



HAL
open science

Remodelage pulmonaire après exposition à des micro et nanoparticules de silice chez des travailleurs du bâtiment et des travaux publics

Vanessa Marques da Silva

► **To cite this version:**

Vanessa Marques da Silva. Remodelage pulmonaire après exposition à des micro et nanoparticules de silice chez des travailleurs du bâtiment et des travaux publics. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2022. Français. NNT : 2022PA120072 . tel-04860615

HAL Id: tel-04860615

<https://theses.hal.science/tel-04860615v1>

Submitted on 1 Jan 2025

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.

THESE DE DOCTORAT

en **Santé publique, environnement et société (CNU 46)**

Spécialité : Pathologies et recherche clinique

Présentée et soutenue par :
Vanessa MARQUES DA SILVA

Le 18 novembre 2022

**REMODELAGE PULMONAIRE APRES EXPOSITION A DES
MICRO ET NANOPARTICULES DE SILICE CHEZ DES
TRAVAILLEURS DU BÂTIMENT ET DES TRAVAUX PUBLICS**

Sous la direction du :
Pr Pascal ANDUJAR

JURY :

Jean-Claude Pairon , <i>Professeur à l'Université Paris-Est Créteil</i>	Président
Armelle Baeza , <i>Professeure à l'Université Paris Cité</i>	Rapportrice
Carole Planes , <i>Professeure à l'Université Paris 13</i>	Rapportrice
Catherine Cavalin , <i>Chargée de recherche CNRS à l'IRISSO</i>	Examinatrice
Ghislaine Lacroix , <i>Ingénieure toxicologue à l'INERIS</i>	Examinatrice
Henri Bastos , <i>Directeur scientifique Santé Travail à l'ANSES</i>	Examineur

Résumé

Le secteur du Bâtiment et des Travaux Publics (BTP) emploie actuellement en France, environ 1 million d'ouvriers potentiellement exposés par inhalation à des aérosols contenant des particules de silice micrométrique et/ou nanométrique. Le dioxyde de silicium ou silice (SiO_2) de structure spatiale cristalline ou amorphe, est émis par exemple lors de l'emploi d'outils rotatifs à haute énergie à partir de nombreux matériaux de construction nanostructurés ou non contenant de la silice. Néanmoins, très peu de données métrologiques sont actuellement disponibles concernant la fraction nanoparticulaire des aérosols de silice générés dans le secteur du BTP. Par le passé, les études toxicologiques chez l'animal ont montré que la silice cristalline micrométrique induit des effets pulmonaires chroniques, mais en employant très souvent des doses uniques et très fortes. A l'inverse, la silice amorphe micrométrique était considérée par le passé comme très peu toxique. Récemment, des études toxicologiques ont également montré que des nanoparticules (NP) de silice amorphe pouvaient être l'origine également d'effets toxiques similaires à ceux rencontrés avec la silice cristalline micrométrique.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les effets pulmonaires en matière de remodelage tissulaire et d'inflammation pulmonaire de la silice cristalline ou amorphe de taille micro- ou nanométrique à des doses répétées et réalistes. Pour cela, la stratégie a consisté tout d'abord à caractériser des aérosols de silice cristalline micro- et nanométrique en milieu de travail. Ensuite, l'inflammation et le remodelage pulmonaire a été étudié dans des poumons de travailleurs du BTP exposés à la silice cristalline à partir d'une tissuthèque déjà constituée. Enfin, une étude expérimentale a permis d'étudier également l'inflammation et le remodelage pulmonaire chez la souris après des expositions répétées (jusqu'à 6 mois) à des doses réalistes de micro- et nanoparticules de silice cristalline/amorphe néosynthétisées.

Nos analyses métrologiques ont permis d'améliorer les connaissances sur le terrain en vue de répondre à l'action 1.12 du Plan Santé Travail 3 « Réaliser une campagne de mesurage sur les nanomatériaux en vue d'identifier les filières les plus exposées, comportant un ciblage spécifique dans le secteur du BTP ». Les métrologies réalisées sur différentes tâches pré-repérées ont montré l'existence d'authentiques NP de silice cristalline produites de façon non

Résumé

intentionnelle après usage d'outils rotatifs à haute énergie sur des matériaux non-nanostructurés comportant de la silice cristalline. Chez l'Homme, les résultats mettent en évidence une fibrose péribronchiolaire retrouvée aussi bien chez les patients exposés à la silice que chez les sujets non exposés, mais avec une sévérité plus importante chez les sujets exposés à la silice par rapport aux sujets témoins. Par ailleurs, l'élément Silicium est retrouvé de façon ubiquitaire dans les zones de fibrose chez les sujets exposés à la silice cristalline et chez les sujets témoins dans le poumon. Par ailleurs, une inflammation neutrophilique et macrophagique pulmonaire et un processus biologique pro-fibrosant, mais sans lésion histologique, ont été retrouvés chez des souris exposées aux micro- ou nanoparticules de silice cristalline à la dose hebdomadaire de 50 µg après 3 et 6 mois d'exposition. L'étude approfondie des silanols à la surface des silices néosynthétisées devrait permettre de mieux comprendre la toxicité de la silice dans nos résultats.

Le programme PURESNOW a été financé par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES - APR EST 2018/1/094). V Marques Da Silva a obtenu une bourse doctorale du Parcours National Doctoral en Santé au Travail de l'École des Hautes Études en Santé Publique (Paris, France).

Mots-clés : remodelage pulmonaire – inflammation - nanoparticules – silice – valeurs limites d'exposition professionnelle – bâtiment et travaux publics

Abstract

Nowadays, in France, building construction and public works sectors employ about 1 million workers potentially exposed by inhalation to aerosols containing micrometric and/or nanometric silica particles. Silicon dioxide or silica (SiO_2) exists in crystalline or amorphous spatial structures, and is emitted during the use of high energy rotary tools on many nanostructures nanostructured or non-nanostructured building materials containing silica. Nevertheless, very few metrological data are currently available concerning the nanometric fraction of generated silica aerosols. Previously, *in vivo* experimental studies have shown that micrometric crystalline silica induces pulmonary effects, but these studies often used single and very high doses of silica. In contrast, micrometric amorphous silica was considered to have very low toxicity. Recently, toxicological studies have also shown that amorphous silica nanoparticles (NP) could also induce similar lung toxic effects to those observed with crystalline silica at micrometric scale.

