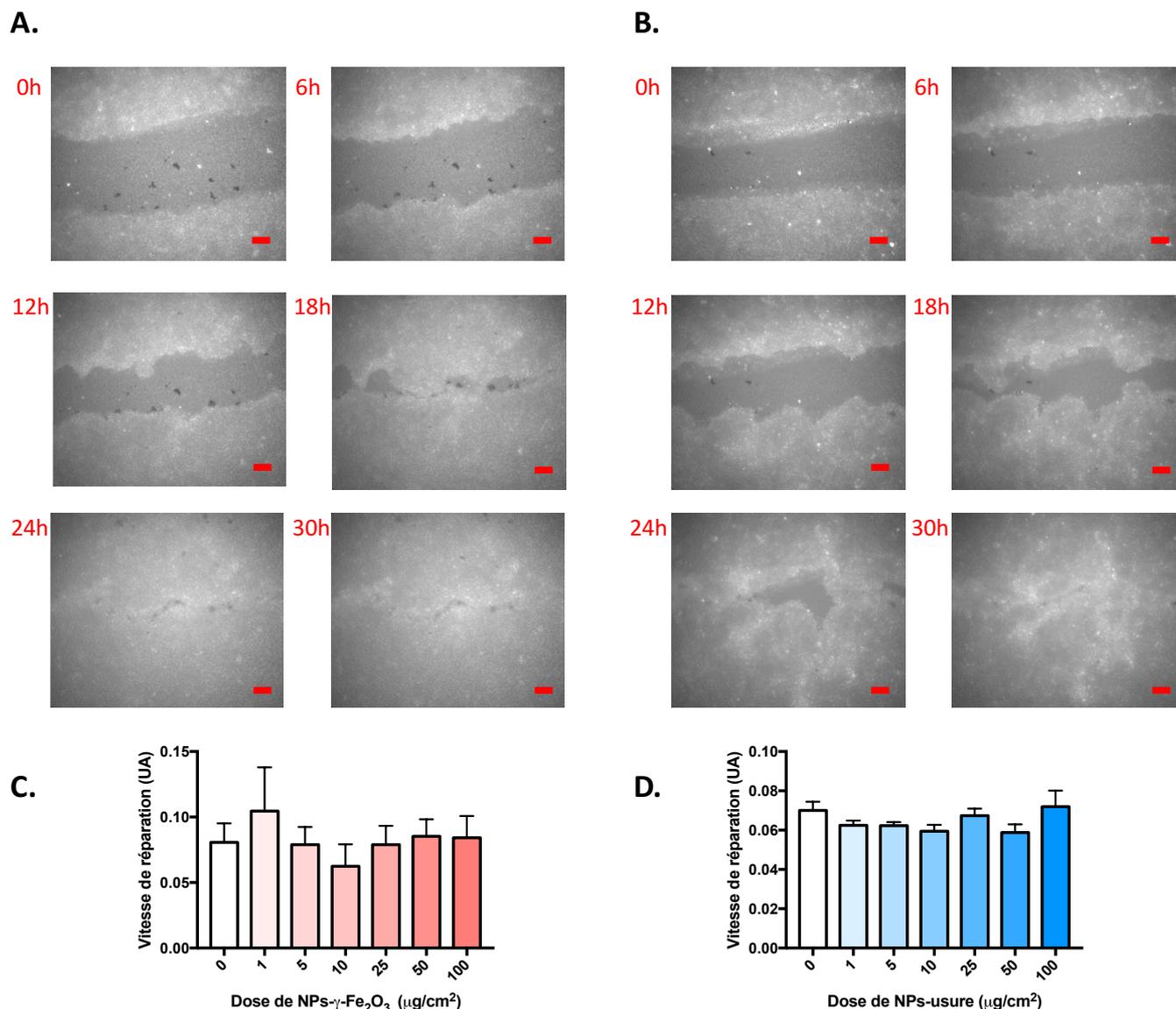


Figure VI.4 : Etude de la vitesse de réparation épithéliale des épithéliums Calu-3 préalablement exposés à différentes doses de NPs- γ -Fe₂O₃ (A,C) et NPs-usure (B,D). Suivi vidéomicroscopique de la réparation des épithéliums exposés à la plus forte dose (100 μ g/cm²) respectivement de NPs- γ -Fe₂O₃ (A) et de NPs-usure (B) sur microscope plein champ (10X, Echelle : 100 μ m). La quantification de la vitesse de réparation a été réalisée grâce à la méthode de quantification préalablement décrite. (Moyenne \pm SD, Kruskal-Wallis, N=3, n=3, UA = % de réparation par minute).

La comparaison des vitesses de réparation montre que la présence de particules n'engendre pas de modification cinétique du phénomène de réparation épithéliale. En effet, la pré-exposition de 24 heures tant aux NPs-Fe₂O₃ qu'aux NPs-usure n'entraîne pas de modification de la vitesse de réparation de l'épithélium par rapport à un épithélium non exposé aux NPs.

En résumé, l'exposition des épithéliums respiratoires Calu-3 aux nanoparticules, tant les NPs-usure que les NPs- γ -Fe₂O₃, n'entraîne pas de changement significatif de la vitesse de réparation épithéliale après blessure.

b. Etude de la prolifération cellulaire

La réparation épithéliale fait intervenir à la fois un phénomène de migration et étalement des cellules en bordure de la zone lésée puis un phénomène de prolifération pour compenser les pertes cellulaires. Nous n'avons pas observé de modulation dans la vitesse de réparation de la blessure induite après exposition ou non à des NPs suggérant qu'il n'y a pas d'atteinte du processus de mobilité cellulaire.

Afin d'estimer si la prolifération cellulaire est activée, nous avons quantifié les cellules entrées en phase S identifiées par l'incorporation de BrdU. Le BrdU a été appliqué sur les cellules après la réalisation de la blessure puis les épithéliums ont été fixés à différents intervalles de temps (1, 4, 6, 10 et 16h) afin de déterminer à partir de quand les cellules se mettent à proliférer. Nous avons au préalable vérifié que sur un épithélium non blessé, le taux d'incorporation de BrdU est très faible (0,5 %) traduisant l'état quiescent des cellules dans la barrière épithéliale Calu-3 intacte.

Suspectant que le comportement des cellules proches de la blessure puisse être différent des cellules plus éloignées, nous avons quantifié les cellules BrdU positives à partir de 5 champs d'images prises au microscope confocal soit en bordure de la blessure soit en périphérie de la culture comme l'illustre la Figure VI.5.

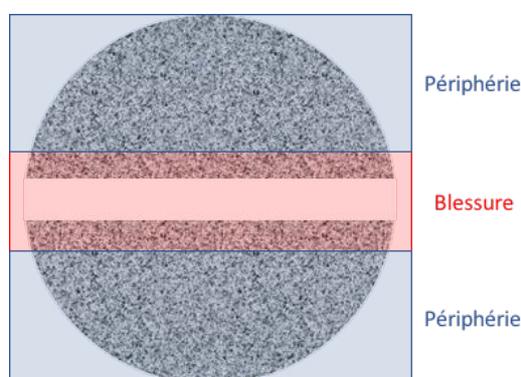


Figure VI.5 : Représentation schématique des zones épithéliales étudiées. Des observations rapides de microscopie ayant traduit une différence du marquage entre la zone frontalière de la blessure et le tapis épithélial plus lointain, les deux zones ont été étudiées séparément.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'incorporation de BrdU dans une culture témoin c'est à dire blessée mais non pré-exposée aux NPs (Figure VI.6). Il s'agissait de caractériser le profil de réponse de l'épithélium Calu-3 en conditions basales dans les 2 zones considérées, indépendamment d'une pré-exposition particulière.

Les images représentatives présentées en Figure VI.6.A montrent une différence très nette entre la zone « Blessure » et la zone « Périphérie » dès la première heure de réparation. En effet, cette dernière montre une proportion de noyaux marqués par le BrdU beaucoup plus importante que les cellules à proximité de la lésion. L'activation du cycle cellulaire est donc un phénomène qui se met rapidement en place après la blessure mais qui ne concerne dans un premier temps que les cellules distantes de la lésion. Les cellules de la zone « Blessure » ne montrent une proportion importante de noyaux marqués qu'à partir de 6h. Une différence d'intensité de marquage des noyaux est remarquable sur ces images. Nous suggérons, que ce phénomène traduit pour les noyaux les plus marqués une incorporation du BrdU pendant toute la phase S et pour les noyaux ayant un marquage punctiforme, une incorporation du BrdU dans des cellules en cours de phase S.

La quantification des cellules marquées par le BrdU présentée Figure VI.6.B, corrobore les observations faites sur les images. Pour les cellules en bordure de la blessure, l'incorporation du BrdU ne devient significative qu'à partir de 6 h avec 10% de noyaux marqués et augmente jusqu'à 16h avec 38% de noyaux marqués sans toutefois atteindre le même niveau que celui observé pour les cellules plus éloignées de la blessure. Pour ces dernières dès 1 h après la blessure, il y a 24% de noyaux marqués et ce pourcentage monte à 60% à 16h. Une différence significative de marquage entre la zone dite « Blessure » et la zone « Périphérie » est systématiquement observée quel que soit le temps d'observation.

Cette différence de marquage témoigne de la prédominance dans un premier temps de la migration pour les cellules bordant la blessure afin de combler la zone dénudée. Puis au fil des heures, il y a une augmentation significative du marquage cellulaire au BrdU traduisant le recours à une division cellulaire pour remplacer les cellules éliminées lors de la lésion. Cette prolifération compensatrice est également assurée par les cellules éloignées de la blessure qui très rapidement rentrent dans le cycle cellulaire. Cependant, le taux de division cellulaire reste significativement inférieur dans la zone « Blessure » comparativement à la zone « Périphérie ».

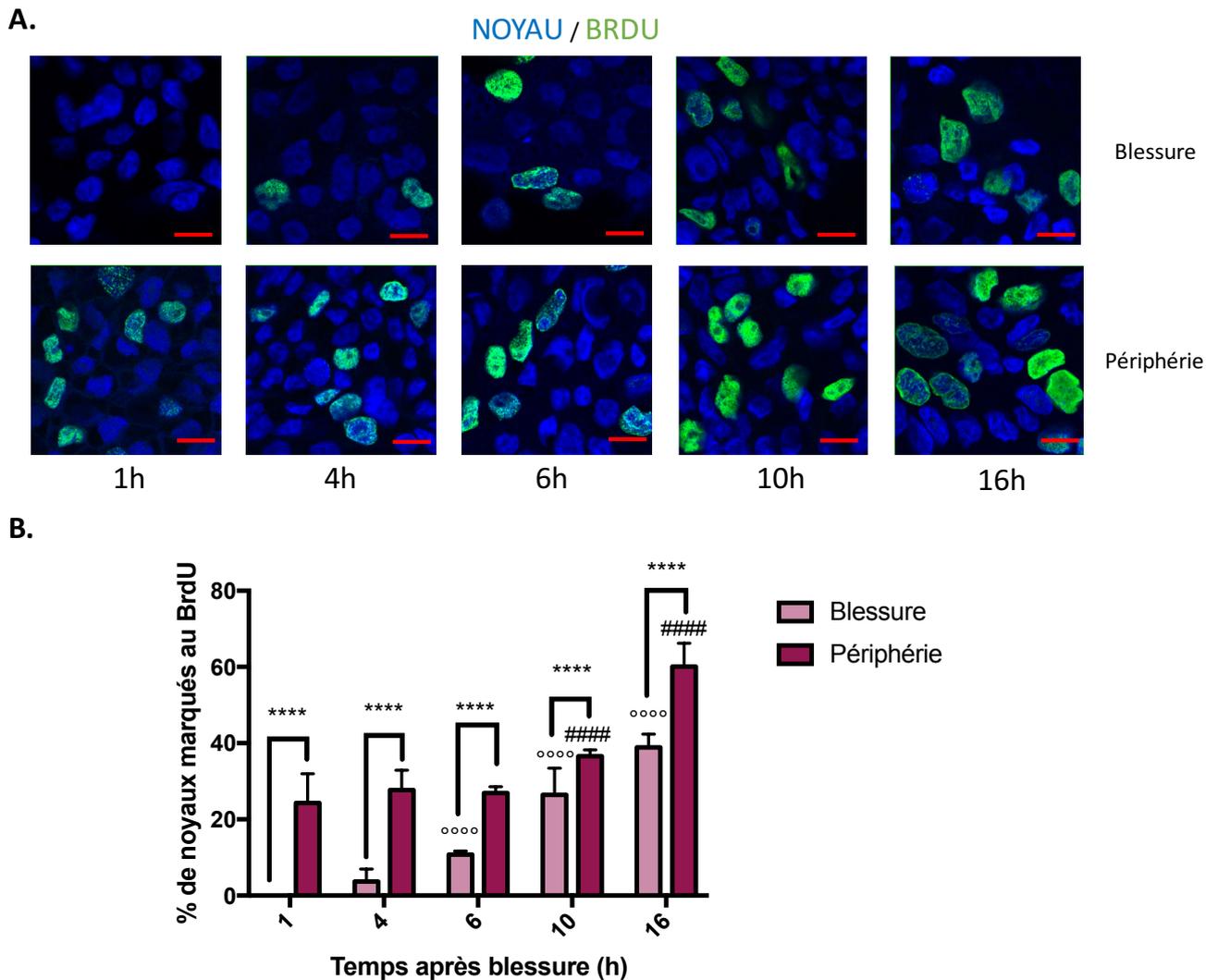


Figure VI.6 : Etude du phénomène de division cellulaire par incorporation de BrdU lors de la réparation d'épithéliums de cellules Calu-3 après blessure.

VI.6.A : Images représentatives de la condition témoin. Le marquage vert correspond au BrdU et le bleu aux noyaux révélés par le DAPI. Ces images prises au microscope confocal correspondent à une coupe optique de 0,65 μm , coupe centrale issue d'un Z-stack de 9 coupes. (Echelle : 10 μm)

VI.6.B : Niveau d'incorporation du BrdU en fonction du temps, déterminé après analyse quantitative des images acquises en microscopie confocale. (One-way ANOVA post test de Dunett ; N=3 champs de n= 19 +/- 4 cellules ; Moyenne \pm SD ; Objectif : 40X – immersion à huile ; * : différence en facteur « zone » ; #/° : différence par rapport au témoin à T=1h ; ****/####/°°°° : p<0,0001)

Ayant bien caractérisé les événements qui se produisent dans un épithélium témoin, nous avons ensuite entrepris d'étudier si ceux-ci étaient modulés dans les épithéliums blessés pré-exposés aux NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et NPs-usure. Les résultats de l'observation de l'incorporation du BrdU dans les épithéliums pré-exposés aux NPs- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et NPs-usure sont respectivement présentés en Figure VI.7 et VI. 8. Pour ne pas alourdir les figures, la condition témoin présentée en figure VI-6 n'a pas été reportée sur ces figures.

Quel soit le type de NPs, on fait le même constat que pour l'épithélium témoin à savoir que le marquage est dès les premiers temps après la blessure plus important au niveau de la zone « périphérie » que de la zone « bordure ».

Pour les épithéliums pré-exposés aux NPs- γ -Fe₂O₃ les résultats de l'analyse quantitative présentée figure IV-7 B ne montrent pas de différence significative quelle que soit la dose d'exposition avec l'épithélium témoin pour la zone « périphérie ». Par contre au niveau de la zone « bordure », une augmentation dose-dépendante significative de l'incorporation de BrdU par rapport à la condition témoin est observée au temps court de 4 h (Figure VI.7.B). Une différence significative est également observée pour la plus forte dose de 100 μ g/cm² à 16h.

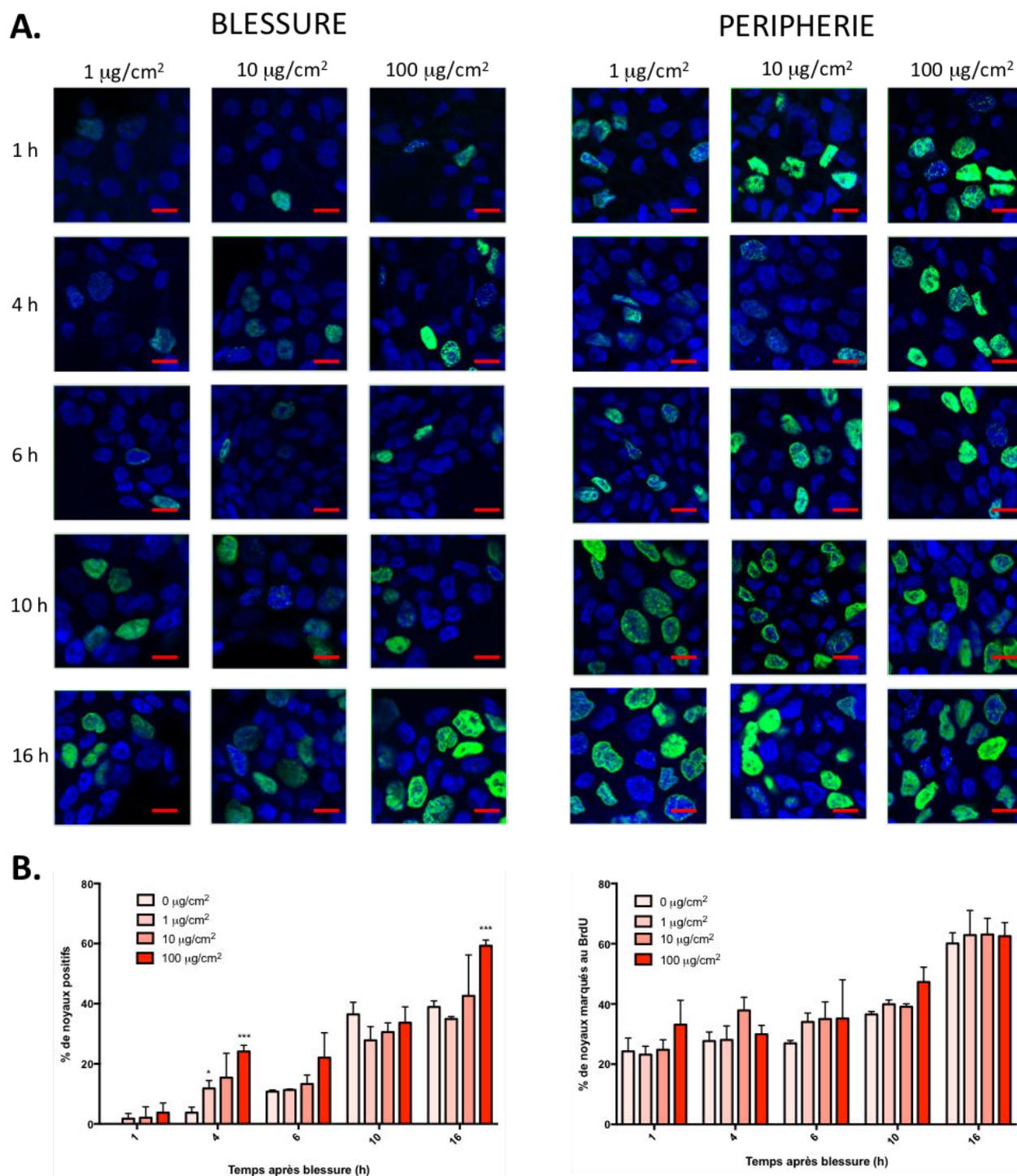


Figure VI.7 : Etude du phénomène de division cellulaire par incorporation de BrdU lors de la réparation d'épithéliums de cellules Calu-3 après blessure précédée de 24h d'exposition à différentes doses de NPs- γ -Fe₂O₃.

VI.7.A : Images représentatives de la réparation épithéliale à différents temps (1, 4, 6, 10, 16 h) après pré-exposition à différentes doses de NPs-g-Fe₂O₃. Le marquage vert correspond au BrdU et le bleu aux noyaux révélés par le DAPI. Ces images prises au microscope confocal correspondent à une coupe optique de 0,54 μm . (Echelle : 10 μm)

VI.7.B : Niveau d'incorporation du BrdU en fonction du temps, déterminé après analyse quantitative des images acquises en microscopie confocale. (One-way ANOVA post test de Dunett ; N=3 champs de n= 19 +/- 4 cellules)

; Moyenne \pm SD ; Objectif : 40X – immersion à huile ; * : différence par rapport au témoin (0) ; * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$)

Pour les épithéliums pré-exposés aux NPs-usure (Figure VI.8.B), de nouveau il n'est pas constaté de différence significative d'incorporation du BrdU dans la zone éloignée de la blessure par rapport à un épithélium non pré-exposé. C'est au niveau de la zone « blessure » qu'apparaissent des différences et elles sont plus marquées que celles obtenues avec les NPs- γ - Fe_2O_3 . On observe un effet dépendant de la dose pour les 3 premiers temps étudiés (1, 4 et 6 h) avec un effet significatif par rapport au témoin pour les doses de 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A 16h, aux 3 doses d'exposition, le pourcentage de noyaux marqués est significativement plus important que pour l'épithélium témoin mais ce pourcentage est similaire et d'environ 60%. Toutefois quel que soit le temps, le taux de noyaux marqués en zone « bordure » dans les épithéliums pré-exposés aux NPs-usure reste toujours significativement inférieur à celui observé en zone « périphérie ». Ces résultats suggèrent donc que dans les cultures pré-exposées aux NPs, l'activation du cycle cellulaire en proximité de la lésion est plus précoce et que le début du comblement de la blessure implique à la fois des cellules qui migrent et qui prolifèrent.

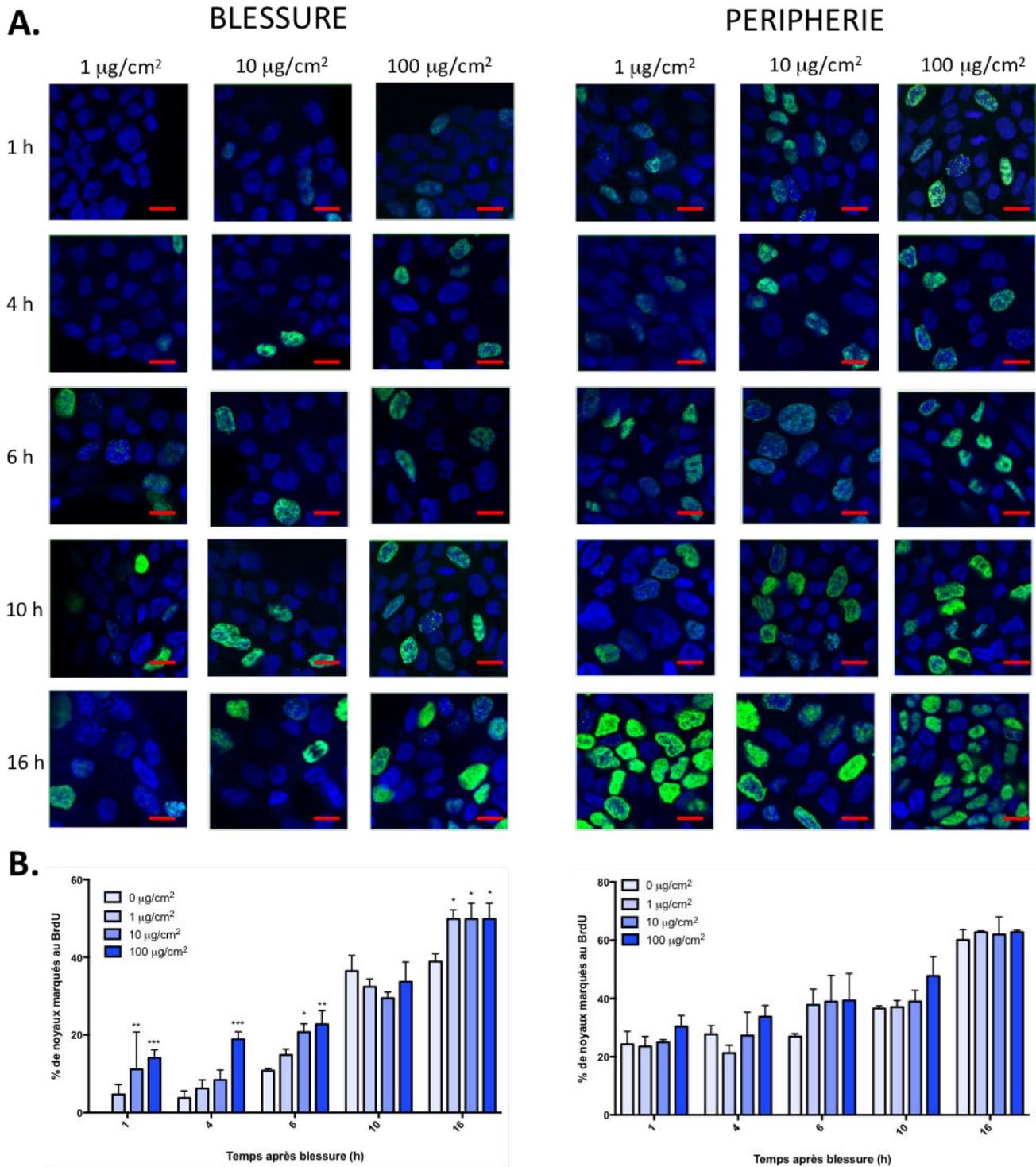


Figure VI.8 : Etude du phénomène de division cellulaire par incorporation de BrdU lors de la réparation d'épithéliums de cellules Calu-3 après blessure.

VI.8.A : Images représentatives de la réparation épithéliale à différents temps (1, 4, 6, 10, 16 h) après pré-exposition à différentes doses de NPs-g-Fe₂O₃. Le marquage vert correspond au BrdU et le bleu aux noyaux révélés par le DAPI. Ces images prises au microscope confocal correspondent à une coupe optique de 0,54 μm . (Echelle : 10 μm)

VI.8.B : Niveau d'expression de la protéine MUC5AC en fonction du temps, déterminé après analyse quantitative des images acquises en microscopie confocale. (One-way ANOVA post test de Dunnett ; N=3 champs de n= 19 +/- 4 cellules ; Moyenne \pm SD ; Objectif : 40X – immersion à huile ; * : différence par rapport au témoin (0) ; * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001)

3

En résumé, la pré-exposition des épithéliums respiratoires Calu-3 aux nanoparticules et en particulier aux NPs-usure stimule précocement l'entrée en phase S des cellules en bordure de la blessure, signe d'une activation de la prolifération cellulaire. Par contre, cette pré-exposition n'influence pas l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules éloignées de la zone lésée.

3. Discussion-Conclusion

Les études sur la réparation de l'épithélium respiratoire ont déjà été entreprises afin de comprendre les différentes étapes de ce processus et les mécanismes impliqués (Coppit *et al.* 2000, Perotin *et al.* 2014, Hsu *et al.* 2014, Decaestecker *et al.* 2006, Roth *et al.* 2010, Puchelle *et al.* 2006). Il s'agissait notamment de déterminer quelles sont les cellules impliquées dans le processus de régénération qui dans un épithélium normal concerne les cellules basales (Coraux *et al.*, 2005). Par contre nous n'avons pas identifié d'étude ayant cherché à déterminer si les NPs sont capables de perturber le mécanisme de réparation.

Nous avons mis au point un modèle de culture cellulaire 3D permettant de suivre, pendant plusieurs jours, la réparation épithéliale respiratoire après blessure. Jusqu'à présent les études de réparation *in vitro* se faisaient principalement en culture 2D dont les cellules ne présentent pas les caractéristiques de la barrière épithéliale. Nous avons donc dû tenir compte des contraintes de la culture 3D pour définir notre protocole expérimental. Afin de s'affranchir des difficultés dues aux propriétés optiques de la membrane du *Transwell*® nous avons sélectionné un marqueur fluorescent (Cell Tracker™) compatible avec la viabilité cellulaire et le suivi par fluorescence sur plusieurs jours. Il existe un large éventail de méthodes pour réaliser une blessure: brûlure, blessure chimique (acide ou base concentrés en volume réduit), blessure physique (scratching, cône, scalpel, poinçon de biopsie, plot, *etc*) (Boateng *et al.* 2008). Nous avons choisi de réaliser une blessure physique à l'aide d'une pointe de cône reliée à un dispositif d'aspiration car il permet de garantir l'intégrité de la membrane sur laquelle les cellules sont cultivées. De plus, le processus d'aspiration permet de s'assurer que la blessure est exempte de cellules mortes ou autres débris qui pourraient affecter le processus de réparation épithéliale.

Dans nos conditions d'étude, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la pré-exposition aux NPs sur la vitesse de réparation épithéliale des cellules Calu-3. Notre hypothèse était

que l'encombrement du cytoplasme par les NPs soit susceptible de perturber la mobilité cellulaire. Si dans nos conditions d'étude nous n'avons pas vu d'effet, il est possible que l'exposition n'ait pas été suffisamment importante en termes de doses ou de durée d'exposition permettant une accumulation conséquente de NPs. Aussi afin de pouvoir conclure définitivement à un impact potentiel des NPs sur le processus de migration, il conviendrait de renouveler l'étude sur des épithéliums exposés de façon chronique aux NPs. Par ailleurs, la méthode d'analyse mise au point a été développée pour des observations à faible grossissement suffisantes pour évaluer la migration mais elle ne nous a pas permis d'apprécier les mouvements cellulaires. Il serait pertinent d'étudier le comportement cellulaire à plus fort grossissement pour identifier les trajectoires de migration (ref). En effet, le phénomène de migration est directement lié aux déformations du cytosquelette qui pourraient être perturbées par la charge cytoplasmique en nanoparticules.

Dans un épithélium Calu-3 normal, la blessure stimule d'abord l'entrée en phase S des cellules éloignées de la zone lésée puis celle des cellules migrant sur la zone dénudée.. En effet, les cellules positives à l'incorporation de BrdU dans la zone « Blessure » sont moins nombreuses que dans la zone « Périphérie » sur une surface donnée. Yahaya et al. ont observé le même phénomène sur un modèle de trachée de mouton. En effet, lors de la régénération de la trachée après blessure mécanique, ces derniers observent après 24h une augmentation du nombre de cellules positives au BrdU à distance de la zone blessée. L'augmentation du nombre de cellules positives au BrdU au niveau de la blessure n'apparaît que 3 jours après le début de la réparation. Ces auteurs ont suggéré l'activation de signaux moléculaires impliquant la différenciation de cellules progénitrices (Yahaya *et al.* 2013).

Notre étude a montré une augmentation du nombre de cellules proliférantes au niveau de la zone de blessure, suite à l'exposition tant aux nanoparticules NPs- γ -Fe₂O₃ qu'aux NPs-usure. Lors de l'observation de la zone en bordure de la blessure, il y a une augmentation significative dose dépendante de l'incorporation de BrdU dès les premières heures de réparation épithéliale. Cette augmentation traduit une augmentation du nombre de cellules engageant un processus prolifératif. Il serait nécessaire de prélever les milieux de culture à différents intervalles de temps après la blessure afin de déterminer quels sont les facteurs produits et susceptibles d'activer le cycle cellulaire. . L'incorporation de BrdU, au-delà du mécanisme de prolifération, pourrait aussi signifier une réparation d'ADN consécutive à la pré-exposition cellulaire aux nanoparticules. Néanmoins nous n'avons vu une différence significative dans les épithéliums exposés aux NPs que dans la zone de blessure. Si des lésions de l'ADN se

produisaient dans les cellules lors de l'exposition, elles auraient également dû se manifester dans les cellules éloignées de la blessure. Toutefois afin de déterminer si les NPs peuvent induire des lésions de l'ADN, il serait pertinent d'étudier par immunofluorescence la colocalisation du marquage au BrdU avec des systèmes de réparation de l'ADN tels que 53BP1 qui est impliquée dans la réparation de cassures doubles brins (Rappold *et al.* 2001).

Nous avons constaté des différences en termes de prolifération mais d'autres impacts mériteraient d'être investigués. Il serait notamment intéressant de définir le phénotype des cellules couvrant la zone de blessure. En effet nous n'avons pas étudié si les cellules migrantes expriment toujours MUC5AC ou bien s'il s'agit de cellules dédifférenciées. La conservation des complexes jonctionnels ou leur cinétique de restauration devraient également être évaluées. Enfin, il serait intéressant d'étudier le remodelage de l'épithélium à l'issue de la fermeture de la blessure afin de déterminer s'il s'accompagne d'une stratification de l'épithélium ou d'une transition épithélio-mésenchymateuse. En effet en condition physiologique, le processus de régénération passe par une phase de différenciation épidermoïde qui se caractérise par une stratification de l'épithélium (Coraux *et al.*, 2005). Mais en contexte pathologique, une transition épithélio-mésenchymateuse peut survenir.