My PhD thesis objective was to study pulmonary remodeling and inflammation of crystalline or amorphous silica at micro- or nanometric scale after exposure to repeated and realistic doses. For this, the strategy consisted first of characterizing micro- and nanometric crystalline silica aerosols in the workplace. Then, inflammation and pulmonary remodeling were studied in the lungs of construction workers exposed to crystalline silica, using a tissue library that had already been established. Finally, an experimental study also investigated inflammation and pulmonary remodeling in mice after repeated exposure (up to 6 months) to realistic doses of neosynthesized crystalline/amorphous silica micro- and nanoparticles.

Our metrological analysis allowed us to improve the knowledge in real-life as requested by the 1.12 Action of the French Plan Santé Travail 3 "Carry out a measurement campaign on nanomaterials in order to identify the most exposed sectors, with specific targeting in the construction sector". Metrological analyses carried out on different pre-recognized tasks showed the existence of genuine crystalline silica nanoparticles produced unintentionally after using high-energy rotary tools on non-nanostructured materials containing crystalline silica. In humans, peribronchiolar fibrosis was found in silica-exposed and unexposed patients, but peribronchiolar fibrosis severity was significantly higher in silica-exposed patients

Abstract

compared to unexposed patients. Furthermore, Silicium was ubiquitously found in fibrosis areas in human lungs, as well as among crystalline silica-exposed patients as among unexposed patients. Neutrophilic and macrophagic lung inflammation and biological pro-fibrotic process, but without histological lesion, have been found in mice weekly exposed to 50 µg micro- or nanoparticles of crystalline silica during 3 and 6 months. The study of silanols on the surface of neosynthetic silica should lead to a better understanding of silica toxicity in our results.

PURESNOW program (PULmonary REmodeling after exposure to Silica Nanoparticles in cONstruction Workers) was founded by the French Agency for food environmental and occupational health & safety (ANSES - APR EST 2018/1/094). V Marques Da Silva was a fellow of the French occupational health PhD course of École des Hautes Etudes en Santé Publique (Paris, France).

Keywords: pulmonary remodeling – inflammation – nanoparticles – silica – occupational exposure limit – building construction

***" Ce qui compte c'est pas
l'arrivée c'est la quête "***

Orelsan

Remerciements

Aux membres du jury et de mon comité de suivi de thèse

A tous les membres du jury : **Pr Armelle Baeza**, **Pr Carole Planes**, **Pr Jean-Claude Pairon**, **Dr Catherine Cavalin**, **Dr Ghislaine Lacroix** et **Dr Henri Bastos** je vous exprime ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et je vous remercie pour l'intérêt porté à ce travail.

Je remercie spécialement les **Pr Armelle Baeza** et **Pr Carole Planes** pour le temps passé à évaluer ce travail en tant que rapportrices.

Je remercie également le **Pr Jean-Claude Pairon** d'avoir accepté d'être Président du jury et pour ses conseils tout au long de mes stages de M1/M2 puis de ma thèse.

Je remercie par la même occasion pour leur implication, leur oreille bienveillante et leurs conseils avisés les membres de mon comité de suivi de thèse: le **Dr Ghislaine Lacroix**, le **Pr Gérard Lasfargues** et le **Pr Xavier Coumoul**.

Enfin, je remercie évidemment le **Pr Pascal Andujar** de m'avoir confié les projets réalisés au cours de mes stages de M1/M2 puis de m'avoir renouvelé sa confiance pour ce projet de thèse. Merci pour votre patience et la rigueur transmise durant ces 5 années mais surtout pour le temps investi dans la correction de ce manuscrit.

Aux membres de l'équipe GEIC2O et de l'IMRB

Je remercie le **Dr Sophie Lanone** de m'avoir accueillie au sein de l'équipe GEIC₂O (équipe 4 à l'origine). Merci également pour toute l'implication sur l'avancée de ma thèse lors du premier confinement.

Je remercie par la même occasion le **Pr Jorge Boczkowski** de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 4 au tout départ et de l'IMRB.

Remerciements

Je remercie sincèrement le **Pr Pascale Fanen** pour sa bienveillance et son implication dans le bien-être et le futur professionnel des doctorants de l'ED SVS.

Merci au **Dr Jeanne Tran Van Nhieu** pour sa patience et persévérance lors des nombreuses heures passées au microscope à lire les lames de patients. Merci aussi pour sa disponibilité à la moindre question et d'avoir trouvé une solution de secours pour nos prélèvements lors de la fermeture estivale de la plateforme d'histologie.

Merci à **Julia Di Donato** dont le bonjour quotidien était accueilli comme un vrai rayon de soleil dans nos bureaux. Merci pour ta bienveillance et ton efficacité à la moindre demande, ce fut un plaisir de t'avoir comme collègue !

Aux « anciens » du labo qui ont su me transmettre leur intérêt pour la recherche, les manip (et les gâteaux) : **Marie-Laure Franco-Montoya, Audrey Ridoux, Benjamin Even, Minh Nguyen** et **Jonathan Bruniaux**. Merci aussi aux anciens ingénieurs partis pour de nouveaux horizons avec qui j'ai beaucoup apprécié le quotidien : **Clément Giffard, Cristina De Franceschi** et **Charlie London**.

Aux « nouvelles » du labo avec qui je n'ai pas forcément eu l'occasion de beaucoup échanger sur cette fin de thèse mais à qui je souhaite beaucoup d'épanouissement dans l'équipe : **Khadeeja Sy, Mélissa Bourenane** et **Céline-Hivda Yégen**.

Je n'oublie les chercheurs et ingénieurs statutaires de l'équipe, toujours de bonne humeur et disponibles pour aider les doctorants : **les Drs Agathe Tarze, Bruno Costes, Bénédicte Duriez, Maylis Dagouassat, Rachid Souktani, Stéphanie Simon, Valérie Urbach** et **Yuli Watanabe**.

Au **Dr Maeva Zysman** et **Dr Audrey Der Vartanian** qui ont été pour moi des mentors l'une au début et l'autre en fin de thèse. Je suis très fière d'avoir pu travailler aux côtés de personnes aussi brillantes que vous et je reste attentive à vos travaux pour la suite car je sais que vous réaliserez de grandes choses !

Remerciements

A **Pierrick** et **Alice**, sans qui je ne sais pas comment j'aurai pu venir à bout de toutes ces manip titanesques...

Pierrick, c'est grâce à toi que je garde de bons souvenirs de ces longs mois d'instillations. Vive les podcasts Affaires sensibles, Vulgaire ou encore les mardis de l'Assemblée qui ont su égayer notre quotidien à l'EP3 ! J'espère que tout se passe bien pour toi dans la ville rôtie.

Alice, merci pour ta bonne humeur permanente et d'avoir été aussi conciliante et autonome quand a sonné la fin de mon contrat. Merci aussi d'avoir presque fait disparaître mon vertige avec tes encouragements lors de mes premiers pas sur les voies d'escalade.