Chapitre VII :

Discussion Générale

Conclusions et Perspectives

Les résultats acquis au cours de notre étude sont résumés en Figure VII.1. **Au cours de ce travail de thèse nous avons montré que :**

- 1. Les particules d'usure de freins collectées par 2 approches avaient des caractéristiques physico-chimiques proches. Ces particules constituent un mélange proche des émissions de type PM₁₀. Elles se caractérisent par une hétérogénéité en terme de taille et de forme, avec une composition majoritairement inorganique dont les principaux composants sont métalliques comme le Fe et Cu.**
- 2. Il existe une fraction nanométrique que nous avons isolée en développant une méthodologie spécifique. Elle se caractérise par une distribution en taille centrée sur 68 nm dont la composition est similaire à la poudre d'usure des freins.**
- 3. La poudre d'usure et sa fraction nanométrique présentent une cytotoxicité pour les cellules épithéliales bronchiques humaines (Calu-3) en culture 2D qui s'observe aux mêmes doses lorsque les doses nominales sont transformées en doses déposées grâce à un modèle de dosimétrie.**
- 4. Sur les cellules Calu-3 en culture 3D, les NPs-usure comme les NPs- γ -Fe₂O₃ ne provoquent pas d'atteinte de l'intégrité de la barrière épithéliale et n'induisent pas de réponse pro-inflammatoire.**
- 5. Les NPs-usure et les NPs- γ -Fe₂O₃ ont la capacité de traverser la barrière respiratoire mais en très faible quantité.**
- 6. Les NPs-usure et les NPs- γ -Fe₂O₃ induisent l'expression de la mucine MUC5AC au niveau génique et protéique par un mécanisme impliquant la voie du récepteur à l'EGF.**
- 7. La pré-exposition aux NPs-usure ou aux NPs- γ -Fe₂O₃ ne modifie pas la vitesse de réparation épithéliale après blessure mais induit une augmentation dose-dépendante du nombre de cellules en division en bordure de la zone lésée.**

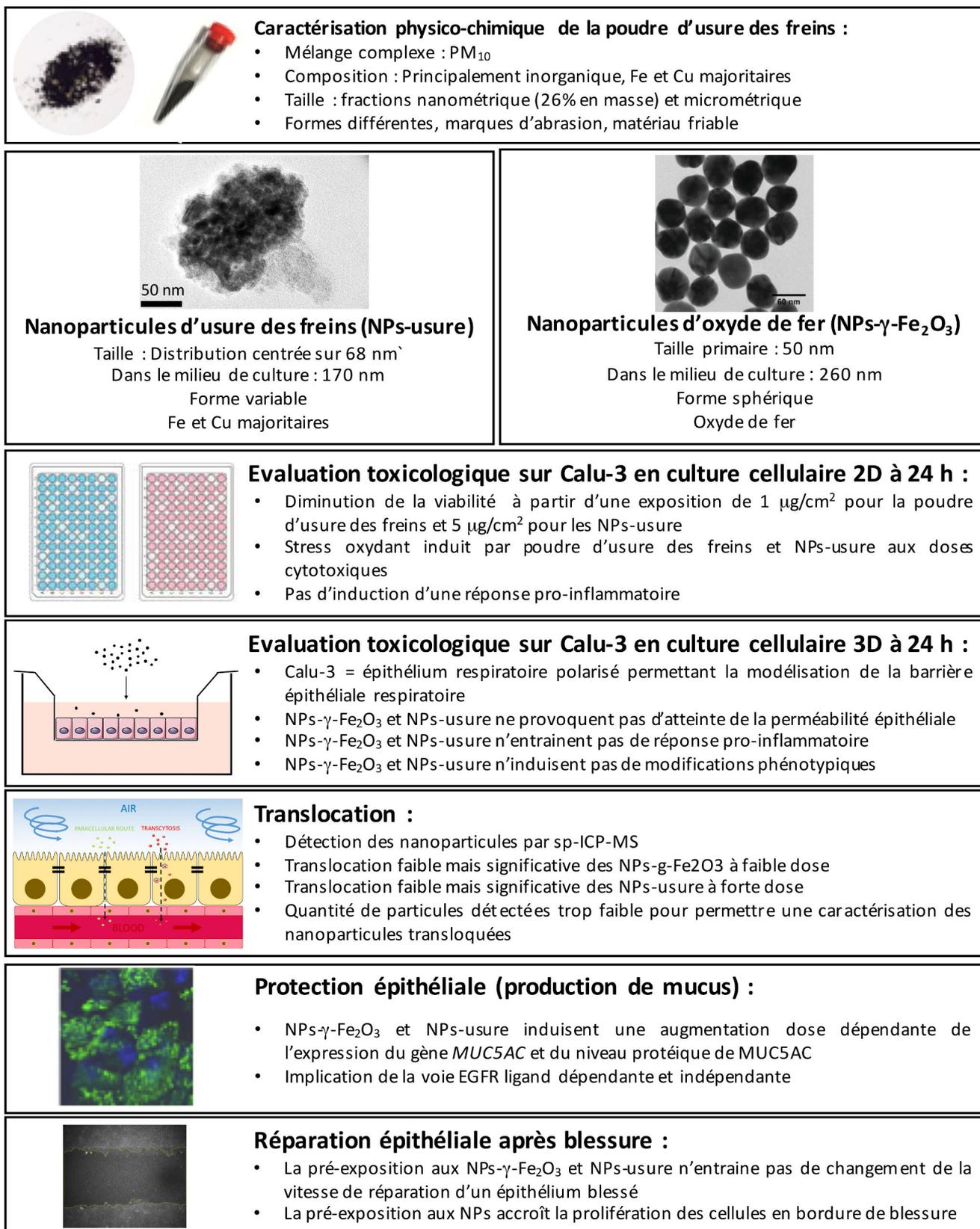


Figure VII.1 : Synthèse des résultats acquis au cours de cette thèse sur le devenir et l'impact de nanoparticules manufacturées ou issues de processus d'usure sur la barrière épithéliale respiratoire.

L'**originalité de notre étude** a été de s'intéresser aux particules d'usure de freins et notamment à leur fraction nanométrique. La poudre sur laquelle nous avons travaillé est un **mélange réaliste** de particules d'usure des freins. L'étude d'un tel mélange nous a permis i) de fournir une **caractérisation physico-chimique et toxicologique** de particules très proches de celles rencontrées dans l'air de nos villes et ii) de mettre au point un protocole de sélection en taille spécifique pour **isoler la fraction nanométrique**. Les approches méthodologiques que nous avons développées pourraient maintenant être appliquées à des particules d'usure des freins obtenues en conditions plus **contrôlées**. En effet, il est possible de s'interroger sur les **différences de caractéristiques** physico-chimiques et toxicologiques qui pourraient être retrouvées en fonction du scénario de freinage, du système de freinage utilisé ou de conditions environnementales. Ces études permettraient alors de relier les effets toxicologiques aux conditions de production des particules.

L'ensemble des résultats de l'étude toxicologique ont été acquis en utilisant comme modèle de barrière épithéliale respiratoire, les cellules épithéliales bronchiques humaines **Calu-3** cultivées en *Transwell*® pendant 14 jours. Ce modèle présente l'avantage de permettre **l'étude du passage de nanoparticules** à travers la barrière respiratoire mais aussi d'étudier des atteintes de fonctions qui lui sont spécifiques comme la fonction de protection assurée par la production de mucus et la fonction de réparation. Il constitue donc un modèle intéressant pour approfondir les mécanismes de remodelage qui s'observe au niveau bronchique lors de l'exposition chronique à des particules (Churg et al., 2013). Cependant l'épithélium bronchique, n'est pas la seule cible des nanoparticules inhalées puisque leur petite taille leur permet d'atteindre les alvéoles. Il serait pertinent de réaliser la même étude en **reconstituant une barrière alvéolaire** (Oberdorster et al. 2005). A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle de barrière alvéolaire humaine satisfaisant. En effet, **les cultures primaires** sont difficiles à mettre en œuvre compte-tenu de la difficulté d'obtenir ce type de cellules chez l'homme. **Les lignées alvéolaires** existantes ne présentent pas tous les pré-requis. Par exemple, la lignée A549, cultivable en *Transwell*® ne permet pas l'obtention d'une barrière car elle ne forme pas de jonctions étanches (George *et al.* 2015). La lignée NCI-H441 ne produit une barrière avec une bonne résistance électrique trans-épithéliale que si elle est cultivée en présence de dexaméthasone, facteur susceptible de moduler les réponses toxicologiques aux NPs (Hermanns *et al.* 2004). Cependant, le développement de nouvelles lignées telles que la lignée hAELVI (Kuehn *et al.* 2016) ainsi que l'émergence des cellules iPSC (induced-pluripotent stem cells) nourrissent l'espoir de progrès afin de répondre

prochainement à cette problématique. Le laboratoire travaille actuellement sur ce point dans le cadre d'un projet ANR.

Ce travail de thèse a fait l'objet de nombreux développements méthodologiques non seulement pour isoler et caractériser les NPs-usure mais aussi pour investiguer des effets toxicologiques associés aux fonctions spécifiques de l'épithélium respiratoire au-delà des mesures plus traditionnelles de la viabilité et de la réponse pro-inflammatoire. A ce stade d'avancement du travail, il apparait que certains résultats restent trop descriptifs et mériteraient un approfondissement pour élucider des mécanismes. De plus il n'a pas non plus été possible dans le temps imparti de moduler les conditions d'exposition. Nous avons limité les temps de traitement à 24h ce qui peut expliquer pourquoi certains effets observés sont faibles ou non significatifs. Il serait souhaitable de poursuivre ce travail en réalisant des **expositions répétées à faibles doses** qui sont plus proches de la réalité et de regarder **les effets à plus long terme**. Ceci est possible avec le modèle Calu-3 qui lorsqu'il est cultivé en 3D, peut être maintenu pendant au moins un mois. Dans ces études *in vitro* il nous semble essentiel de recourir à la **dosimétrie** tant pour caractériser la dose déposée de particules sur les cellules que pour homogénéiser les résultats des différentes études toxicologiques afin de les comparer entre eux (Hinderliter *et al.* 2010).

Nous avons exposé les cellules aux NPs dispersées dans le milieu de culture. Par ailleurs, de **nouveaux systèmes d'exposition** des cultures permettent de réaliser des **expositions sous forme d'aérosol** qui seraient plus représentatives de la voie d'entrée respiratoire que l'exposition dans du milieu de culture. Il conviendra alors de disposer des NPs-usure en quantité suffisante ou de coupler un dynamomètre à une chambre d'incubation pour exposer les cellules à des NPs fraîchement produites. Ici, nous avons étudié la translocation des nanoparticules sur un modèle statique. Cependant, les contraintes mécaniques liées notamment au flux d'air pénétrant dans les poumons et au flux sanguins sont des paramètres qui doivent être pris en compte dans de futures études. De nouveaux modèles intégrant ce phénomène (« *Lung-on-a-chip* ») ont été mis au point grâce à des procédés microfluidiques (Benam *et al.* 2016).

En résumé, ce travail a permis d'améliorer les connaissances sur les nanoparticules d'usure des freins en produisant à la fois une caractérisation physico-chimique et toxicologique. En effet, au-delà des mécanismes de toxicologie classique, nous nous sommes intéressés au devenir des NPs-usure et à leur impact sur les fonctions de protection et réparation épithéliale.

Si les mécanismes précis impliqués dans les modulations observées doivent être approfondis, ce travail aura permis la mise au point de méthodologies qui pourront être utilisées pour l'étude de nouvelles particules. En effet les **nanoparticules issues de l'usure des freins** ne sont pas les seules nanoparticules émises lors de processus d'usure liés au trafic routier. Si du fait de leur usure il est recommandé de changer les garnitures de frein chaque 20 000 km, **les pneus** doivent aussi être remplacés tous les 40 000 km. Ainsi, tout comme les freins, les pneus sont **sujets à l'usure** et émettent des particules dans l'atmosphère (Wagner *et al.* 2018). Afin d'apprécier le danger lié à toutes les sources de pollution particulaire dues au trafic mais non produites par l'échappement il conviendrait de caractériser leur toxicité respective au niveau respiratoire en exploitant les potentialités de modèles *in vitro* tels que celui que nous avons utilisé dans cette étude.

Bibliographie

Académie des sciences. Ozone et ses propriétés oxydantes de la troposphère : essai d'évaluation scientifique. 1993 Rapport n°30. Paris : Tec & Doc Lavoisier. 398p. ISBN : 2-730-000-07. (p. 65)

Adachi K, Tainosho Y. Characterization of heavy metal particles embedded in tire dust. *Environment international.* 2004;30(8):1009-17.

Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, Alhader MS. Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line. *Biological trace element research.* 2014;159(1-3):416-24. Epub 2014/04/22.

Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et biophysica acta.* 2006;1765(2):189-222. Epub 2006/02/21.

ANSES, AVIS et RAPPORT de l'Anses relatif à l'identification, la catégorisation et la hiérarchisation de polluants actuellement non réglementés pour la surveillance de la qualité de l'air. 2018. Accessible à : <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-l-anses-relatif-a-l-identification-la-catégorisation-et-la-hiérarchisation> (consultation : Juillet 2018)

Bachler G, Losert S, Umehara Y, von Goetz N, Rodriguez-Lorenzo L, Petri-Fink A, et al. Translocation of gold nanoparticles across the lung epithelial tissue barrier: Combining in vitro and in silico methods to substitute in vivo experiments. *Particle and fibre toxicology.* 2015;12:18. Epub 2015/06/28.

Barosova H, Chortarea S, Peikertova P, Clift MJD, Petri-Fink A, Kukutschova J, et al. Biological response of an in vitro human 3D lung cell model exposed to brake wear debris varies based on brake pad formulation. *Archives of toxicology.* 2018;92(7):2339-51. Epub 2018/05/12.

Bates DV. Health indices of the adverse effects of air pollution: the question of coherence. *Environmental research.* 1992;59(2):336-49. Epub 1992/12/01.

Banque Mondiale. "Le coût de la pollution de l'air". Septembre 2016 ; accessible à <http://www.banquemondiale.org/fr/news/press-release/2016/09/08/air-pollution-deaths-cost-global-economy-225-billion/> (consultatin : Mai 2018)

Benam KH, Novak R, Nawroth J, Hirano-Kobayashi M, Ferrante TC, Choe Y, et al. Matched-Comparative Modeling of Normal and Diseased Human Airway Responses Using a Microengineered Breathing Lung Chip. *Cell systems.* 2016;3(5):456-66 e4. Epub 2016/11/30.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism: clinical and experimental.* 2000;49(2 Suppl 1):3-8. Epub 2000/02/29.

Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of pharmaceutical sciences.* 2008;97(8):2892-923.

Bibliographie

- Bonser LR**, Erle DJ. Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. *Journal of clinical medicine*. 2017;6(12). Epub 2017/12/01.
- Bozhinova D**, Galunsky B, Yueping G, Franzreb M, Koster R, Kasche V. Evaluation of magnetic polymer micro-beads as carriers of immobilised biocatalysts for selective and stereoselective transformations. *Biotechnology letters*. 2004;26(4):343-50. Epub 2004/04/02.
- Braakhuis HM**, Gosens I, Krystek P, Boere JA, Cassee FR, Fokkens PH, et al. Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Particle and fibre toxicology*. 2014;11:49. Epub 2014/09/18.
- Brook RD**, Rajagopalan S, Pope CA, 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(21):2331-78. Epub 2010/05/12.
- Burgel PR**, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax*. 2004;59(11):992-6. Epub 2004/11/02.
- Buzea C**, Pacheco, II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2(4):MR17-71. Epub 2007/12/01.
- Che W**, Qiu H, Liu G, Ran Y, Zhang H, Zhang L, et al. Oxidative damage of the extracts of condensate, particulate and semivolatile organic compounds from gasoline engine exhausts on testicles of rats. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2009;83(1):42-7. Epub 2009/05/14.
- Chen EY**, Garnica M, Wang YC, Chen CS, Chin WC. Mucin secretion induced by titanium dioxide nanoparticles. *PloS one*. 2011;6(1):e16198. Epub 2011/02/02.
- Chiba T**, Uchi H, Tsuji G, Gondo H, Moroi Y, Furue M. Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2011;24(1):133-40. Epub 2010/08/17.
- 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. *Nature biotechnology*. 2010;28(12):1300-3. Epub 2010/11/09.
- Churg A**, Brauer M, del Carmen Avila-Casado M, Fortoul TI, Wright JL. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environmental health perspectives*. 2003;111(5):714-8. Epub 2003/05/03.
- CITEPA**, Rapport 2013 : Inventaire pour la France métropolitaine des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre (GES). 2013 ; accessible à : <https://www.citepa.org/fr/> (consultation : Mai 2018)
- Cohen JM**, Derk R, Wang L, Godleski J, Kobzik L, Brain J, et al. Tracking translocation of industrially relevant engineered nanomaterials (ENMs) across alveolar epithelial monolayers in vitro. *Nanotoxicology*. 2014;8 Suppl 1:216-25. Epub 2014/02/01.
- Cone RA**. Barrier properties of mucus. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(2):75-85. Epub 2009/01/13.

Bibliographie

Coppit G, Perkins J, Munaretto J, Nielsen R, McKinney L, Ulnick K. The effects of mitomycin-C and stenting on airway wound healing after laryngotracheal reconstruction in a pig model. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2000;53(2):125-35. Epub 2000/07/25.

Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. [Repair and regeneration of the airway epithelium]. *Medecine sciences : M/S*. 2005;21(12):1063-9. Epub 2005/12/06. Reparation et regeneration de l'epithelium respiratoire.

Cornell RM, Schwertman U. Iron oxides in the laboratory. 2008. Iron oxides in the laboratory. 2000. Wiley-VCH. Second, completely revised and Extended Edition.

Couto D, Freitas M, Porto G, Lopez-Quintela MA, Rivas J, Freitas P, et al. Polyacrylic acid-coated and non-coated iron oxide nanoparticles induce cytokine activation in human blood cells through TAK1, p38 MAPK and JNK pro-inflammatory pathways. *Archives of toxicology*. 2015;89(10):1759-69. Epub 2014/08/12.

Crobeddu B, Aragao-Santiago L, Bui LC, Boland S, Baeza Squiban A. Oxidative potential of particulate matter 2.5 as predictive indicator of cellular stress. *Environ Pollut*. 2017;230:125-33. Epub 2017/06/27.

Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer research*. 2009;69(3):1221-9. Epub 2009/01/15.

Cudennec Y, Lecerf A. Topotactic transformations of goethite and lepidocrocite into hematite and maghemite. *Solid State Sciences*. 2005;7(5):520-9.

Deletraz G. Géographie des risques environnementaux liés aux transports routiers en montagne. Incidences des émissions d'oxydes d'azote en vallées d'Aspe et de Biriadou (Pyrénées). 2002 Thèse de Doctorat en Géographie-Aménagement. Université de Pau et des Pays de l'Adour. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00003245>

Decaestecker C, Debeir O, Van Ham P, Kiss R. Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Medicinal research reviews*. 2007;27(2):149-76. Epub 2006/08/05.

Ehre C, Worthington EN, Liesman RM, Grubb BR, Barbier D, O'Neal WK, et al. Overexpressing mouse model demonstrates the protective role of Muc5ac in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(41):16528-33. Epub 2012/09/27.

Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environmental health perspectives*. 2006;114(8):1172-8. Epub 2006/08/03.

Evans C, Kheradmand F, Corry D, Tuvim M, Densmore C, Waldrep C, et al. Gene therapy of mucus hypersecretion in experimental asthma. *Chest*. 2002;121(3 Suppl):90S-1S. Epub 2002/03/15.

Evans CM, Kim K, Tuvim MJ, Dickey BF. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2009;15(1):4-11. Epub 2008/12/17.

Bibliographie

- Evans CM**, Koo JS. Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacology & therapeutics*. 2009;121(3):332-48. Epub 2008/12/09.
- Fahy JV**, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine*. 2010;363(23):2233-47. Epub 2010/12/03.
- Fasano A**, Uzzau S. Modulation of intestinal tight junctions by Zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *J Clin Invest*. 1997 Mar 15;99(6):1158-64
- Fu P**, Xia Q, Hwang HM, Ray PC, Yu H Mechanisms of nanotoxicity : Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014;22(1):64-75
- Garg BD**, Cadle SH, Mulawa PA, Groblicki PJ, Laroo C, Parr GA. Brake Wear Particulate Matter Emissions. *Environmental science & technology*. 2000;34(21):4463-9.
- Gasser M**, Riediker M, Mueller L, Perrenoud A, Blank F, Gehr P, et al. Toxic effects of brake wear particles on epithelial lung cells in vitro. *Particle and fibre toxicology*. 2009;6:30. Epub 2009/11/26.
- George I**. Translocation de nanoparticules d'oxyde métallique au travers de la barrière respiratoire. 2014 Thèse de Doctorat en Toxicologie. Université Paris Diderot
- George I**, Naudin G, Boland S, Mornet S, Contremoulins V, Beugnon K, et al. Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier. *Nanoscale*. 2015;7(10):4529-44. Epub 2015/02/17.
- George I**, Vranic S, Boland S, Courtois A, Baeza-Squiban A. Development of an in vitro model of human bronchial epithelial barrier to study nanoparticle translocation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2015;29(1):51-8. Epub 2014/09/10.
- Geys J**, Coenegrachts L, Vercammen J, Engelborghs Y, Nemmar A, Nemery B, et al. In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study. *Toxicology letters*. 2006;160(3):218-26. Epub 2005/09/03.
- Grainge CL**, Davies DE. Epithelial injury and repair in airways diseases. *Chest*. 2013;144(6):1906-12. Epub 2013/12/04.
- Grigoratos T**, Martini G. Brake wear particle emissions: a review. *Environmental science and pollution research international*. 2015;22(4):2491-504. Epub 2014/10/17.
- Hatstrup CL**, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual review of physiology*. 2008;70:431-57. Epub 2007/09/14.
- Helenius A**, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:1019-49. Epub 2004/06/11.
- Henson PM**, Vandivier RW, Douglas IS. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease? *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(8):713-7. Epub 2006/10/27.
- Hermanns MI**, Unger RE, Kehe K, Peters K, Kirkpatrick CJ. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-

Bibliographie

capillary barrier in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004;84(6):736-52. Epub 2004/04/13.

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. *Particle and fibre toxicology*. 2010;7(1):36. Epub 2010/12/02.

Hittinger M, Juntke J, Kletting S, Schneider-Daum N, de Souza Carvalho C, Lehr CM. Preclinical safety and efficacy models for pulmonary drug delivery of antimicrobials with focus on in vitro models. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;85:44-56. Epub 2014/12/03.

Hooftman N, Oliveira L, Messagie M, Coosemans T, Van Mierlo J. Environmental Analysis of Petrol, Diesel and Electric Passenger Cars in a Belgian Urban Setting. *Energies*. 2016;9(2):84.

Horie M, Kato H, Iwahashi H. Cellular effects of manufactured nanoparticles: effect of adsorption ability of nanoparticles. *Archives of toxicology*. 2013;87(5):771-81. Epub 2013/03/19.

Hovenberg HW, Davies JR, Herrmann A, Linden CJ, Carlstedt I. MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconjugate journal*. 1996;13(5):839-47. Epub 1996/10/01.

Hsu HS, Liu CC, Lin JH, Hsu TW, Su K, Hung SC. Repair of naphthalene-induced acute tracheal injury by basal cells depends on beta-catenin. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2014;148(1):322-32. Epub 2013/11/28.

Iijima A, Sato K, Yano K, Tago H, Kato M, Kimura H, et al. Particle size and composition distribution analysis of automotive brake abrasion dusts for the evaluation of antimony sources of airborne particulate matter. *Atmospheric Environment*. 2007;41(23):4908-19.

Institut de Veille Sanitaire (InVS) Programme de surveillance "air et santé". 2014 ; accessible à : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Environnement-et-sante/Air-et-sante/La-surveillance-air-et-sante-de-l-InVS/> (Consultation : Mars 2018)

Kaplan J, Ward DM. The essential nature of iron usage and regulation. *Current biology : CB*. 2013;23(15):R642-6. Epub 2013/08/10.

Kazimirova A, Peikertova P, Barancokova M, Staruchova M, Tulinska J, Vaculik M, et al. Automotive airborne brake wear debris nanoparticles and cytokinesis-block micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes: A pilot study. *Environmental research*. 2016;148:443-9. Epub 2016/05/02.

Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, Singh D, Vestbo J, Thornton DJ. MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;178(10):1033-9. Epub 2008/09/09.

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. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2011;25(8):1516-34. Epub 2011/10/04.

Bibliographie

- Knowles MR**, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(5):571-7. Epub 2002/03/06.
- Ko JW**, Park JW, Shin NR, Kim JH, Cho YK, Shin DH, et al. Copper oxide nanoparticle induces inflammatory response and mucus production via MAPK signaling in human bronchial epithelial cells. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2016;43:21-6. Epub 2016/03/05.
- Kreyling WG**, Hirn S, Moller W, Schleh C, Wenk A, Celik G, et al. Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS nano*. 2014;8(1):222-33. Epub 2013/12/25.
- Kreyling WG**, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Moller W. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Accounts of chemical research*. 2013;46(3):714-22. Epub 2012/09/18.
- Kuehn A**, Kletting S, de Souza Carvalho-Wodarz C, Repnik U, Griffiths G, Fischer U, et al. Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier. *Altex*. 2016;33(3):251-60. Epub 2016/03/18.
- Kukutschová J**, Roubíček V, Malachová K, Pavlíčková Z, Holuša R, Kubačková J, et al. Wear mechanism in automotive brake materials, wear debris and its potential environmental impact. *Wear*. 2009;267(5):807-17.
- Kukutschova J**, Moravec P, Tomasek V, Matejka V, Smolik J, Schwarz J, et al. On airborne nano/micro-sized wear particles released from low-metallic automotive brakes. *Environ Pollut*. 2011;159(4):998-1006. Epub 2011/01/21.
- Kwak JH**, Kim H, Lee J, Lee S. Characterization of non-exhaust coarse and fine particles from on-road driving and laboratory measurements. *The Science of the total environment*. 2013;458-460:273-82. Epub 2013/05/15.
- Landrigan PJ**, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN, et al. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet*. 2018;391(10119):462-512. Epub 2017/10/24.
- Lee S**, Bi X, Reed RB, Ranville JF, Herckes P, Westerhoff P. Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements. *Environmental science & technology*. 2014;48(17):10291-300. Epub 2014/08/15.
- Linden SK**, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal immunology*. 2008;1(3):183-97. Epub 2008/12/17.
- Malbreil N**. La pollution en bordure d'utoroute et son impact sur la végétation. 1997. DESS : Ressources Nautrelles et Envrionnement, Université de Metz, CETE de l'Est, 56 p., (p. 33)
- Marshall WF**, Nonaka S. Cilia: tuning in to the cell's antenna. *Current biology : CB*. 2006;16(15):R604-14. Epub 2006/08/08.
- Matos M**, Raby BN, Zahm JM, Polette M, Birembaut P, Bonnet N. Cell migration and proliferation are not discriminatory factors in the in vitro sociologic behavior of bronchial epithelial cell lines. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2002;53(1):53-65. Epub 2002/09/05.

Bibliographie

Mosleh M, Blau PJ, Dumitrescu D. Characteristics and morphology of wear particles from laboratory testing of disk brake materials. *Wear*. 2004;256(11):1128-34.

Murray AR, Kisin E, Inman A, Young SH, Muhammed M, Burks T, et al. Oxidative stress and dermal toxicity of iron oxide nanoparticles in vitro. *Cell biochemistry and biophysics*. 2013;67(2):461-76. Epub 2012/06/07.

Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*. 2009;8(7):543-57. Epub 2009/06/16.

Nimse S, Sonawane M, Song KS, Kim T. Biomarker detection technologies and future directions. 2015. *The Analyst* 141:740-755.

Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*. 2005;113(7):823-39. Epub 2005/07/09.

Okoturo-Evans O, Dybowska A, Valsami-Jones E, Cupitt J, Gierula M, Boobis AR, et al. Elucidation of toxicity pathways in lung epithelial cells induced by silicon dioxide nanoparticles. *PloS one*. 2013;8(9):e72363. Epub 2013/09/12.

OMS, Bilan 2017 : l'actualité de la santé dans le monde. 2017 ; accessible à [http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) (consultation : Juin 2018)

Pailleux M. Etude in vitro de la toxicité de nanoparticules de boehmite. 2012. Thèse de Doctorat en Génie des Procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint Etienne. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00782444>

Park EJ, Choi DH, Kim Y, Lee EW, Song J, Cho MH, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles induce autophagy preceding apoptosis through mitochondrial damage and ER stress in RAW264.7 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2014;28(8):1402-12. Epub 2014/08/03.

Park JW, Lee IC, Shin NR, Jeon CM, Kwon OK, Ko JW, et al. Copper oxide nanoparticles aggravate airway inflammation and mucus production in asthmatic mice via MAPK signaling. *Nanotoxicology*. 2016;10(4):445-52. Epub 2015/10/17.

Pant P, Harrison RM. Estimation of the contribution of road traffic emissions to particulate matter concentrations from field measurements: A review. *Atmospheric Environment*. 2013;77:78-97.

Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(45):31751-4. Epub 1999/11/05.

Perotin JM, Adam D, Vella-Boucaud J, Delepine G, Sandu S, Jonvel AC, et al. Delay of airway epithelial wound repair in COPD is associated with airflow obstruction severity. *Respiratory research*. 2014;15:151. Epub 2014/11/28.

Pontes Da Costa A, Nunes DR, Tharaud M, Oble J, Poli G, Rieger J. Palladium(0) Nanoparticles Embedded in Core-shell Nanogels as Recoverable Catalysts for the Mizoroki-Heck Reaction. *Chemcatchem* 2017.

Bibliographie

- Porat-Shliom N**, Milberg O, Masedunskas A, Weigert R. Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(12):2099-121. Epub 2012/09/19.
- Puchelle E**, Le Simple P, Hajj R, Coraux C. [Regeneration of injured airway epithelium]. *Annales pharmaceutiques francaises*. 2006;64(2):107-13. Epub 2006/03/29. Regeneration de l'epithelium respiratoire lese.
- Puddicombe SM**, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, et al. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(10):1362-74. Epub 2000/07/06.
- Puisney C**, Baeza-Squiban A, Boland S. Mechanisms of Uptake and Translocation of Nanomaterials in the Lung. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1048:21-36. Epub 2018/02/18.
- Ramimoghdam D**, Bagheri S, Hamid SBA. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2014;368:207-29.
- Rahman MM**, Khan SB, Jamal A, Faisal M, Aisiri AM. 2011. Iron Oxide Nanoparticles, Nanomaterials, Prof. Mohammed Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-913-4, InTech, Accessible via : <http://www.intechopen.com/books/nanomaterials/iron-oxide-nanoparticles>
- Rappold I**, Iwabuchi K, Date T, Chen J. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *The Journal of cell biology*. 2001;153(3):613-20. Epub 2001/05/02.
- Rexeis M**, Hausberger S. Trend of vehicle emission levels until 2020 – Prognosis based on current vehicle measurements and future emission legislation 2009. 4689-98 p.
- Richardson M**. The physiology of mucus and sputum production in the respiratory system. *Nursing times*. 2003;99(23):63-4. Epub 2003/07/04.
- Riediker M**, Devlin RB, Griggs TR, Herbst MC, Bromberg PA, Williams RW, et al. Cardiovascular effects in patrol officers are associated with fine particulate matter from brake wear and engine emissions. *Particle and fibre toxicology*. 2004;1(1):2. Epub 2005/04/09.
- Rogers DF**. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respiratory care*. 2007;52(9):1134-46; discussion 46-9. Epub 2007/08/25.
- Rose MC**, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological reviews*. 2006;86(1):245-78. Epub 2005/12/24.
- Sanders PG**, Xu N, Dalka TM, Maricq MM. Airborne brake wear debris: size distributions, composition, and a comparison of dynamometer and vehicle tests. *Environmental science & technology*. 2003;37(18):4060-9. Epub 2003/10/04.
- Sawada N**. Tight junction-related human diseases. *Pathology international*. 2013;63(1):1-12. Epub 2013/01/30.

Bibliographie

Schulte PA, Trout D, Zumwalde RD, Kuempel E, Geraci CL, Castranova V, et al. Options for Occupational Health Surveillance of Workers Potentially Exposed to Engineered Nanoparticles: State of the Science. *Journal of occupational and environmental medicine*. 2008;50(5):517-26.

Schulze C, Schaefer UF, Ruge CA, Wohlleben W, Lehr CM. Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2011;77(3):376-83. Epub 2010/11/09.

Schuster BS, Suk JS, Woodworth GF, Hanes J. Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Biomaterials*. 2013;34(13):3439-46. Epub 2013/02/07.

Schutz M. Environnement et pollution : comment mesurer ? Comment réagir ? 1995. Nieppe : Publitronic. 253p. ISBN 2-86661-057-1. (p.78)

Shao MX, Nakanaga T, Nadel JA. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;287(2):L420-7. Epub 2004/05/04.

Soenen SJ, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small*. 2010;6(7):832-42. Epub 2010/03/10.

Stegeman JJ, Solow AR, Goehl TJ. Environmental health and the coastal zone. *Environmental health perspectives*. 2002;110(11):A660-1. Epub 2002/11/06.

Sun R, Zhang Y, Lv Q, Liu B, Jin M, Zhang W, et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) induces apoptosis via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivating p63 isoform alpha (TAP63alpha). *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(18):15918-28. Epub 2011/03/04.

Sunyer J, Ballester F, Tertre AL, Atkinson R, Ayres JG, Forastiere F, et al. The association of daily sulfur dioxide air pollution levels with hospital admissions for cardiovascular diseases in Europe (The Apeha-II study). *European heart journal*. 2003;24(8):752-60. Epub 2003/04/26.

Tharaud M, Gondikas AP, Benedetti MF, von der Kammer F, Hofmann T, Cornelis G. TiO₂ nanomaterial detection in calcium rich matrices by spICPMS. A matter of resolution and treatment. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2017;32(7):1400-11.

Theodoropoulos G, Carraway KL. Molecular signaling in the regulation of mucins. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;102(5):1103-16. Epub 2007/10/25.

Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annual review of physiology*. 2008;70:459-86. Epub 2007/09/14.

Thornton DJ, Sheehan JK. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2004;1(1):54-61. Epub 2005/08/23.

Bibliographie

Thorpe A, Harrison RM. Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: A review. *Science of The Total Environment*. 2008;400(1):270-82.

Val S, Belade E, George I, Boczkowski J, Baeza-Squiban A. Fine PM induce airway MUC5AC expression through the autocrine effect of amphiregulin. *Archives of toxicology*. 2012;86(12):1851-9. Epub 2012/07/24.

Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of toxicology*. 2016;90(1):1-37. Epub 2015/09/08.

Wagner S, Huffer T, Klockner P, Wehrhahn M, Hofmann T, Reemtsma T. Tire wear particles in the aquatic environment - A review on generation, analysis, occurrence, fate and effects. *Water research*. 2018;139:83-100. Epub 2018/04/10.

Wahlstrom J. A study of airborne wear particles from automotive disc brake . 2011. PhD Thesis. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:402912/FULLTEXT01.pdf/>

Walkey CD, Olsen JB, Song F, Liu R, Guo H, Olsen DW, et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS nano*. 2014;8(3):2439-55. Epub 2014/02/13.

Yahaya B, McLachlan G, Collie DD. BrdU pulse labelling in vivo to characterise cell proliferation during regeneration and repair following injury to the airway wall in sheep. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:871932. Epub 2013/03/28.

Zeyons O. Etude des interactions physicochimiques et biologiques entre nanoparticules manufacturées et bactéries de l'environnement. 2008. Thèse de Doctorat en Physicochimie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00331931>

Zhang W, Feng Z, Wang X, Niu J. Elevated ozone negatively affects photosynthesis of current-year leaves but not previous-year leaves in evergreen *Cyclobalanopsis glauca* seedlings. *Environ Pollut*. 2014;184:676-81. Epub 2013/05/30.

Zhao J, Lewinski N, Riediker M. Physico-Chemical Characterization and Oxidative Reactivity Evaluation of Aged Brake Wear Particles. *Aerosol Science and Technology*. 2015;49(2):65-74.

Annexes

Annexe 1 :

Puisney C.

Dosimétrie des nanoparticules in vitro

Lettre de l'ARET – Septembre 2016

Annexe 2 :

Puisney C. et al.

Mechanisms of Uptake and Translocation of Nanomaterials in the Lung.
2018.

Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles, Advances in
Experimental Medicine and Biology

Annexe 3 :

Valorisation Scientifique

Dosimétrie des nanoparticules *in vitro*

Chloé Puisney, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire des Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, UMR CNRS 8251, 5 rue Thomas Mann, 75205 Paris cédex 13

Les nanoparticules/nanomatériaux manufacturés sont de plus en plus utilisés dans des domaines variés (médecine, alimentation, cosmétique, textile, ...) cependant d'importantes lacunes persistent concernant l'évaluation des risques associés à ces composés. Il existe une réelle nécessité de caractériser le danger associé à l'exposition à ces nanomatériaux car ils présentent des propriétés nouvelles non partagées par leur équivalent micrométrique. Le nombre exponentiel de nanomatériaux aujourd'hui recensés est à l'image du nombre d'études de nanotoxicologie principalement réalisées *in vitro*. Cependant les protocoles d'essais utilisés dans les différents laboratoires pour ce type de matériaux ne sont pas ou peu standardisés. L'approche *in vitro* est pourtant incontournable pour l'évaluation de la toxicité. De plus, elle peut être réalisée à haut débit. Les nanomatériaux se singularisent par un comportement particulier dans les milieux biologiques parce qu'ils sont non ou partiellement solubles et qu'ils forment facilement des agrégats/agglomérats. Ceci implique le développement de méthodologies spécifiques pour améliorer la reproductibilité de l'exposition et caractériser les doses d'exposition afin de permettre la comparaison des études entre elles. Classiquement en nanotoxicologie, la dose de nanomatériaux mis en suspension dans le milieu de culture peut être exprimée de différentes manières en termes de masse, de surface, de volume ou de nombre par unité de volume ou de surface. Ce n'est généralement que la dose nominale d'exposition qui est rapportée comme cela se pratique pour les composés solubles. Pour ces objets solides que constituent les nanoparticules, il faut connaître la dose effective, c'est à dire la dose de nanoparticules qui entrera effectivement en contact avec les cellules et induira une ou des réponses biologiques¹ (figure 1). Ceci nécessite la mise en place d'une méthode de dosimétrie adaptée au comportement particulier des nanoparticules dans les milieux biologiques. Il s'agit d'une part de standardiser la préparation/caractérisation de la suspension nanoparticulaire et d'autre part de modéliser mathématiquement la dose effective en tenant compte de la diffusion/sédimentation des nanoparticules dans le dispositif expérimental utilisé.

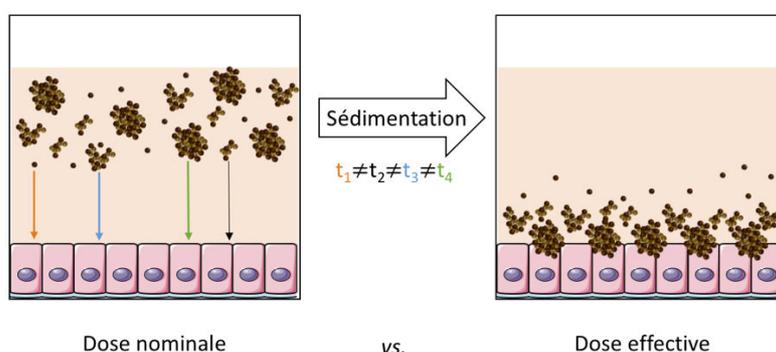


Figure 1 : Comparaison de la dose nominale et dose effective.

En fonction de leur densité les différents agrégats/agglomérats et les nanoparticules libres sédimentent/diffusent progressivement dans le milieu de culture pour atteindre les cellules à une vitesse différente. La dose nominale prend en

compte l'intégralité des nanoparticules appliquées alors qu'avec la mesure de la dose effective on ne considère que celles déposées sur les cellules.

La méthode ISDD^{2,3} (In vitro Sedimentation, Diffusion Dosimetry), développée par l'équipe de P. Demokritou au sein de l'École de Santé Publique d'Harvard est la plus aboutie à ce jour (Demokritou *et al*, US Patent No. 61/661,895).

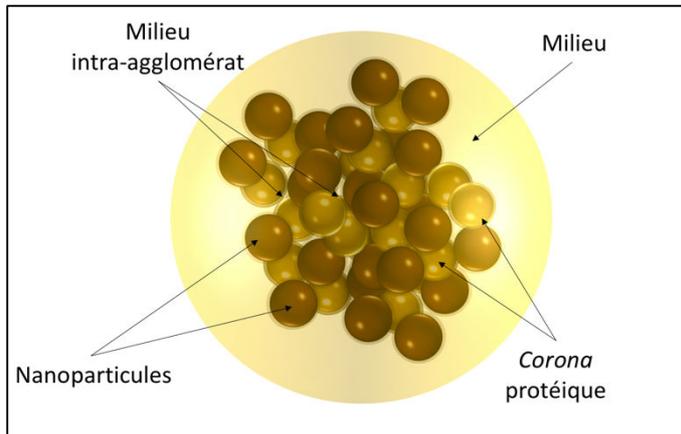


Figure 2 : Densité effective d'agrégat/agglomérats.

La densité effective des agrégats rend compte de la densité des nanoparticules et de la corona protéique formée à leur surface ainsi que de celle du milieu emprisonné entre les nanoparticules de l'agrégat/agglomérat.

La mise en œuvre de la modélisation ISDD implique deux étapes préalables de dispersion des nanomatériaux et de caractérisation des suspensions. Des suspensions de nanoparticules sont préparées dans l'eau selon divers scénarii de sonication délivrant une quantité d'énergie croissante. Un suivi de la stabilité de ces suspensions est réalisé par DLS (*dynamic light scattering*) afin d'identifier la **dose critique d'énergie à délivrer (DSEcr)** pour obtenir une suspension stable avec des agrégats les plus petits possibles.

Puis les suspensions aqueuses sont diluées dans le milieu de culture cellulaire et une mesure de la taille des agrégats formés est réalisée à nouveau par DLS. Les suspensions sont ensuite centrifugées 1h à 3000g afin d'accélérer la sédimentation des objets en suspension et de déterminer le volume sédimenté qui entrera dans le calcul de la densité effective des agrégats. La **densité effective** ainsi déterminée prend en compte les agrégats formés par les nanoparticules et le milieu mais aussi la présence d'une éventuelle corona protéique (figure 2). Ces données sont intégrées dans le programme de calcul ISDD (Demokritou *et al*, US Patent No. 61/661,895) qui modélise la diffusion et la sédimentation de la suspension nanoparticulaire en fonction du scénario d'exposition. Cette modélisation prend en compte à la fois les paramètres du milieu (viscosité), les paramètres particuliers (sédimentation, diffusion) et les paramètres spatiaux-temporels (aire du puits, volume de milieu, temps d'exposition). Cette méthode résumée figure 3 permet donc de définir la dose directement en contact avec les cellules pour un scénario d'exposition précis et un nanomatériau donné. Elle apparaît à ce jour comme prometteuse et commence à être diffusée dans la communauté des nanotoxicologues. Ce modèle est en constante évolution pour prendre en compte de nouvelles variables expérimentales et pour étendre son application aux faibles doses.

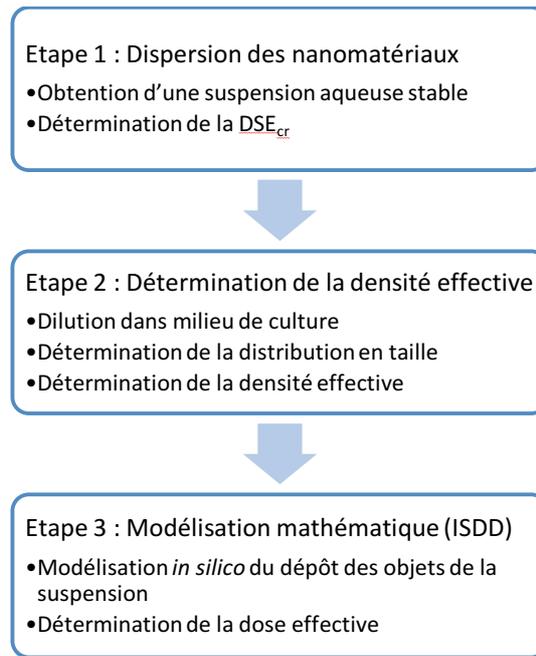


Figure 3 : Récapitulatif des différentes étapes de la mise en œuvre de la méthode de dosimétrie ISDD appliquée aux nanomatériaux (d'après J. Cohen *et al*, *Particle and Fibre Toxicology*, 2014)

La détermination de la dose effective apparaît comme un véritable progrès en nanotoxicologie *in vitro*. Cette approche est à ce jour peu répandue mais deviendra incontournable à terme pour améliorer la plus value et la visibilité des résultats des études de nanotoxicologie *in vitro*. Sa capacité à déterminer les doses effectives délivrées *in vitro* va améliorer les possibilités de comparaison de différentes études et de corrélation avec les études *in vivo*.

- (1) D. LISON *et al*, **Paracelsus in nanotoxicology**, *Particle and Fibre Toxicology*, 2014
- (2) J. COHEN *et al*, **An integrated approach for the *in vitro* dosimetry of engineered nanomaterials**, *Particle and Fibre Toxicology*, 2014
- (3) G. DELOID *et al*, **Estimating the effective density of engineered nanomaterials for *in vitro* dosimetry**, *Nature communications*, 2014

C. Puisney a bénéficié d'une bourse de l'action COST MODENA pour assister au Workshop «Assessing the dose of nanomaterial in toxicological studies: smart combinations of experimentation and modelling» qui s'est tenu les 4 et 5 mai 2016 à l'Institut National de Physique-Chimie et Biophysique de Tallinn (Estonie) et est bénéficiaire d'une allocation doctorale du DIM-Nano-K de la région Ile de France.



Mechanisms of Uptake and Translocation of Nanomaterials in the Lung

2

Chloé Puisney, Armelle Baeza-Squiban,
and Sonja Boland

Abstract

Nanomaterials are invading our environment due to their increasing use in a very broad range of sectors making human exposure foreseeable during the life cycle of these materials. Inhalation is one of the most frequent routes of exposure in case of unintentional exposure and the small size of nanomaterials allows them to reach the deep lung. Understanding the fate and effects of nanomaterials is a great challenge for scientists as they exhibit a huge physico-chemical diversity that drives their biological reactivity. It is critical to determine the fate of nanomaterials at their route of entry in the organism as this will determine their local and/or systemic effects. In this review we will describe the epithelial barriers and the clearance processes of the respiratory tract. The mechanisms involved in the internalization of nanomaterials by respiratory cells and their ability to cross the epithelial barrier will be presented, highlighting methodologies and the role of the nanomaterial physico-chemical properties.

Keywords

Nanomaterials · Nanotoxicity · Lung toxicity · Nanoparticles uptake

2.1 Introduction

The development of nanotechnologies puts on the market a wide diversity of nanomaterials (NM). NMs can be of very various compositions (metals, metal oxides, carbons, polymers) and for each composition they can exhibit different sizes, shapes, charges, crystallinity, coating, and functionalization that are designed to display unique properties for specific applications. Until now, risk assessment of NMs is far to be stated. Due to

C. Puisney · A. Baeza-Squiban (✉) · S. Boland
CNRS UMR 8251, Unit of Functional and Adaptive
Biology (BFA), Laboratory of Molecular and Cellular
Responses to Xenobiotics, University Paris Diderot
(Sorbonne Paris Cité), Paris, France
e-mail: baeza@univ-paris-diderot.fr

the recent use of NMs, no epidemiological studies are available to demonstrate an association between NM exposure and health effects, making toxicological studies mandatory to establish hazards related to NM exposure. The diversity of NMs to be evaluated and the difficulties encountered for a proper hazard characterization due to their inherent properties make experimental studies more complicated than for chemicals and have for now limited risk assessment to few NMs.

Throughout their life cycle, NMs can be in powder, liquid suspension, aerosol, or embedded inside or at the surface of a material making the probability of exposure quite different. The frequency of exposure will also be very different between occupational settings where NMs are either produced, included in manufactured goods or released during waste recycling. Consumers, aware or not, may also be exposed to NMs included in cosmetics, food, clothes.... Ingestion, inhalation and skin applications are the main routes of exposure to NMs but the respiratory route is likely the most frequent in case of unintentional exposure. Lungs can be the target organ of NMs and/or just a route of entry of NMs into the organism where they could be further distributed by circulation and reach other organs distant from the lungs where they will elicit adverse effects. Nanotoxicology has get benefit from lessons learned in the toxicology of particles originated from air pollution [1]. Fine and ultrafine (nanosize range) particles are regulated in ambient air as it was clearly demonstrated that they contribute to mortality and morbidity that are not limited to respiratory causes. Their ability to induce inflammation as well as to cross the air-blood barrier is supposed to be involved in their systemic effects. In nanotoxicology it is thus crucial to characterize the ability of NMs to enter and cross the epithelial barrier by identifying the physico-chemical properties of NMs favouring or preventing this process as well as by determining the cellular and molecular mechanisms involved.

This chapter will first describe the anatomic and tissular specificities of the respiratory tract as well as the defense mechanisms involved in particle clearance. We will then present the state of

the art on NM internalization, translocation and biodistribution based on in vitro and in vivo studies.

2.2 The Respiratory Tract: Target Organ of Inhaled Nanomaterials

Respiration is an autonomic function and even being aware of the presence of a pollutant in the air we cannot stay without breathing for a long time. The only way to escape from exposure is to be able to get away from the polluted area. Air being frequently contaminated especially in specific environments, inhalation is a frequent route of exposure to pollutants among which NMs are emergent particulate air pollutants.

2.2.1 Structure of The Respiratory Tract

The respiratory tract is a pipe system with airways allowing air conduction from the nose and the mouth to the lung and pulmonary alveoli (Fig. 2.1a). Alveoli are tiny air sacs at the ending of the smallest airways and constitute the respiratory zone where gas exchanges between air and blood take place. There are many alveoli, 300 millions in adult humans, representing a large exchange surface (around 140 m²) and they are covered by very thin capillaries. This unit constitutes the air-blood barrier characterized by a very short distance (0.3–0.5 μm) between air and blood allowing oxygen entry and CO₂ release.

Conducting airways from trachea to bronchioli are delimited by a mucociliary epithelium (Fig. 2.1b). It is a pseudostratified epithelium composed of ciliated cells bearing 200–300 cilia at their apical surface, goblet cells secreting mucus and basal cells involved in epithelium regeneration. The integrity of the epithelial barrier is provided by different intercellular junctions: tight junctions at the apical zone, adherens junctions and desmosomes at the lateral membranes. The epithelium is separated from air by a

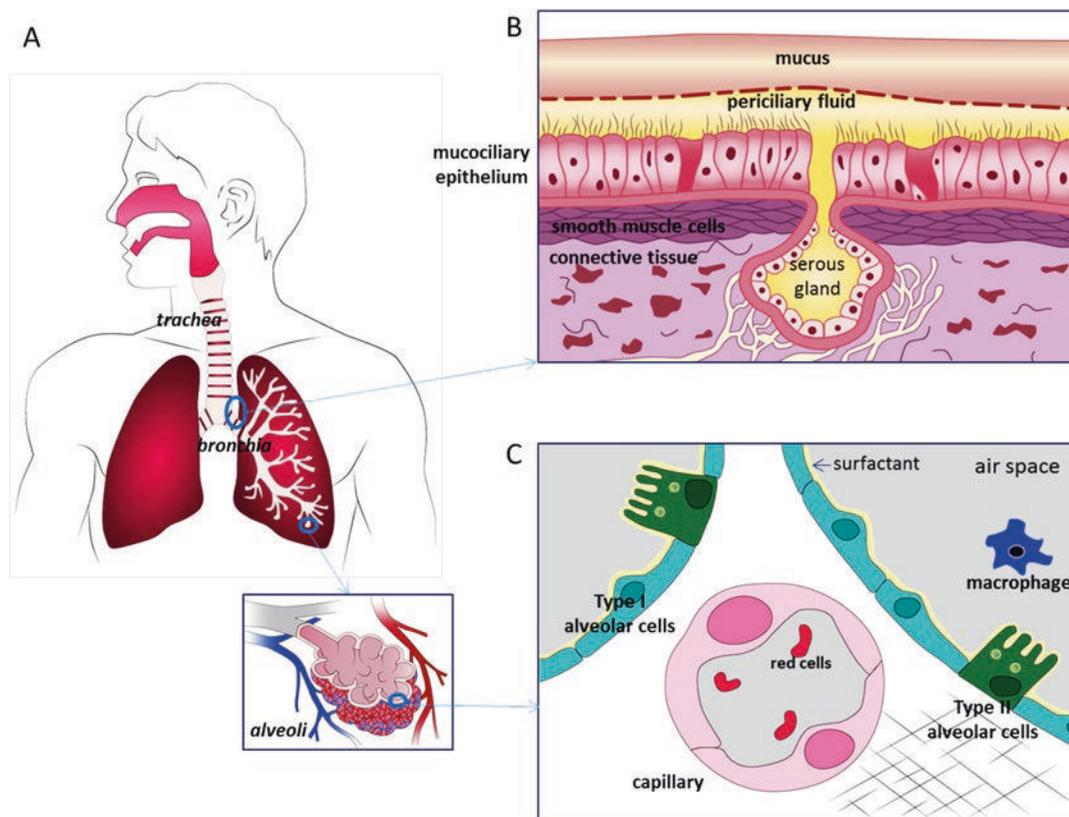


Fig. 2.1 The respiratory tract. (a) Scheme of the respiratory tract. (b) Details of the mucociliary epithelium lining the airways. The mucus layer produced by the goblet cells entraps particles and goes up towards the pharynx due to ciliary beating. (c) Details of the alveolar epithelium at the air-blood barrier. The alveolar epithelium is composed of

Type II alveolar cells involved in surfactant synthesis and Type I alveolar cells that cover 90–95% of the alveolar surface. The air – blood distance is around 0.2–0.3 μm . Macrophages, that are free in the alveolar lumen, are involved in particle phagocytosis

mucus layer that is continually swept from the distal to the proximal airways by the synchronous beating of cilia and finally expelled out of the lungs by expectoration or swallowed, removing entrapped particles, microorganisms and dissolved chemicals. The mucus layer is a mobile, essential barrier that protects the lungs when ciliary activity and mucus properties are maintained. At the level of the bronchiole, an additional cell types appears: club cells (previously called Clara cells) involved in xenobiotic metabolism.