Je n'oublie pas **Anna Zerdoug** et **Justine Fredoc** qui ont été d'une aide précieuse pour ce projet sur leurs quelques mois de stage de M1 et avec qui j'ai beaucoup aimé échanger.

Aux brillantes doctorantes que sont **Marion** et **Maëlle**, bravo d'avoir fait le nécessaire pour pouvoir soutenir vos thèses en 3 ans et qu'à nous toutes on puisse réaliser un beau bouquet final de soutenances !

Une pensée pour **Benjamin**, bon courage à toi aussi pour la dernière ligne droite. Merci pour ton écoute et ta bienveillance.

A mes co-doctorantes devenues mes amies et piliers au labo : **Danushki** et **Zhuyi**, merci pour votre soutien quotidien, au labo ou à distance sur cette fin de Thèse. Vous êtes mes meilleurs souvenirs de ces années de thèse et c'est aussi avec une pointe de nostalgie que je repense à tous les moments partagés quotidiennement au labo. Nous prenons à présent chacune des directions différentes mais je ne doute pas de la solidité de notre amitié, je vous souhaite toute la réussite possible aussi bien professionnelle que personnelle.

Aux personnes que j'ai eu la chance de rencontrer grâce à cette thèse

Au **Pr Corinne Chanéac** sans qui la moitié du contenu de cette thèse n'aurait pu être réalisé et qui s'est toujours rendue disponible pour répondre à mes nombreuses questions.

Remerciements

A **Catherine Hédouin** et au **Dr Davy Rousset**, merci pour votre implication dans le volet métrologie et en particulier pour le temps passé à relire et corriger le volet métrologie de ce manuscrit.

J'en profite pour remercier **tous les autres partenaires du projet PURESNOW** avec qui j'ai beaucoup apprécié échanger pendant ces 4 années.

Aux membres du comité de suivi du Parcours Doctoral National en Santé Travail : **Pr Alain Garrigou, Pr Christophe Paris et Dr Véronique Daubas-Letourneux**, merci de m'avoir accordé cette bourse doctorale et merci pour votre suivi bienveillant tout au long de ma thèse.

Aux **Pr Nicolas Roche** et **Pr Gaëtan Deslée**, je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur "l'Optimisation des traitements médicamenteux de la BPCO" en m'intégrant en tant que pharmacienne au sein du GT BPCO de la SPLF. Ce fut une expérience très enrichissante tant du point de vue du travail d'équipe auprès de cliniciens que de toutes les connaissances que cela a pu m'apporter.

Au **Dr Alexandra d'Anglemont de Tassigny**, merci pour ta confiance. Ces 3 années d'enseignements à tes côtés ont été très enrichissantes. Merci aussi pour ta bienveillance et ton intérêt quant à mon futur professionnel.

A mes collègues de la pharmacie

Un grand merci à **Patricia** et **Béatrice** qui m'ont réservé un accueil chaleureux dès le premier échange, où je passais simplement déposer mon CV, à l'aube de ma rentrée 2013 en 2^{ème} année de Pharmacie.

A **Bao, Branca, Claire, Corinne, Christophe, Dorothée, Fanny, Florence, Isa et Isabelle, Carine et Karine, Laura, Lydie, Nada, Nadia, Nelly, Marie-Claude, Olivier, Rawya, Rose, Sandra, Tseten, Valérie et Virginie**. Bref, la liste est longue et j'espère n'oublier personne. Vous êtes des collègues en or !

Remerciements

Mention spéciale au **Dr Fabrice Le Pape** et au **Dr Anne Persey** qui m'ont formé avec beaucoup de patience tout au long de mes études de Pharmacie et qui restent encore aujourd'hui mes modèles d'humanité et de professionnalisme à l'officine.

Je remercie évidemment le **Dr Romain Socquet** pour toute la confiance témoignée.

A mes moniteurs et partenaires de Savate Boxe Française

Je remercie toutes les belles rencontres (moniteurs et partenaires) que j'ai pu faire dans les différents clubs de **Savate Boxe Française** (Bois d'Arcy, Vincennes puis Masseran) tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir fait décompresser de certaines journées difficiles, de m'avoir transmis l'énergie et de faire perdurer ma passion pour ce sport où le mental a autant d'importance que les techniques pieds-poings.

A mes amis

Merci aux membres de l'Association Junior Études, en particulier **Sébastien, Clément, Thomas & Willy** (mes frères !), [**Alexandra, Maurane, Olivia, Kyllian, Frédéric, Soon, Cyril** (la meilleure promo !)], **Laura** (toujours soudées et main dans la main !), **Armand & Raouf** (les têtes brûlées !), [**Sarah, Tsoliné, Wissam, Mostafa et Jérémy** (nos petits !)]. C'est à vous que je dois mes meilleurs rires, partage des galères du quotidien et des partiels qu'on a pu vivre pendant ces années à la fac !

Merci à mes amis du M2 THERV, **Jessica, Charlotte, Élise, Quentin, Nicolas, Tomasz** et **Ali**. Je n'aurais pu avoir de meilleure compagnie que la vôtre pour cette dernière année d'étude.

Je ne peux évoquer mes années à la fac sans parler des belles rencontres que j'y ai faites et des vraies amies que sont devenues depuis **Céline, Marion** et **Monica**, merci à elles pour tout ce qu'elles m'ont apporté.

Remerciements

A ma famille

A ma sœur, **Émilie**, de qui je suis très fière et à qui je souhaite de faire une belle thèse mais surtout une belle carrière en tant qu'épidémiologiste. Qui l'eut cru qu'avec 5 ans d'écart et des intérêts totalement différents on se retrouve en thèse en même temps sur des problématiques similaires ??

A **mes parents**, merci de toujours avoir cru en moi et m'avoir donné le soutien nécessaire pour aller au bout de mes projets. Je suis profondément convaincue que le dévouement et l'amour inconditionnel que vous nous avez porté sont la raison pour laquelle nous en sommes arrivées là aujourd'hui avec Émilie.

A celui qui de simple partenaire de boxe est devenu mon partenaire de vie. **Oscar**, merci pour tout le bonheur que tu m'apportes au quotidien depuis notre rencontre. Ton soutien infailible m'a aidé à ne pas baisser les bras et redoubler d'efforts pour que tu sois fier de moi (tant sur le ring que pour cette thèse). Merci d'avoir fait mille et une concessions sur nos vacances / sorties / dîners pour que je puisse prioriser mon travail. Tous ces sacrifices sont derrière nous désormais, laissons place maintenant au moment tant attendu de se dédier aux nombreux projets qu'on prévoit de réaliser ensemble.