Alveoli (Fig. 2.1c) are delimited by the alveolar epithelium lying on a basal membrane. Type I and type II alveolar cells that are joined by tight junctions, form this epithelium. Type I alveolar cells are large (about 400 $\mu\text{m}^2/\text{cell}$) and flat

(0.1/0.2 μm thickness) cells covering 90–95% of the surface of the alveolus. There is an equivalent number of type II alveolar cells, that fill the 10–5% remaining surface and which are specialized in the production of the surfactant, a tension-active substance covering the alveolar epithelium.

2.2.2 Particle Deposition

According to their physico-chemical characteristics, airborne particles may enter different regions of the respiratory tract. Three main mechanisms can occur in particle deposition: impaction, sedimentation, and diffusion which depend on

particle size, directional changes of air flow, and air velocity in the different parts of the respiratory tract. For NMs, diffusion predominates especially for the smallest ones for which the dynamic behavior looks like the one of gas molecules. This is the reason why an additional route of entry is suspected at the level of the olfactory epithelium in the nose. However, NMs can form aggregates and agglomerates modifying their deposition throughout the lung. Modulations of air flow due to physical efforts or respiratory diseases can profoundly change the levels and amount of deposited NMs. A computational model (MPPD for Multiple-Path Particle Dosimetry Model) is now available to predict particle deposition in humans and rats according to the physico-chemical properties of NMs and different exposure scenarios, allowing a precise dosimetry in specific parts of the respiratory tract [2].

2.2.3 Clearance Mechanisms

The clearance of insoluble particles occurs through two distinct processes: the mucociliary clearance and the alveolar clearance.

The mucociliary clearance results from the joined activity of goblet and ciliated cells allowing the removal of particles trapped in the mucus layer. Within 24 h, particles are eliminated from the human airways by this efficient mechanism.

In alveoli, macrophages remove particles by phagocytosis and migrate towards the mucociliary escalator to be eliminated, this whole process lasting several days. However, macrophages are less efficient in the phagocytosis of NMs compared to microparticles, making NMs dwelling longer in the alveolar space increasing their probability to interact and enter the alveolar epithelium and/or to cross the air-blood barrier.

2.3 Nanomaterial Internalisation

Excepting pathological situations or pollutant exposure that can affect epithelium integrity allowing paracellular passage, NM translocation implies a transcellular passage. Internalization of

NMs will be the first step for this NM translocation and systemic distribution, especially for insoluble NMs. This internalization will also lead to their accumulation in the epithelium where they could induce adverse effects. A better knowledge of the determinants and molecular mechanisms involved in NM uptake may provide clues to create safer NMs. Determining the sub-cellular localization of NMs is also particularly important to better understand potential mechanisms of toxicity.

2.3.1 Mechanism of Internalization

The plasma membrane delineating cells is a lipid bilayer including proteins that regulate and coordinate the entry and exit of molecules to maintain the specificity of the intracellular milieu relatively to the extracellular environment. Nutrients and other physiological relevant molecules as well as pathogens or pollutants are captured from the extracellular medium by endocytosis leading to their internalization into vesicles originated from the plasma membrane. Endocytosis can be divided into phagocytosis which concerns the uptake of large particles, molecular complexes or bacteria, and pinocytosis dedicated to the capture of fluids and solutes.

Phagocytosis is classically used by the so called “professional phagocytes” (i.e. macrophages, monocytes, polynuclear neutrophils) to protect the organism against invading pathogens or to take up cell debris and large particles. Their binding to specific receptors at the cell surface initiates the assembly of actin filaments leading to the engulfment of the particle like a zip. This will lead to the formation of large intracellular vesicles of 0.5–10 μm called phagosomes.

Concerning the process of pinocytosis, which is used by all cell types for the fluid phase uptake, different mechanisms are distinguished depending on the molecular mechanism involved: macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis or clathrin and caveolae independent mechanisms. Macropinocytosis involves the formation of cell protrusions through the assembly of actin fila-

ments but, in contrast to phagocytosis, the plasma membrane is not in close contact with the particle. This allows the uptake of big volumes of extracellular fluids into so called macropinosomes of 0.5–5 μm . In the contrary, the clathrin-mediated endocytosis is used for the specific uptake of molecules via receptor-ligand interactions. This process takes place at specific plasma membrane microdomains containing receptors linked to a submembrane network of proteins called clathrins. The formation of clathrin coated pits allows the invagination of the plasma membrane and finally the formation of intracellular vesicles of 100–150 nm. Caveolae-mediated endocytosis also involves specific receptors present in specialized lipid microdomains. These rafts are enriched in glycosphingolipids and cholesterol and contain the protein caveolin that allows the formation of small vesicles or tubules of about 80 nm in diameter. Beside these three main pinocytosis processes exist some other receptor mediated endocytosis mechanisms, involving proteins such as flotillin, IL2Rbeta or Arf-6 that allow the detachment of vesicles from the plasma membrane [3]. All these internalization mechanisms are active processes leading to the formation of intracellular vesicles. Some molecules could however also enter the cells via other processes such as through specific channels or passive diffusion through the membrane allowing their direct interaction with the cytoplasm.

2.3.2 Endocytic Pathways Used by Nanomaterials

Several studies have investigated the mechanisms involved in the uptake of NMs and the role of their physico-chemical characteristics by using different techniques and experimental approaches. Qualitative approaches, used to visualize the interactions of NMs with cells and their intracellular localization, are often combined to quantitative approaches to enable the relative or absolute quantification of NM uptake. Electron microscopy is particularly interesting as their high optical resolution is compatible with the study of nanosized objects. In case of non-

carbonaceous NMs, energy dispersive X-ray analysis could even be used to distinguish the NM from cellular components. Scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) are other high resolution techniques commonly used to study the interactions of NMs with membranes [4]. However, as these high resolution techniques are very time-consuming, confocal fluorescence microscopy is often used to study the uptake mechanisms of NMs. For quantitative analysis, fluorescence plate readers or flow cytometry have often been used but these techniques did not distinguish between surface bound and actually internalized NMs. Fluorescence quenching molecules which did not enter viable cells such as Trypan blue have been used to selectively quench the fluorescence of NMs which stick to the cell surface and thus to only quantify the intracellular signal [5]. Imaging flow cytometry also allows eliminating the signal of the adsorbed NM by using image analyzing tools for high-throughput analysis of the images of each individual cell analyzed by the flow cytometer [6]. Fluorescence based techniques have however the disadvantage to express results in arbitrary units and could thus only quantify the relative uptake of NMs. This pitfall could be overcome by using confocal Raman microscopy, laser positioning secondary neutral mass spectrometry (laser SNMS), time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS), laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), or synchrotron beamlines which allow the elemental analysis of the sample in combination with high-resolution 3D imaging [7, 8]. These techniques can thus not only be used for an absolute quantitative analysis of NM uptake but also for their surface or even subcellular distribution.

There are however several nano-specific challenges which have to be taken into account for a reliable interpretation of the results such as interferences due to optical properties of NMs, necessity of high resolution to distinguish single NMs, changes in their aggregation state due to experimental conditions, dissolution of NMs, or adsorption of biomolecules. In case of labeled NMs it has to be checked that the detected signal is not

due to leakage or dissolution of the fluorochrome and that the labeling has not changed the surface properties of the NM. Core-shell labeling techniques have thus been used to insure that the determined uptake mechanisms are representative of the unlabeled NM.

To determine the specific uptake mechanism involved, pharmaceutical inhibitors of the different endocytic pathways have been used. However, these are often highly toxic and their specificity and efficiency have been questioned [9, 10]. Co-localization with specific proteins such as caveolin or clathrin or the use of siRNA of these proteins are also useful tools to identify the endocytosis pathway. Combining inhibition of specific pathways with co-localization studies is crucial as different uptake mechanisms may be used to substitute the inhibited endocytic pathway. Using such a combined approach Vranic et al. [6] have shown that SiO₂ NPs of 100 nm are taken up by bronchial epithelial cells through macropinocytosis. This endocytic pathway seems indeed to be the most predominant uptake mechanism in epithelial cells. On the other hand, the uptake by alveolar macrophages could also involve phagocytosis of the material via receptor interactions. Some studies have also demonstrated the involvement of caveolin or clathrin dependent endocytosis [11–13] or flotillin dependent endocytosis [14] for NM uptake. Some NMs may even be able to enter cells by non active mechanisms as NMs have been found in red blood cells or could cross artificial membranes [4, 15, 16]. Studies using metabolic inhibitors have however shown that the uptake of NMs is most of the time due to active transport through the plasma membrane.

The uptake mechanism is particularly important for the fate of NMs inside the cell. Indeed, macropinosomes or clathrin coated vesicles will fuse with lysosomes which are acidic and contain hydrolases and other enzymes to degrade molecules or invading microorganisms. In contrast, caveolae can either fuse with the acidic lysosomes or with caveosomes which are endosomes with neutral pH which could traffic to the Golgi apparatus or the endoplasmic reticulum. The dissolution of NMs is fostered under acidic

conditions and the uptake via caveolae may thus protect NMs from degradation. Some NMs have been shown to destabilize lysosomes such as TiO₂ NPs in pulmonary cells [17] and are thus frequently found free in the cytoplasm. Some NMs have even been observed within the nucleus, for instance silica NPs in macrophages [18].

2.3.3 Physico-chemical Characteristics Influencing NM Uptake

The uptake mechanism will depend upon the physico-chemical properties of the NM. The size of the individual particle or the agglomerates/aggregates is one of the main features influencing the endocytic pathway (Fig. 2.2). Indeed, nano-sized objects may be taken up by clathrin dependent endocytosis as this pathway leads to the formation of vesicles of 100–150 nm or could enter caveolae which are less than 80 nm in diameter. Big particles (or agglomerates) will not be able to enter these small vesicles and will only be able to enter the cell by phagocytosis or macropinocytosis. Indeed, phagosomes and macropinosomes measure between 0.5 and 10 μm enabling the uptake of micron-sized structures. It is thus of crucial importance to ensure that the experimental conditions will not artificially modify the agglomerate size. Several pathways may be used simultaneously, especially if NMs or agglomerates of different sizes will coexist. The preferential particle size for uptake will depend upon the cell type. Professional phagocytes such as macrophages are more efficient to take up micrometer particles but non phagocytic cells internalize better NPs in comparison to macrophages [19]. The size of the NM will thus be a very important feature for the efficiency of the alveolar clearance but the size does not seem to play a major role in mucociliary clearance [20].

The shape of the NM will also influence their uptake (Fig. 2.2) such as curvature [21], roughness [4], and the aspect ratio of the particle (relationship between width and height). For instance, rod shaped silica NM with an aspect ratio of 2.1–2.5 were taken up by alveolar epithelial cells

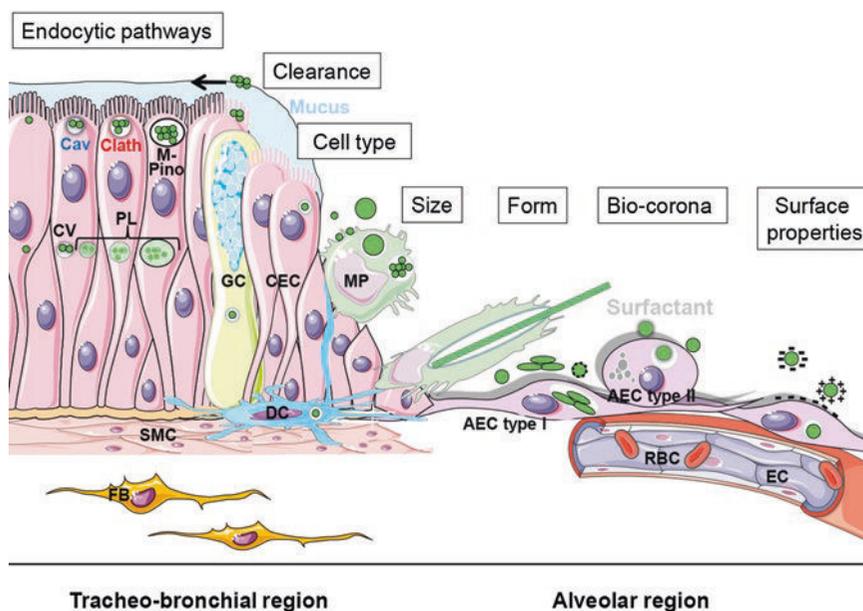


Fig. 2.2 Parameters influencing nanomaterial uptake by pulmonary cells. The fate of NMs depends upon cellular determinants such as endocytic pathways (leading to acidic phagolysosomes or neutral caveosomes), the efficiency of clearance mechanisms (alveolar or mucociliary clearance), and the cell type. The NM determinants of size (of individual NMs or their agglomerates), form (aspect ratio, curvature or roughness), interaction with biomole-

cules (lipids or proteins), and surface properties (such as charge and hydrophobicity) will also influence the uptake of NMs. AEC alveolar epithelial cell, Cav caveolae, CEC ciliated epithelial cell, Clath clathrin coated pit, CV Caveosome, DC dendritic cell, EC endothelial cell, FB fibroblast, GC goblet cell, M-Pino, Macropinosome, MP macrophage, PL phagolysosome, RBC red blood cell, SMC smooth muscle cell

in larger quantities compared to shorter or longer length rods [22]. Furthermore, alveolar macrophages could be unable to completely engulf high aspect ratio carbon nanotubes (termed frustrated phagocytosis) leading to an inflammatory reaction and pleural pathology including mesothelioma [23] just like the toxicity mechanism of inhaled asbestos fibers. Once again, the influence of the form on internalization has to be distinguished from its role in the adsorption of the NM to the cell surface. It has for instance been shown that prickly nanodiamonds adhere better to the cell surface but are less internalized than round nanodiamonds [24]. Beside these physical factors of size and shape, the surface properties of the NM will also be important factors for their internalization. Especially their hydrophobicity and surface charge will determine the interaction of NMs with cells. Indeed, the cell surface is negatively charged favoring the interaction with positively charged NMs. Imaging flow cytometry

has shown that a negative surface charge reduces the adsorption of TiO₂ NPs to bronchial epithelial cells and their subsequent internalization [6]. Even though most studies are in favor of uptake facilitation by positive surface charges, some contradictory results have been reported which may be explained by concomitant changes in the hydrophobicity of the synthesized particles or preferential interactions with specific proteins [19]. The surface charge or hydrophobicity could also influence the mucus penetration and thus the mucociliary clearance as shown for negative hydrophilic PLGA NPs which diffused across the mucus layer in contrast to positive or neutral hydrophobic NPs [25].

The uptake of NMs will also depend upon the interaction with biomolecules they will encounter before reaching the cells (Fig. 2.2). Lipids or proteins of the lung lining fluids will indeed interact with the NM to form a corona around the particle. The physico-chemical properties of the

resulting hybrid bio-nanoparticle will be different from the bare NM. Their so called “biological identity” will thus be determining for the cellular interaction. The biocorona will depend upon the NM characteristics as well as the physico-chemical properties of the proteins and the relative abundance of the proteins in the biological fluids. The composition of the corona can thus be modified when the NM moves from one environment to another. Many studies have investigated the consequences of NM incubation in serum but few studies have focused on the effect of surfactant or mucus. Contradictory results have been observed as surfactant inhibited the uptake of silica NPs in bronchial epithelial cells and macrophages [5]. Besides, incubation of polystyrene NPs with surfactant leads to the adsorption of surfactant protein A and D and enhanced NP uptake in alveolar epithelial cells [12]. Surfactant proteins have also been shown to facilitate the uptake of magnetite [26], polystyrene [27], diesel exhaust [28], and carbon black [28] NPs in macrophages but inhibited the internalization of positively charged (amino-modified) polystyrene NPs [27]. Due to the role of protein corona in NM uptake, the use of serum as a dispersant agent or culture media additive might be a problem for toxicity testing as this may not reflect the actual exposure scenario, especially for inhalation. It has been shown that dispersion of TiO₂ NPs in serum will increase the uptake by bronchial epithelial cells while reducing their *in vitro* and *in vivo* toxicity due to a concomitant reduction of their surface reactivity by the protein coating [29].