Sommaire

Résumé	3
Abstract	5
Remerciements	9
Sommaire	15
Liste des annexes	20
Liste des abréviations	21
Liste des illustrations	25
Liste des tableaux	29
Avant-propos	30
I Introduction	33
I.1 Généralités sur les aérosols particuliers	33
I.1.1 Composition chimique	33
I.1.2 Profil granulométrique et degré d'agglomération/agrégation	33
I.1.3 Morphologie	37
I.1.4 Problématique de l'expression de la concentration particulaire d'un aérosol	37
I.2 Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition	39
I.2.1 Généralités	39
I.2.2 Silice cristalline	40
I.2.2.1 Caractéristiques physico-chimiques	40
I.2.2.2 Principales sources d'expositions à la silice cristalline	41
I.2.3 Silice amorphe	44
I.2.3.1 Caractéristiques physico-chimiques	44
I.2.3.2 Principales sources d'expositions	45
I.2.3.3 Origine anthropique	46
I.3 État des connaissances chez l'Homme	50
I.3.1 Pénétration et devenir des particules dans l'appareil respiratoire	50
I.3.1.1 Généralités	50
I.3.1.2 Pénétration des particules	54
I.3.1.3 Déposition	56

Sommaire

I.3.1.4	Clairance pulmonaire	57
I.3.1.5	Rétention pulmonaire et translocation	59
I.3.2	Données épidémiologiques des effets de la silice chez l'Homme	61
I.3.2.1	Pathologies non tumorales liées à la silice cristalline	61
I.3.2.2	Pathologies tumorales liées à la silice cristalline	65
I.3.2.3	Pathologies non tumorales liées à la silice amorphe	66
I.3.2.4	Pathologies tumorales liées à la silice amorphe	67
I.4	Toxicologie in vivo et in vitro de la silice en fonction de la structure et de la taille	68
I.4.1	Résumé de l'article	68
I.4.2	Extrait de «Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review»	73
I.5	Métrologie	104
I.5.1	Généralités.....	104
I.5.2	Dispositifs de caractérisation.....	106
I.5.2.1	Dispositifs de caractérisation en temps réel.....	106
I.5.2.2	Dispositifs d'échantillonnage pour une caractérisation en temps différé	107
I.5.3	Techniques d'analyse des aérosols.....	109
I.6	Réglementation	110
I.6.1	Généralités.....	110
I.6.1.1	Code du travail	110
I.6.1.2	Fixation et modification des VLEP	111
I.6.1.3	Mesures de protection.....	111
I.6.2	Cas des VLEP appliquées aux silices cristalline et amorphe	112
I.6.3	Limites.....	113
I.7	Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice	115
I.7.1	Généralités.....	115
I.7.2	Silice cristalline ou amorphe dans les matériaux de construction	116
I.7.2.1	Matériaux de construction non nanostructurés contenant de la silice	116
I.7.2.2	Matériaux de construction nanostructurés contenant de la silice	117
I.7.3	Situations à risque d'exposition.....	119
I.8	Synthèse de l'introduction.....	121
II	Hypothèse et objectifs	122
III	Volet PURESNOW-METRO	123
III.1	Matériel et méthodes.....	124

Sommaire

III.1.1	Pré-repérage « hors-site » des matériaux et tâches susceptibles d'être les plus émissives de particules de silice cristalline et amorphe	124
III.1.1.1	Approche par matériaux	124
III.1.1.2	Approche par tâche	124
III.1.2	Repérage « sur site » dans les Hauts-de-France	125
III.1.2.1	Méthodes de mesures en temps réel	125
III.1.2.2	Méthodes de mesures en temps différé	125
III.1.3	Campagnes de métrologie ciblées en Ile-de-France	127
III.1.3.1	Méthodes de mesures en temps réel	127
III.1.3.2	Méthodes de mesures en temps différé	128
III.2	Résultats	130
III.2.1	Pré-repérage « hors-site »	130
III.2.1.1	Approche par matériaux	130
III.2.1.2	Approche par tâche	132
III.2.1.3	Synthèse de l'étape de pré-repérage « hors-site »	133
III.2.2	Repérage « sur site » dans les Hauts-de-France	134
III.2.2.1	Synthèse des tâches analysées	134
III.2.2.2	Exemple de tâches analysées dans le secteur « structure et gros œuvre »	134
III.2.2.3	Exemple de tâche analysée dans les Travaux Publics : découpe de bordures en béton à l'humide	138
III.2.3	Campagnes métrologiques ciblées en Ile-de-France	140
III.2.3.1	Synthèse des tâches analysées	140
III.2.3.2	Exemple de tâches analysées dans le secteur structure et gros œuvre : percement de béton à sec	140
III.2.3.3	Exemple de tâches analysées dans le second œuvre : découpe de tuiles en terre cuite à sec	142
III.3	Synthèse des résultats du volet PURESNOW-METRO	144
IV	Volet PURESNOW-RETRO	145
IV.1	Matériel et méthodes	145
IV.1.1	Constitution des effectifs de l'étude cas-témoins	145
IV.1.2	Autorisations réglementaires	146
IV.1.3	Analyses histologiques	147
IV.1.3.1	Zones bronchiolaires	148
IV.1.3.2	Zones vasculaires	150
IV.1.3.3	Zones alvéolaires	151
IV.1.3.4	Autres zones d'intérêt	152
IV.1.4	Analyses élémentaires chimiques <i>in situ</i>	153

Sommaire

IV.1.5	Effectifs nécessaires et analyses statistiques	154
IV.2	Résultats.....	156
IV.2.1	Caractéristiques cliniques des populations incluses.....	156
IV.2.2	Analyses histologiques.....	156
IV.2.2.1	Zones bronchiolaires	158
IV.2.2.2	Zones vasculaires.....	158
IV.2.2.3	Zones alvéolaires	158
IV.2.2.4	Autres zones d'intérêt	159
IV.2.3	Cartographies élémentaires en μ XRF	160
IV.3	Synthèse des résultats du volet PURESNOW-RETRO	163
V	Volet PURESNOW-BIO.....	164
V.1	Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issus de matériaux de construction non-nanostructurés	165
V.1.1	Résumé de l'article « Exposure to building materials dust containing crystalline silica micro- and nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary inflammation and lung remodeling in mice »	165
V.1.2	Article original « Exposure to building materials dust containing crystalline silica micro- and nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary inflammation and lung remodeling in mice »	168
V.2	Étude expérimentale PURESNOW-BIO	196
V.2.1	Matériel et méthodes.....	196
V.2.1.1	Modèle animal	196
V.2.1.2	Autorisations réglementaires	196
V.2.1.3	Synthèse et caractérisation physico-chimiques des particules de silice.....	196
V.2.1.4	Design de l'étude	200
V.2.1.5	Sacrifice et recueil des échantillons biologiques et tissulaires	202
V.2.1.6	Analyse de l'inflammation pulmonaire.....	204
V.2.1.7	Quantification de la cytolyse dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire.....	207
V.2.1.8	Analyse du remodelage pulmonaire.....	207
V.2.1.9	Analyses statistiques.....	212
V.2.2	Résultats	213
V.2.2.1	Caractérisation physico-chimique des échantillons de particules de SiO ₂	213
V.2.2.2	Expérimentation chez l'animal : effectifs de souris	214
V.2.2.3	Analyse de l'inflammation pulmonaire.....	216
V.2.2.4	Analyse du remodelage pulmonaire	242
V.2.3	Synthèse des résultats du volet PURESNOW-BIO.....	245

Sommaire

VI	Discussion.....	246
VI.1	Discussion par volet	246
VI.1.1	Volet PURESNOW-METRO	246
VI.1.2	Volet PURESNOW-RETRO	249
VI.1.3	Volet PURESNOW-BIO	253
VI.2	Discussion générale.....	257
VI.2.1	Hypothèses à propos de la toxicité des 4 lots de particules de silice étudiées	257
VI.2.2	Comparaison des résultats chez l’Homme et chez la souris exposée à la silice	260
VI.2.3	Impacts potentiels des résultats de la thèse sur la réglementation.....	262
VII	Conclusion et perspectives	264
	Valorisations de la thèse	266
	Références bibliographiques	268
	Annexes	281

Liste des annexes

Annexe 1 : Formulaire de recueil de données élaboré pour étayer le contexte de chaque prélèvement métrologique réalisé sur le terrain

Annexe 2 : Lettre d'information destinée à l'employeur et les salariés de la visée des prélèvements effectués lors des campagnes de mesures dans les Hauts-de-France et en Ile-de-France

Liste des abréviations

+A

ANCA : anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

+B

BALT : tissu lymphoïde associé aux bronches (de l'acronyme anglais bronchus associated lymphoid tissue)

BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

BSA : Bovine Serum Albumin

BTP : Bâtiment et Travaux Publics

+C

CE : Commission Européenne

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives

COCT : Conseil d'Orientation sur les Conditions de Travail

COLCHIC : base de données d'exposition professionnelle aux agents chimiques et biologiques

ComEth : Comité d'Éthique

CRAMIF : Caisse Régionale d'Assurance Maladie

CSF : facteur stimulant des colonies (de l'acronyme anglais colony stimulating factor)

CVF : capacité vitale forcée

+D

DAB : diaminobenzidine

D_{ae} : diamètre aérodynamique

DEM : débit expiratoire maximal

DRX : analyse par diffraction des rayons X

+E

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

+F

FAN : fiche actualisée de nuisance

+G

∅

+H

H&E : coloration à l'hématoxyline et éosine

HES : coloration à l'hématoxyline-éosine-safran

Liste des abréviations

+I

ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (de l'acronyme anglaise Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

IL : interleukine

IFN- γ : interféron gamma

IMRB : Institut Mondor de Recherche Biomédicale

INRS : Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

IP-10 : protéine 10 induite par l'interféron (de l'acronyme anglais interferon inducible protein 10)

ISO : Organisation internationale de normalisation (de l'acronyme anglais International Organization for Standardization)

ITGA : Institut Technique Gaz et Air

+J

Ø

+K

KC : protéine chémoattractante des neutrophiles (de l'anglais keratinocyte chemoattractant)

keV : kilo électron Volt

+L

LAFP : Laboratoire Amiante, Fibres et Particules (de la Ville de Paris)

LALe : Limulus Amoebocyte Lysate

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LDH : lactate déshydrogénase

LDSA : surface spécifique des particules pouvant se déposer dans le poumon humain (de l'acronyme anglais Lung Deposited Surface Area)

LIF : facteur inhibiteur de leucémie (de l'acronyme anglais leukemia inhibitory factor)

LIX : chimiokine CXC induite par les lipopolysaccharides (de l'acronyme anglais Lipopolysaccharide-Induced CXC Chemokine)

LUCIA : Ligne Utilisée pour la Caractérisation par Imagerie et Absorption

+M

MAIS : maladie auto-immune systémique

MALT : tissu lymphoïde associé aux muqueuses (de l'acronyme anglais mucosa associated lymphoid tissue)

MCP-1 : protéine chémoattractante des monocytes 1 (de l'acronyme anglais monocyte chemoattractant protein 1)

MEC : matrice extracellulaire

MET : Microscope Electronique à Transmission

MGG : coloration de May-Grünwald Giemsa

MIP : protéine inflammatoire des macrophages (de l'acronyme anglais macrophage inflammatory protein)

MIG : monokine induite par l'interféron gamma (de l'acronyme anglais monokine induced gamma interferon)

MLI : intercept linéaire moyen (de l'acronyme anglais Mean Linear Intercept)

MO : microscope optique

MPS : Mini Particle Sampler

Liste des abréviations

+N

NaCl : chlorure de sodium

NFS : silanols « détachés » (de l'acronyme anglais nearly free silanols)

NPM : nanoparticules manufacturées

NP : nanoparticules

+O

∅

+P

PMR : particules minérales réfringentes

PSES : poussières dites sans effet spécifique

PST : Plan National de Santé au Travail

PUF : particules ultrafines

PURESNOW : remodelage pulmonaire après exposition à des micro et nanoparticules de silice chez des travailleurs du bâtiment et des travaux publics (de l'acronyme anglais PULmonary REmodeling after exposure to Silica Nanoparticles in cOnstruction Workers)

+Q

∅

+R

RANTES : (de l'acronyme anglais Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted)

REACH : règlement européen sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des produits chimiques (de l'acronyme anglais Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)

+S

SAS : silice amorphe synthétique

SCOLA : Système de COLlecte des informations des organismes Accrédités

SEM : Standard error of the mean (écart-type de la moyenne)

Si : silicium

SiNPs : nanoparticules de silice

SiO₂ : dioxyde de silicium

SOLEIL : Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du Laboratoire d'utilisation du rayonnement électromagnétique

SPSE-LAFP : laboratoire Amiante, Fibre et Particules du Service Parisien de Santé Environnement

SRM : Standard Reference Material

STEM-EDX : microscope électronique à transmission couplé à une analyse par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (scanning transmission electron microscope and energy dispersive X-ray spectroscopy)

STEM-EDS : microscope électronique à transmission couplé à une analyse par spectroscopie à dispersion d'énergie (scanning transmission electron microscope and energy dispersive spectroscopy)