2.4 Nanomaterial Translocation

Adverse systemic effects induced by inhalation of NPs are suggested to result from lung inflammation but also from the passage of particles through the respiratory barrier [30]. The mechanism responsible for this crossing is called translocation. At the level of alveoli it enables NMs to cross the air-blood barrier to reach systemic circulation and secondary organs. At the level of

bronchioles where the distance to capillaries is larger, they may accumulate in the interstitium where they can reside for a long time as it has been shown in the lung parenchyma of women living in polluted cities [31]. Full evidence of NM translocation and further biodistribution was provided by *in vivo* studies using radiolabeled particles. *In vitro* models of epithelial barriers were developed with the aim to identify the mechanisms involved in the translocation process as well as to characterize the absorption phase in toxicokinetic studies. It is of paramount importance to understand the underlying mechanisms involved in the ability of NM to translocate epithelial barriers. Knowing the physico-chemical characteristics preventing or favoring such passage would help in designing safer NMs either by reducing their crossing ability or by increasing it in the case of NMs used in nanomedicine.

2.4.1 In Vitro Studies

To determine how NMs can cross epithelial barriers, *in vitro* models of these barriers are the best way to grasp the direct interaction between the cellular sheet and particles. There are two possibilities for NMs to cross the epithelial barrier: the transcellular route also called transcytosis, or the paracellular route (Fig. 2.3).

Transcytosis consists in the transfer from the apical side of the epithelium to the basal side through cells. This implies that NMs are internalized by cells at the apical side of the epithelium where NM exposure takes place and then be transferred through the cells before a final exocytosis at the basal side. The paracellular route consists in the transfer between cells through the different junctions which are established between each epithelial cell. Among them, tight junctions are located at the apical side of cells and are pivotal to ensure the sealing of the epithelial sheet and its impermeability. In tight connection with the cytoskeleton they also contribute in maintaining the structure of the epithelium. However different insults (pollutants, chronic inflammation, or infection) can disrupt these junctions allowing

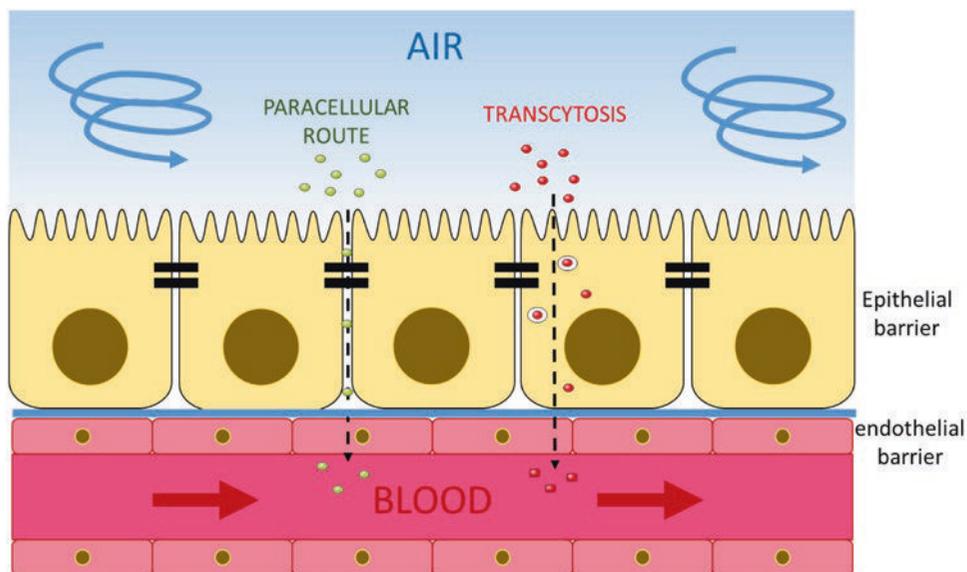


Fig. 2.3 Translocation processes through the epithelial barrier. Epithelial cells form a tight barrier due to the presence of tight junctions. The translocation of particles from the air compartment to the blood can occur either through cells, a process called transcytosis which requires the

uptake of the particle by cells and their traffic from the apical part to the basal part of the cells for exocytosis, or by the paracellular route in case of opening of the junctions either by nanomaterials or other insults

NMs to enter the intercellular space and to reach the basal side, as the junctions below the tight junction area are weaker. NMs themselves could disturb these junctions as it was shown for adherens junctions of endothelial cells [32]. TiO_2 as well as SiO_2 and Ag NPs were shown to physically interact with VE-cadherin triggering its phosphorylation and loss of contact with p120 and β -catenin. This induces signaling pathways that lead to actin remodeling and VE-cadherin degradation leading to endothelial cell leakiness [33]. In order to study NM translocation in vitro, cells have to be seeded on porous membranes of an insert device allowing the separation of the apical compartment corresponding to the face exposed to the air, from the basal compartment mimicking the blood. Particles are applied to the apical side and those having crossed the epithelial barrier are recovered in the basal one.

For a better relevance, models established using human cells are favored. Many human airway/alveolar cell lines or primary cells are avail-

able but for translocation studies, they have to meet some criteria:

- To be cultivable on insert devices (such as Transwells®) to separate apical and basal sides and to obtain polarized epithelium.
- To grow on insert membranes which exhibit pores large enough to allow NM transfer to the basal compartment.
- To form tight junctions to obtain an efficient epithelial barrier. The strength of the tight junctions can be checked by monitoring the Trans-Epithelial Electric Resistance (TEER) or by measuring the paracellular crossing of marker molecules. For instance, Lucifer Yellow is a fluorescent dye which when applied for a short time, can cross an epithelium only by the paracellular route.

Alveolar epithelial cells could be used to establish an air-blood barrier in vitro. However, the most commonly used human alveolar type II

Table 2.1 Overview of the different studies investigating nanomaterial translocation in vitro

Cellular model(s)	Nanoparticles characteristics	Main findings	References
Calu-3 A549 Murine pneumocytes	Polystyrene 46 nm Carboxyl- and amine-modified particles Detection: fluorescence	Acceptable TEER only for Calu-3 6% translocation	Geys et al. 2006 [37]
Calu-3	CeO ₂ , ZnO 28–120 nm uncoated and SiO ₂ -coated Detection: Gamma spectroscopy	Significant translocation of each type of material 0,0025–0,025% of translocation	Cohen et al. 2014 [39]
ATI and ATII cells	Polystyrene 50, 100 nm Unmodified, carboxyl-modified, amine-modified Detection: fluorescence	Translocation ensured by ATI cells Unmodified-50 nm: 3% translocation Carboxyl-modified-50 nm: 8% translocation	Thorley et al. 2014 [12]
Calu-3 A 549 NCI-H292	SiO ₂ -FITC 50 nm Uncoated Detection: fluorescence	Acceptable TEER only for Calu-3 3% translocation	George et al. 2015 [34]
Calu-3	SiO ₂ , TiO ₂ 16, 50, 100 nm Negatively or positively charged Detection: fluorescence	17.9%/14.4%/12.1% translocation for 16, 50, 100 nm SiO ₂ (–) 13%/5%/4% translocation for 16, 50, 100 nm SiO ₂ (+)	George et al. 2015 [38]
A549 MLE-12 (murine ATII) 16HBE14o-	Au 2, 7, 18, 46, 80 nm Uncoated Detection: ICP-MS	Translocation rate inversely correlated with size	Bachler et al. 2015 [35]

cell line A549 do not establish strong tight junctions even when grown on inserts for several days [33, 34]. The immunolabeling of the protein ZO-1 (zonula occludens-1) associated to tight junctions did not show consistent staining and the TEER detected for this model was low (around 40 ohm/cm²) after more than 10 days in culture [34, 35]. An alveolar type I-like cell phenotype was recently obtained by immortalization of primary human alveolar type II cells but they are also characterized by a low TEER (57 ohm/cm²) [12, 36].

Several studies have compared different human respiratory cell lines to investigate which one could produce a tight epithelium in vitro (Table 2.1) to be suitable for translocation studies [33, 34, 37]. It became apparent that until now, the Calu-3 cell line offers the best compromise albeit it is not an alveolar cell. When grown on inserts, this human bronchial epithelial cell line derived from a lung adenocarcinoma, produced a polarized epithelium with a dense web of microvilli at the apical surface, synthesized and

released mucus, and exhibited a high TEER (>500 Ω/cm²) [34]. With this model, different studies have been performed to characterize the translocation of NMs as summarized in Table 2.1. Geys et al. using polystyrene NPs of 46 nm in diameter and being either carboxyl- or amine modified, found a 6% translocation whatever the modification [37]. George et al., using SiO₂ NPs of different sizes and charges, demonstrated that translocation was increased for the smallest and negatively charged NPs reaching up to 17% [38]. Cohen et al., using ZnO NPs and CeO₂ NPs of two different sizes with or without a SiO₂ coating, observed a translocation for all NMs but at very low amounts (<0.01%) [39]. The common feature of these studies is that the translocation was not associated with an alteration of the integrity of the epithelial monolayer, suggesting transcytosis of internalized NMs. However, altogether these data revealed that the amount of translocation could be quite different according to the physico-chemical properties of the NM. For now, not enough studies have been performed to

clearly identify which particle determinants are the most relevant in particle translocation. Characteristics such as size, aggregation, composition, charges and coating are among the factors that could contribute to this process as underlined by the few examples already described above and summarized in Table 2.1. In addition to these intrinsic NM properties, it has also to be taken into account the influence of the cellular environment that can favor the creation of a biocorona on the NMs modulating their fate [38].

2.4.2 In Vivo Studies

For a long time it was suspected that the extrapulmonary effects induced by exposure to ambient particulate matter was in part related to the translocation of their ultrafine fraction without being able to demonstrate it in absence of a sensitive detection method [40]. In 2002 Nemmar et al. claimed that (99 m)Technecium-labeled ultrafine carbon particles pass into the systemic circulation shortly after inhalation by five healthy volunteers [41]. However, two other studies did not confirm significant translocation of these NMs and demonstrated that the gamma camera imaging technique used to detect the NM was in fact detecting unbound (99 m)Tc-pertechnetate [42, 43]. Thanks to stable radiolabeled engineered NPs, it became evident from animal studies that this translocation was possible allowing their biodistribution to secondary organs. The liver is frequently the one accumulating the most important part of NMs. Translocation has now been demonstrated for a large panel of NMs (as summarized in Table 2.2) such as organic ones including polymeric and carbonaceous NPs [41–43, 45, 46], metal oxides [47–49], metals such as gold and iridium [35, 45–47, 49–55]. According to the studies, the translocation is not always fully quantified but limited to the detection of NMs in some secondary organs. Studies from Kreyling's group have performed mass balance analysis showing that the translocation after unique exposure was very low. As an example, maximum *in vivo* translocation of up to 5% was documented for polystyrene latex NPs after pulmonary instil-

lation in rats [56]. Translocation rates are mostly under 1% and can be influenced by the administration route: <0,02% and <0,06% for iridium NPs after respectively inhalation and endotracheal intubation in rats [50, 51].

Size seems to be a critical parameter driving the ability of NMs to cross the air-blood barrier. It was demonstrated by Choi et al. using a large panel of organic, inorganic and hybrid NMs which fate after instillation in rats was detected on line owing to their near-infrared fluorescence that they accumulate in lymph nodes [46]. They concluded that a rapid translocation in the lung required NPs with a hydrodynamic diameter under 38 nm and that below this size the amount of translocation was dependent on charges [46]. The role of the size was also strengthened by studies of Kreyling's group using radiolabeled NPs such as iridium and gold NPs [41, 55]. They showed that the translocated fraction of the 80 nm Ir NPs inhaled by rats for one hour was about an order of magnitude less than that of 15-nm Ir NPs [50]. For Au NPs intratracheally instilled in rats, the highest translocation at 24 h was observed for 1.4 nm Au NPs and the lowest for 80 nm Au NPs but 200 nm Au NPs exhibited a higher translocation rate than 80 nm Au NPs [55]. In addition, they observed that negatively charged NPs had a better translocation rate than positively charged NPs supporting Choi's conclusions. These data underline that size and charge are important determinants of NM translocation but other studies also revealed the role of the coating [46].

In one study it was investigated whether the translocation rate could be modified in compromised animals. A murine model of cystic fibrosis was compared to wild type mice after a one hour inhalation of 30 nm iridium NPs. The biokinetic was not modified but an increased uptake of nanoparticles by alveolar cells was observed in compromised animals [53].

Translocation from the respiratory tract is not limited to the deep lung but can also occur in its upper part at the nasal level where the NMs may reach the brain through the olfactory bulb. This pathway was first suggested by Elder et al. having observed an accumulation of manganese oxide

Table 2.2 *In vivo* studies investigating translocation of nanomaterials from respiratory route

Animal model(s)	Nanoparticles characteristics	Main findings	Reference
Exposure mode			
Time of detection			
Hamsters	Albumin 100–200 nm	Radioactivity distribution shows low biodistribution (<1%) in secondary organs (liver, heart, spleen, kidneys, brain)	Nemmar et al. 2001 [44]
Endotracheal intubation	Uncoated		
60 min	Detection: radioactivity		
Rats	Iridium 15–80 nm	Translocation in very low amount to liver, spleen, kidney, heart and brain (<0,02%)	Kreyling et al. 2002 [50]
Inhalation	Uncoated		
7 days	Detection: radioactivity		
Human	Carbon 5–10 nm	Detectable translocation to liver (stable with time) and bladder (decreasing with time)	Nemmar et al. 2002 [41]
Inhalation	Uncoated		
60 min	Detection: radioactivity		
Rats	Carbon 35 nm	Small but significant translocation to several part of brain (<0,5 µg ¹³ C/g of tissue)	Oberdörster et al. 2004 [58]
Whole body exposure	Uncoated		
7 days	Detection: radioactivity		
Rats	Iridium 15–20 nm	Rapid translocation to secondary organs (liver, spleen, brain, kidney) very low (<0,06%) decreasing with time (complete excretion after 20 days)	Semmler et al. 2004 [51]
Endotracheal intubation	Uncoated		
180 days	Detection: Radioactivity		
Rats	Manganese oxide 30 nm	Significant increase of Mn in several part of brain increasing with time and number of exposures	Elder et al. 2006 [47]
Whole body + intranasal instillation	Uncoated		
12 days	Detection by ICP-MS		
Human	Carbon 5–25 nm	Translocation into blood, excreted with urine	Mills et al. 2006 [42]
Inhalation	Uncoated		
6 h	Detection: radioactivity		
Human	Carbon 35 nm	Translocation into blood, excreted with urine	Wiebert et al. 2006 [43]
Inhalation	Uncoated		
24 h	Detection: radioactivity		
Rats	Iridium and carbon	24 h retention of NPs shows biodistribution to various secondary organs (liver, spleen, kidneys, heart, brain, blood)	Kreyling et al. 2009 [45]
Inhalation	Primary size: 2–10 nm		
24 h	Uncoated Detection: radioactivity		
Rats	Polystyrene latex 20–1000 nm	Significant translocation to secondary organs (up to 5%)	Sarlo et al. 2009 [56]
Oropharyngeal aspiration	Carboxylated surface		
120 days	Detection: fluorescence		
Rats	Organic/inorganic/hybrid	Translocation to blood and secondary organs	Choi et al. 2010 [46]
Pulmonary instillation	5 à 300 nm		
60 min	ZnCd _s , Zn _s , PEG coated Detection: near-infrared fluorescence		

(continued)

Table 2.2 (continued)

Animal model(s)	Nanoparticles characteristics	Main findings	Reference
Exposure mode			
Time of detection			
Rats	Gold 5–30 nm	No detectable translocation	Lipka et al. 2010 [52]
Intratracheal instillation	Au-Phos, Au-PEG750, Au-PEG10k		
24 h	Detection: radioactivity		
Mice	Europium oxide 80–100 nm	Large fraction remaining in the lung but significant translocation to secondary organs detectable 24 h after instillation (kidney, heart, liver, spleen)	Abid et al. 2013 [48]
Oropharyngeal aspiration	Gadolinium coated		
60 min	Detection by ICP-MS		
Mice (+/- cystic fibrosis)	Iridium 30 nm	Translocation in very low amount detectable 24 h after exposure in both +/- cystic fibrosis mice in several organs (trachea, heart, brain, skin, liver, skin, kidney)	Geiser et al. 2014 [53]
Inhalation	Uncoated		
24 h	Gamma spectroscopy		
Mice	Polymere-lipid 155–450 nm	Translocation to liver and kidney for both 150 and 450 nm	Garbuzenko et al. 2014 [59]
Inhalation	Uncoated		
4 weeks	Detection: fluorescence		
Rats	Barium sulfate 150–350 nm	Translocation to several part of the body	Konduru et al. 2014 [60]
Intratracheal instillation	Uncoated		
7 days	Detection: radioactivity		
Rats	Gold	Translocation rate is inversely correlated with nanoparticles sizes	Kreyling et al. 2014 [55]
Intratracheal instillation	(1.4, 2.8, 5, 18, 80, 200 nm) Thioglycolic acid, cysteamine coated		
24 h	Detection: Radioactivity		
Rats	Titanium Dioxide 20–1680 nm	Translocation rate is correlated with administered dose	Shinohara et al. 2015 [49]
Intratracheal instillation	Uncoated vs Al(OH) ₃ coated		
90 days	Detection by ICP-SFMS		
Rats and mice	Gold 2–80 nm	Translocation rate is inversely correlated with nanoparticles sizes	Bachler et al. 2015 [35]
Inhalation and intratracheal instillation	Uncoated		
96 h	In <i>silico</i> modelisation		
Rats	¹⁹² Iridium 20 nm	Higher accumulation in brain and more circulating NP in blood after nose-only inhalation	Kreyling et al. 2016 [57]
Nose-only inhalation and intratracheal inhalation	Detection: radioactivity		
1 h		Translocation to the brain is favored by deposition of particle in the upper respiratory tract via theneuronal pathways	

NPs in the olfactory bulb [47]. These findings were recently confirmed by Kreyling et al. who performed different types of exposure (nose-only and ventilation/intubation) to determine the contribution of the olfactory bulb in NP accumulation in the brain. The amount of iridium NPs accumulated in the brain was ten times higher in case of nose-only exposure [57].