SUMER : Surveillance Médicale des Expositions des salariés aux Risques professionnels

Liste des abréviations

+T

TNF : facteur de croissance tumorale (de l'acronyme anglais tumor necrosis factor)

+U

UE : Union Européenne

+V

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (de l'acronyme anglais vascular endothelial growth factor)

VEMS : volume expiratoire maximal en une seconde

VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle

+W

∅

+X

XANES : analyse spectroscopique par micro-absorption des rayons X (de l'acronyme anglais X-ray absorption near edge structure)

XRF : fluorescence X (de l'acronyme anglais X-ray fluorescence)

+Y

∅

+Z

∅

Liste des illustrations

Figure 1 : États des particules au sein d'un aérosol

Figure 2 : Classification des nanomatériaux

Figure 3 : Pourcentage de molécules en surface en fonction du diamètre d'une particule

Figure 4 : Structures spatiales de silice (cristalline et amorphe)

Figure 5 : Représentation des compartiments de l'appareil respiratoire

Figure 6 : Populations cellulaires présentes dans les régions trachéo-bronchique et alvéolaire

Figure 7 : Principaux mécanismes de dépôt des particules au sein de l'appareil respiratoire

Figure 8 : Principaux mécanismes de clairance et de translocation des nanoparticules dans la région alvéolaire

Figure 9 : Coupes histologiques de poumons contenant des lésions silicotiques

Figure 10 : Synthèse des effets biologiques retrouvés *in vivo* pour chaque structure et taille de silice

Figure 11 : Synthèse des effets biologiques retrouvés *in vitro* sur 3 populations cellulaires pulmonaires (cellules épithéliales, macrophages et fibroblastes) pour chaque structure et taille de silice

Figure 12 : Représentation des fractions conventionnelles utilisées en hygiène du travail

Figure 13 : Prédiction de la déposition totale et régionale des particules dans les différentes régions de l'appareil respiratoire chez l'Homme

Figure 14 : Représentation des VLEP journalières pour la silice cristalline et les poussières dites sans effet spécifiques en comparaison avec les VLEP françaises

Figure 15 : Évolution temporelle (en secondes) de la surface spécifique des particules susceptibles de se déposer dans la région alvéolaire chez l'Homme lors d'une pulvérisation de mortier projeté à l'humide

Figure 16 : Particules représentatives présentes dans la fraction alvéolaire provenant d'un aérosol particulaire émis lors d'une pulvérisation de mortier projeté à l'humide en microscopie électronique à balayage (MEB)

Figure 17 : Évolution temporelle (en secondes) de la surface spécifique des particules susceptibles de se déposer dans la région alvéolaire chez l'Homme lors d'un ponçage de murs en béton à sec à l'aide d'une ponceuse électrique

Liste des illustrations

Figure 18 : Particules représentatives présentes dans la fraction alvéolaire provenant d'un aérosol particulaire émis lors d'un ponçage de murs en béton à sec en microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (ET)

Figure 19 : Particules représentatives présentes dans la fraction alvéolaire provenant d'un aérosol particulaire émis lors d'une découpe de bordures en béton à l'humide en microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (ET)

Figure 20 : Profil granulométrique d'un aérosol particulaire émis lors d'un percement de pilier en béton à sec prélevé au niveau des voies respiratoires d'un salarié et en champ proche (2 mètres de la source d'émission)

Figure 21 : Profil granulométrique d'un aérosol particulaire émis lors découpe à sec de tuiles en terre cuite prélevé au niveau des voies respiratoires d'un salarié et en champ proche (1,5 mètre de la source d'émission)

Figure 22 : Présence de dépôts anthracosiques d'intensité variée centrée sur des axes broncho-vasculaires sur des coupes histologiques de poumon colorées par l'hématoxyline-éosine-safran (HES)

Figure 23 : Présence de particules minérales réfringentes (PMR) au sein de dépôts anthracosiques péribronchiolaires sur une coupe histologique de poumon colorée par l'hématoxyline-éosine-safran (HES)

Figure 24 : Présence de particules minérales réfringentes (PMR) évocatrices de particules de silice cristalline dans le cytoplasme de macrophages alvéolaires pigmentés, empoussiérés sur une coupe histologique de poumon colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES)

Figure 25 : Semi-quantification de la fibrose bronchiolaire, périvasculaire et alvéolaire et des macrophages empoussiérés ou comportant des particules minérales réfringentes sur les coupes de parenchyme pulmonaire de sujets exposés à la silice (groupe Silice) et de sujets témoins non exposés (groupe Contrôle).

Figure 26 : Fibrose périvasculaire et péribronchiolaire sur une coupe histologique de parenchyme pulmonaire colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) obtenue chez un sujet exposé à la silice cristalline et cartographie globale (2000 µm X 2000 µm) correspondante acquise par microfluorescence X

Figure 27 : Fibrose interalvéolaire sur une coupe histologique de parenchyme pulmonaire colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) obtenue chez un sujet exposé professionnellement à la silice cristalline et cartographie d'une zone comportant un signal plus important en Si (500 µm X 500 µm) correspondante acquise par microfluorescence X

Figure 28 : Semi-quantification des cartographies globales en microfluorescence X chez les sujets exposés à la silice (groupe Silice) et les sujets témoins non exposés (groupe contrôle).

Figure 29 : Chronogramme du plan expérimental de l'étude PURESNOW-BIO

Liste des illustrations

Figure 30 : Nouvelle technique mise au point pour prélever les lobes pulmonaires chez la souris

Figure 31 : Méthode de quantification du remodelage alvéolaire par la méthode d'évaluation de l'intercept linéaire moyen « Mean Linear Intercept » (MLI)

Figure 32 : Méthode d'évaluation de l'épaisseur de la paroi d'une bronchiole

Figure 33 : Caractérisation physico-chimique des microparticules et nanoparticules de SiO₂ cristalline et amorphe vieilles (6 mois après leur synthèse) et conservées dans les solutions mères en microscopie électronique à transmission (MET) couplée à la diffraction des rayons X (DRX)

Figure 34 : Quantification de la cellularité totale dans le liquide lavage broncho-alvéolaire (LLBA) (en nombre de cellules vivantes par μ L de LLBA)

Figure 35 : Quantification de la cellularité différentielle (en pourcentage) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA), 24h après une exposition unique (J1)

Figure 36 : Quantification de la cellularité différentielle (en pourcentage) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA), à l'issue des temps d'exposition de 3 et 6 mois (M3 et M6)

Figure 37 : Quantification des protéines totales (en μ g/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA)

Figure 38 : Quantification des facteurs de croissance hématopoïétiques G-CSF, GM-CSF et de l'endothélium vasculaire VEGF (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex®