References

- Stone V, Miller MR, Clift MJ et al (2016) Nanomaterials vs ambient ultrafine particles: an opportunity to exchange toxicology knowledge. *Environ Health Perspect.* <https://doi.org/10.1289/EHP424>
- MPPD, Multiple-Path Particle Dosimetry Model (n.d) (MPPD v 3.04) <https://www.ara.com/products/multiple-path-particle-dosimetry-model-mppd-v-304>
- Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857–902
- Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR et al (2009) Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces. *Langmuir* 25(11):6287–6299
- Vranic S, Garcia-Verdugo I, Darnis C et al (2013) Internalization of SiO₂ nanoparticles by alveolar macrophages and lung epithelial cells and its modulation by the lung surfactant substitute Curosurf. *Environ Sci Pollut Res Int* 20(5):2761–2770
- Vranic S, Boggetto N, Contremoulins V et al (2013) Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part Fibre Toxicol* 10:2
- Astolfo A, Arfelli F, Schülte E et al (2013) A detailed study of gold-nanoparticle loaded cells using X-ray based techniques for cell-tracking applications with single-cell sensitivity. *Nanoscale* 5(8):3337–3345
- Drescher D, Kneipp J (2012) Nanomaterials in complex biological systems: insights from Raman spectroscopy. *Chem Soc Rev* 41(17):5780–5799
- Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT et al (2010) The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther* 18(3):561–569
- Ivanov AI (2008) Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 440:15–33
- Brandenberger C, Mühlfeld C, Ali Z et al (2010) Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol-coated gold nanoparticles. *Small* 6(15):1669–1678
- Thorley AJ, Ruenraroengsak P, Potter TE et al (2014) Critical determinants of uptake and translocation of nanoparticles by the human pulmonary alveolar epithelium. *ACS Nano* 8(11):11778–11789
- Bohmer N, Jordan A (2015) Caveolin-1 and CDC42 mediated endocytosis of silica-coated iron oxide nanoparticles in HeLa cells. *Beilstein J Nanotechnol* 6:167–176
- Kasper J, Hermanns MI, Bantz C et al (2013) Flotillin-involved uptake of silica nanoparticles and responses of an alveolar-capillary barrier in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 84(2):275–287
- Rothen-Rutishauser BM, Schürch S, Haenni B et al (2006) Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol* 40(14):4353–4359
- Zhao Y, Sun X, Zhang G et al (2011) Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS Nano* 5(2):1366–1375
- Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I et al (2010) Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 7:10
- Nabeshi H, Yoshikawa T, Arimori A et al (2011) Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res Lett* 6(1):93
- Fröhlich E (2012) The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7:5577–5591
- Kirch J, Guenther M, Doshi N et al (2012) Mucociliary clearance of micro- and nanoparticles is independent of size, shape and charge – an ex vivo and in silico approach. *J Control Release* 159(1):128–134
- Florez L, Herrmann C, Cramer JM et al (2012) How shape influences uptake: interactions of anisotropic polymer nanoparticles and human mesenchymal stem cells. *Small* 8(14):2222–2230
- Meng H, Yang S, Li Z et al (2011) Aspect ratio determines the quantity of mesoporous silica nanoparticle uptake by a small GTPase-dependent macropinocytosis mechanism. *ACS Nano* 5(6):4434–4447
- Donaldson K, Murphy FA, Duffin R et al (2010) 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* 7:5
- Zhang B, Feng X, Yin H et al (2017) Anchored but not internalized: shape dependent endocytosis of nanodiamond. *Sci Rep* 7:46462
- Mura S, Hillaireau H, Nicolas J et al (2011) Biodegradable nanoparticles meet the bronchial airway barrier: how surface properties affect their interaction with mucus and epithelial cells. *Biomacromolecules* 12(11):4136–4143

26. Ruge CA, Schaefer UF, Herrmann J et al (2012) The interplay of lung surfactant proteins and lipids assimilates the macrophage clearance of nanoparticles. *PLoS One* 7(7):e40775
27. McKenzie Z, Kendall M, Mackay RM et al (2015) Surfactant protein A (SP-A) inhibits agglomeration and macrophage uptake of toxic amine modified nanoparticles. *Nanotoxicology* 9(8):952–962
28. Shaw CA, Mortimer GM, Deng ZJ et al (2016) Protein corona formation in bronchoalveolar fluid enhances diesel exhaust nanoparticle uptake and pro-inflammatory responses in macrophages. *Nanotoxicology* 10(7):981–991
29. Vranic S, Gosens I, Jacobsen NR et al (2017) Impact of serum as a dispersion agent for in vitro and in vivo toxicological assessments of TiO₂ nanoparticles. *Arch Toxicol* 91(1):353–363
30. Braakhuis HM, Park MV, Gosens I et al (2014) Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol* 11:18
31. Churg A, Brauer M, del Carmen A-CM et al (2003) Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect* 111(5):714–718
32. Setyawati MI, Tay CY, Chia SL et al (2013) TiO₂ nanomaterials cause endothelial cells leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin. *Nat Commun* 4:1673
33. Geys J, Nemery B, Hoet PH (2007) Optimisation of culture conditions to develop an in vitro pulmonary permeability model. *Toxicol In Vitro* 21(7):1215–1219
34. George I, Vranic S, Boland S et al (2015) Development of an in vitro model of human bronchial epithelial barrier to study nanoparticle translocation. *Toxicol In Vitro* 29(1):51–58
35. Bachler G, Losert S, Umehara Y et al (2015) Translocation of gold nanoparticles across the lung epithelial tissue barrier: Combining in vitro and in silico methods to substitute in vivo experiments. *Part Fibre Toxicol* 12:18
36. Kemp SJ, Thorley AJ, Gorelik J et al (2008) immortalization of human alveolar epithelial cells to investigate nanoparticle uptake. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(5):591–597
37. Geys J, Coenegrachts L, Vercammen J et al (2006) In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study. *Toxicol Lett* 160(3):218–226
38. George I, Naudin G, Boland S et al (2015) Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier. *Nanoscale* 7(10):4529–4544
39. Cohen JM, Derk R, Wang L et al (2014) Tracking translocation of industrially relevant engineered nanomaterials (ENMs) across alveolar epithelial monolayers in vitro. *Nanotoxicology* 1:216–225
40. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S et al (2013) Differences in the biokinetics of inhaled nano-versus micrometer-sized particles. *Acc Chem Res* 46(3):714–722
41. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B et al (2002) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105(4):411–414
42. Mills NL, Amin N, Robinson SD et al (2006) Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med* 173(4):426–431
43. Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Falk R et al (2006) No significant translocation of inhaled 35-nm carbon particles to the circulation in humans. *Inhal Toxicol* 18(10):741–747
44. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF et al (2001) Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *A J Respir Crit Care Med* 164:1666–1668
45. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Seitz J et al (2009) Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol Suppl* 1:55–60
46. Choi HS, Ashitate Y, Lee JH et al (2010) Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol* 28(12):1300–1304
47. Elder A, Gelein R, Silva V et al (2006) Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* 114(8):1172–1178
48. Abid A D, Anderson D S, Das G K et al (2013) Novel lanthanide-labeled metal oxide nanoparticles improve the measurement of in vivo clearance and translocation. *Part Fibre Toxicol* 0:1
49. Shinohara N, Osima Y, Kobayashi T et al (2015) Pulmonary clearance kinetics and extrapulmonary translocation of seven titanium dioxide nano- and submicron materials following intratracheal administration in rats. *Nanotoxicology* 9(8):1050–1058
50. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F et al (2002) Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A* 65(20):1513–1530
51. Semmler M, Seitz J, Erbe F et al (2004) Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* 16(6–7):453–459
52. Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling RA et al (2010) Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* 31(25):6574–6581
53. Geiser M, Stoeger T, Casaulta M et al (2014) Biokinetics of nanoparticles and susceptibility to particulate exposure in a murine model of cystic fibrosis. *Part Fibre Toxicol* 11:19

54. Konduru NV, Jimenez RJ, Swami A et al (2015) Silica coating influences the corona and biokinetics of cerium oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 12:31
55. Kreyling WG, Hirn S, Möller W et al (2014) Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS Nano* 8(1):222–233
56. Sarlo K, Blackburn KL, Clark ED et al (2009) Tissue distribution of 20 nm, 100 nm and 1000nm fluorescent polystyrene latex nanospheres following acute systemic or acute and repeat airway exposure in the rat. *Toxicology* (263):117–126
57. Kreyling WG (2016) Discovery of unique and ENM-specific pathophysiological pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 299:41–46
58. Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V et al (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16:437–445
59. Garbuzenko OB, Winkler J, Tomassone MS et al (2014) Biodegradable Janus Nanoparticles for local pulmonary delivery of hydrophilic and hydrophobic molecules to the lungs. *Langmuir*:12941–12949
60. Konduru N, Keller J, Ma-Hock L et al (2014) Biokinetics and effects of barium sulfate nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 11:55

VALORISATION SCIENTIFIQUE

1) Article journalistique de vulgarisation

Dosimétrie des nanoparticules

C. Puisney

Article publié en Septembre 2016 dans la lettre de l'Association pour la Recherche En Toxicologie (ARET)

2) Communication orale au Congrès International « NANOSAFE 5th International Conference »

Effects of brake wear nanoparticles on respiratory cells

C. Puisney, E. Oikonomou, S. Nowak, A. Chevillot, J-F. Berret, A. Baeza-Squiban (07-10/11/16, Grenoble)

3) Communication affichée au Congrès National Santé et Environnement de la SFSE (Société Française de Santé et Environnement) « Qualité de l'air et Santé : Sciences et Echelles d'action »

Effects of brake wear nanoparticles on respiratory cells

C. Puisney, E. Oikonomou, S. Nowak, A. Chevillot, J-F. Berret, A. Baeza-Squiban (28-29/11/16, Strasbourg)

4) Chapitre de livre – Septembre 2017

Nanoparticles as Nitroso-glutathione vehicles

Luc Ferrari, Roudayna Diab, Christophe Nemos, Ramia Safar, **C.Puisney**

Chapitre publié dans “Biomedical applications of nanoparticles” (Editor : B.H. RIHN ; ISBN : 9781351648417)

5) Communication affichée au Congrès International « European Aerosol Conference »

Effects of brake wear nanoparticles on respiratory cells

C. Puisney, E. Oikonomou, S. Nowak, A. Chevillot, J-F. Berret, A. Baeza-Squiban (27/08-01/09/17, Zurich)

6) Communication orale au Congrès International de l'IMBG (Institut des Métaux en Biologie de Grenoble)

« Metallic nanoparticles : Applications, Environment, Safe-by-design and Health »

Effects of brake wear nanoparticles on respiratory cells

C. Puisney, E. Oikonomou, S. Nowak, A. Chevillot, J-F. Berret, A. Baeza-Squiban
(13-17/09/17, Villard de Lans)

- 7) **Communication affichée au Congrès International de l'IMBG (Institut des Métaux en Biologie de Grenoble**
« **Metallic nanoparticles : Applications, Environment, Safe-by-design and Health** »

Effects of brake wear nanoparticles on respiratory cells

C. Puisney, E. Oikonomou, S. Nowak, A. Chevillot, J-F. Berret, A. Baeza-Squiban
(13-17/09/17, Villard de Lans)

- 8) **Communication affichée au Congrès International « Inhaled Particles XII »**

Effects of brake wear nanoparticles on respiratory cells

C. Puisney, E. Oikonomou, S. Nowak, A. Chevillot, J-F. Berret, A. Baeza-Squiban
(25-27/09/17, Glasgow)

- 9) **Chapitre de livre**

Nanoparticles in Lung : Internalisation and Translocation

C. Puisney, S. Boland, A. Baeza-Squiban

Part of book «Cellular and Molecular Toxicology Nanoparticles » ; Advances in Experimental Medicine and Biology 2018 ; 1048 : 21-36 . DOI : 10.1007/978-3-319-72041-8_2

- 10) **Publication**

Brake wear (nano)particles : Physicochemical characterization and effects on respiratory cells

C. Puisney, E. Oikonomou, S. Nowak, A. Chevillot, S. Casale, J-F. Berret, A. Baeza-Squiban
Environmental Science Nano ; 2018 ; 5 ; 1036-1044

- 11) **Communication affichée au Congrès International « BioBarriers 12th »**

Effects on the brake wear particles on the protection and repair functions of the airway barrier

C. Puisney-Dakhli, V. Contremoulins, X. Baudin, J. Berthier, J-F. Berret, A. Baeza-Squiban
(27-29/08/2018, Saarbrücken)

Collaborations

1) Publication

Supported pulmonary surfactant bilayers on silica nanoparticles: Formulation, stability and impact on lung epithelial cells F. Mousseau, C. Puisney, S. Mornet, R. Le Borgne, A. Vacher, M. Airiau, A. Baeza-Squiban, J.F. Berret
Nanoscale, 2017, DOI: 10.1039/C7NR04574C

2) Communication orale au Congrès International de l'IMBG (Institut des Métaux en Biologie de Grenoble) « Metallic nanoparticles : Applications, Environment, Safe-by-design and Health »

Supported pulmonary surfactant bilayers on silica nanoparticles: Formulation, stability and impact on lung epithelial cells
F. Mousseau, C. Puisney, S. Mornet, R. Le Borgne, A. Vacher, M. Airiau, A. Baeza-Squiban, J.F. Berret
(13-17/09/17, Villard de Lans)

La pollution particulaire de l'air provient de différentes sources dont le trafic routier et est reconnue pour avoir un impact significatif sur la santé. Grâce à un meilleur contrôle des émissions à l'échappement, la contribution des émissions non liées à l'échappement à la pollution de l'air s'accroît. Dans celles-ci se trouvent les particules d'usure des freins dont la toxicité est mal caractérisée. Dans cette thèse nous avons travaillé sur des particules d'usure de freins recueillies sur différents véhicules avec pour objectif une caractérisation physico-chimique et toxicologique de ces particules et de leur fraction nanométrique. Ces particules présentent une hétérogénéité de forme et de taille avec une fraction nanoparticulaire dont le fer et le cuivre sont les composants principaux. L'étude toxicologique a été réalisée sur un modèle 3D de cellules épithéliales bronchiques humaines (Calu-3) cultivées en *Transwell*® permettant d'obtenir une barrière épithéliale respiratoire. Les nanoparticules (NPs) jusqu'à 100 µg/cm² n'affectent pas la viabilité cellulaire à 24h et n'induisent pas de réponse-proinflammatoire. La technique de « single Particle ICP-MS » nous a permis de démontrer qu'elles sont capables de traverser la barrière respiratoire en faible quantité, probablement par transcytose. De plus ces NPs induisent l'expression et la production de la mucine MUC5AC par un mécanisme dépendant de la voie du récepteur à l'EGF. Dans un test de blessure réalisé sur un épithélium pré-exposé aux NPs, la vitesse de réparation de la lésion n'est pas modifiée mais la prolifération est plus importante que dans un épithélium non pré-exposé. En conclusion, la fraction nanoparticulaire métallique présente dans les particules d'usure des freins traverse faiblement la barrière épithéliale bronchique, induit la production de mucus et active la prolifération lors de la réparation ce qui pourrait suggérer une implication dans le remodelage des voies respiratoires.

MOTS-CLES : Translocation, Mucus, Réparation, Barrière épithéliale, Migration

Particulate air pollution results from a variety of sources including road traffic and is known to have a significant impact on health. With improved exhaust emissions control, the contribution of non-exhaust emissions to air pollution is increasing. In these are brake wear particles whose toxicity is poorly characterized. In this thesis we worked on brake wear particles collected on different vehicles with the aim of achieving a physico-chemical and toxicological characterization of these particles and their nanometric fraction. These particles have a heterogeneity of shape and size with a nanoparticulate fraction of which iron and copper are the main components. The toxicological study was performed on a 3D model of human bronchial epithelial cells (Calu-3) grown in *Transwell*® to obtain a pertinent respiratory epithelial barrier. Nanoparticles (NPs) do not affect cell viability up to 100 µg/cm² at 24 hours and do not induce a proinflammatory response. The technique of "Single Particle ICP-MS" has allowed us to demonstrate that particles are able to cross the respiratory barrier in small quantities, probably by transcytosis. In addition, these NPs induce expression and production of MUC5AC mucin by a mechanism dependent on the EGFR pathway. In a wound healing test carried out on an epithelium pre-exposed to the NPs, kinetic repair of the lesion is not modified but the proliferation is greater than in a non-pre-exposed epithelium. In conclusion, the metal nanoparticulate fraction present in brake wear particles weakly crosses the bronchial epithelial barrier, induces production of mucus and activates the proliferation during the repair which could suggest an implication in the remodeling of the airways.

KEYWORDS : Translocation, Mucus, Repair, Epithelial barrier, Migration