Figure 39 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation macrophagique TNF- α , MCP-1 et MIP-1 α (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex®

Figure 40 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation neutrophilique KC et LIX (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex®

Figure 41 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ , MIG, IP-10 et IL-10 (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex®

Figure 42 : Quantification de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 α (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex®

Figure 43 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-2 et IL-9 (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex®

Liste des illustrations

Figure 44 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et LIF (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex[®]

Figure 45 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires éotaxine, RANTES et IL-17 (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex[®]

Figure 46 : Quantification des macrophages alvéolaires marqués par la protéine MAC-3 en immunohistochimie

Figure 47 : Cytolyse évaluée par l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) (en $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ de protéines totales) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA)

Figure 48 : Quantifications de la cytokine TGF- β 1, marqueur précoce de fibrose pulmonaire, dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) (en pg/mL) par ELISA et du collagène soluble pulmonaire par la technique de dosage de Sircol dans le broyat du lobe caudal du poumon droit

Figure 49 : Analyses histologiques morphométriques du parenchyme pulmonaire

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux secteurs industriels employant ou appliquant des produits à base de silice cristalline

Tableau 2 : Principaux secteurs industriels employant ou appliquant des produits à base de silice amorphe

Tableau 3 : Principales applications et matériaux contenant de la silice cristalline ou amorphe dans le secteur de la construction

Tableau 4 : Tableau résumé de la composition du ciment à travers la nomenclature utilisée dans la norme NF EN 197-1

Tableau 5 : Tableau résumé de la fiche actualisée de nuisance (FAN) sur la silice selon les tâches et les métiers concernés dans le secteur du bâtiment et des travaux publics

Tableau 6 : Synthèse du nombre de prélèvements métrologiques par tâche et de leur condition de réalisation lors de l'étape 2 « screening » dans les Hauts-de-France (n=21)

Tableau 7 : Synthèse du nombre de prélèvements métrologiques par tâche et de leur condition de réalisation lors de l'étape 3 « campagnes métrologiques ciblées » en Ile-de-France (n=12)

Tableau 8 : Caractéristiques des populations de sujets témoins non exposés et exposés à la silice

Tableau 9 : Résultats des analyses histologiques semi-quantitatives du parenchyme pulmonaire chez les sujets témoins non exposés et les sujets exposés à la silice.

Tableau 10 : Effectifs initiaux et finaux de souris dans les neuf groupes d'exposition à des particules de silice (SiO₂) cristalline ou amorphe à l'issue de chaque temps d'exposition

Tableau 11 : Synthèse de la quantification des médiateurs pro-inflammatoires dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex®, 24h après une exposition unique (J1)

Tableau 12 : Synthèse de la quantification des médiateurs pro-inflammatoires dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex®, à l'issue des temps d'exposition de 3 et 6 mois (M3 et M6)

Avant-propos

La silice, ou plus exactement le dioxyde de silicium (SiO_2), est une substance minérale ubiquitaire d'origine naturelle, retrouvée à plus de 60% au sein de la croûte terrestre, pouvant être sous forme libre ou sous forme de silicates, mais aussi d'origine synthétique désormais. La silice sous forme libre peut exister à une taille micrométrique ou nanométrique, mais aussi sous forme de deux structures spatiales : cristalline ou amorphe.

Encore de nos jours, des travailleurs sont exposés à des aérosols particuliers de silice cristalline ou amorphe dans de très nombreux secteurs professionnels. Parmi eux, le secteur du bâtiment et des travaux publics (BTP) est le secteur employant le plus de travailleurs potentiellement exposés à des aérosols particuliers contenant de silice, avec environ 1 million de travailleurs en France. Dans ce secteur d'activité, les silices cristallines ou amorphes sont omniprésentes dans des aérosols générés, soit lors de la fabrication ou de l'emploi de certains matériaux pulvérulents nanostructurés ou non (ciment, béton, sable...), soit lors de l'emploi d'outils rotatifs à haute énergie ou lors d'opérations de démolition.

L'appareil respiratoire représente la voie d'exposition majoritaire des aérosols particuliers. Chez l'Homme, l'impact respiratoire des expositions aux aérosols contenant de la silice cristalline est documenté depuis presque un siècle mais reste tout de même d'actualité avec, d'une part, l'émergence de silicoses aiguës liées à la mise en œuvre de pierre reconstituées, et d'autre part, la potentielle toxicité respiratoire liée à l'avènement de nombreux nanomatériaux contenant de la silice amorphe. Jusqu'à récemment, l'organisation structurale spatiale de la silice était considérée comme l'élément déterminant de la toxicité de la silice en faveur d'après la littérature d'une plus grande toxicité de la silice cristalline allant jusqu'à conférer à la silice amorphe une quasi-absence d'effet toxique. Dans une perspective de mieux comprendre les effets *in vivo* et *in vitro* de la silice en fonction de sa structure spatiale (cristalline *versus* amorphe) et/ou de sa taille (micrométrique *versus* nanométrique), une revue de la littérature originale intitulée « Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review » a été publiée dans *Nanomaterials* en juillet 2022 dans le cadre cette thèse. Cette revue de la littérature est la première sur le sujet et montre de manière générale que de très nombreuses études

Avant-propos

toxicologiques expérimentales ont montré qu'il existait une toxicité pulmonaire communes (notamment une inflammation et un remodelage pulmonaire) quelle que soit la taille de silice cristalline ou amorphe. Il est tout de même à noter que ces études ont employé le plus souvent des doses de silice particulièrement élevées voire irréalistes, rendant complexe l'extrapolation à l'Homme compte tenu des niveaux d'exposition en vie réelle.

Ces différents constats soulignent donc l'importance de mieux comprendre l'implication des micro- et nanoparticules de silice cristalline ou amorphe dans l'inflammation et le remodelage pulmonaires lors d'expositions répétées à des doses réalistes de silice, représentatives des aérosols particuliers présents dans le secteur du BTP.

Ainsi, l'hypothèse de cette thèse est que les particules de silice cristalline ou amorphe présentes dans des aérosols représentatifs du BTP pourraient être impliquées dans le remodelage et l'inflammation pulmonaires après des expositions pulmonaires répétées à des doses réalistes tenant compte des niveaux d'exposition réels observés chez l'Homme en milieu professionnel.

Mon travail de thèse a été réalisé dans le cadre du programme de recherche PURESNOW « PULmonary REmodeling after exposure to Silica Nanoparticles in cONstruction Workers », financé par l'ANSES (APR EST 2018/1/094) qui vise à répondre à trois objectifs principaux définis en trois volets distincts :

- 1) **Volet PURESNOW-METRO**, visant à améliorer les connaissances portant sur la métrologie des nanomatériaux à base de silice dans le secteur du BTP, en réalisant des mesures et analyses en temps réel sur le terrain en vie réelle, et en temps différé après collecte d'échantillons pour avoir une meilleure caractérisation physico-chimique des aérosols contenant de la silice, notamment sur la fraction nanométrique ;
- 2) **Volet PURESNOW-RETRO**, permettant d'étudier de façon rétrospective le remodelage et l'inflammation pulmonaire après une exposition chronique à la silice cristalline chez des travailleurs du BTP comparés à des sujets témoins non exposés appariés à partir d'une tissuthèque constituée antérieurement, et

Avant-propos

d'explorer une éventuelle co-localisation des éléments Silicium et des lésions pulmonaires ;

- 3) **Volet PURESNOW-BIO**, visant à étudier le remodelage et l'inflammation pulmonaire chez des souris exposées à des micro- ou nanoparticules de silice (cristalline ou amorphe) à des doses répétées et réalistes.

Cette thèse devrait permettre de répondre à l'action 1.12 du Plan Santé Travail 3 « *Réaliser une campagne de mesurage sur les nanomatériaux en vue d'identifier les filières les plus exposées, comportant un ciblage spécifique dans le secteur du BTP* » et de mieux comprendre les effets pulmonaires de la silice cristalline et amorphe à des doses réalistes et répétées. Ainsi, ce manuscrit comporte successivement les chapitres suivants :

- **chapitre I** : Introduction avec l'état de l'art. Dans cette partie est incorporée la revue de la littérature publiée. Marques Da Silva V, Benjdir M, Montagne P, Pairon JC, Lanone S, **Andujar P**. Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review. *Nanomaterials* **2022**:12(14), 2392.
- **chapitre II** : Hypothèse et objectifs
- **chapitres III à V** : Matériel et Méthodes, suivi des résultats pour chaque volet de façon successive : PURESNOW-METRO, PURESNOW-RETRO et PURESNOW-BIO, incorporant pour ce dernier volet, un article en voie de soumission portant sur l'étude préliminaire qui a permis de définir le design de l'étude expérimentale finale du volet PURESNOW-BIO en termes notamment de durée d'exposition, de dose à employer)
- **chapitre VI** : Discussion
- **chapitre VII** : Conclusion générale et perspectives de cette thèse

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Professeur Pascal Andujar à Créteil dans l'unité INSERM U955 à l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), en particulier dans l'équipe GEIC₂O « Interactions génétique-environnement dans la BPCO, la mucoviscidose et autres (rares) pathologies respiratoires » dirigée par le Docteur Sophie Lanone. Cette thèse a été réalisée à l'École Doctorale Science de la Vie et de la Santé (ED SVS) à l'Université Paris-Est Créteil (UPEC). Ma bourse doctorale a été financée par le Parcours Doctoral National en Santé Travail de l'École des Hautes Études en Santé Publique (EHESP) pour 3 ans avec 6 mois complémentaires de financement du fait de la pandémie Covid-19.

I Introduction

I.1 Généralités sur les aérosols particuliers

Un aérosol correspond à une suspension dans un milieu gazeux de particules solides ou liquides de taille inférieure à 100 μm , assurant une vitesse de chute très faible voire négligeable. Les aérosols générés peuvent provenir de sources naturelles ou anthropiques, c'est-à-dire suite à l'intervention de l'Homme. Les particules qu'il contient peuvent être caractérisées selon plusieurs critères physico-chimiques, notamment leur composition chimique, leur taille ou le profil granulométrique à l'échelle de l'aérosol, leur degré d'agglomération/agrégation, leur morphologie, ou encore selon leur concentration particulaire (en masse, nombre ou surface spécifique).

I.1.1 Composition chimique

La composition chimique d'un aérosol particulaire est directement liée à sa source d'émission (aérosol primaire) mais aussi aux réactions physico-chimiques qui rentrent en jeu suite à son émission (aérosol secondaire). Sa composition peut être qualifiée de mélange pur ou complexe. Dans le cas d'un mélange complexe, les éléments constitutifs de l'aérosol peuvent être classés selon trois catégories : éléments majeurs, mineurs ou à l'état de trace.

Les éléments majeurs d'un aérosol sont des éléments atomiques qui représentent un à un au moins 5% de la masse totale d'une particule. Quant aux éléments mineurs, ce sont ceux qui représentent moins de 5% de la masse totale des particules. Enfin, les éléments à l'état de trace sont retrouvés à de très faibles concentrations.

I.1.2 Profil granulométrique et degré d'agglomération/agrégation

La granulométrie correspond à l'étude de la distribution des tailles des particules. Au sein d'un aérosol, c'est le diamètre aérodynamique (D_{ae}) qui est utilisé pour caractériser une particule. Il s'agit d'un diamètre théorique qui correspond au diamètre d'une sphère de masse volumique égale à 1 g/cm^3 et ayant la même vitesse limite de chute dans l'air que la particule en question. Les particules sont classées selon trois types de distribution granulométriques : grossières, fines et ultrafines.

Introduction

Généralités sur les aérosols particuliers

Les particules grossières et les particules fines sont définies comme ayant un D_{ae} moyen compris respectivement entre 2,5 à 10 μm et entre 0,1 à 2,5 μm . Plus communément, les particules grossières et fines sont dénommées respectivement PM10 et PM2,5, PM signifiant en anglais « Particule Matter ».

Quant aux particules ultrafines (PUF, également appelées PM0,1), celles-ci sont définies comme ayant un D_{ae} moyen inférieur à 100 nanomètres (nm) dans au moins une de ses trois dimensions. Les nanoparticules (NP) manufacturées (NPM) se distinguent des PUF par une production anthropique volontaire. Les NPM résultent d'une fabrication intentionnelle à l'inverse des PUF qui sont émises de manière non intentionnelle par l'Homme ou de façon naturelle.

Les nanotechnologies regroupent l'ensemble des techniques aboutissant à des éléments, notamment des matériaux, à l'échelle nanométrique soit entre 1 et 100 nm. Plusieurs propositions ont été faites pour définir un nanomatériau. Par exemple, en 2010 (puis réactualisée en 2015), l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) propose de définir un nanomatériau comme « *un matériau ayant au moins une dimension externe à l'échelle nanométrique ou ayant une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique* » (1). En 2011 (puis réactualisée en 2022), la Commission Européenne (CE) propose quant à elle de définir un nanomatériau comme « *un matériau naturel, formé accidentellement, ou manufacturé, constitué de particules solides qui sont présentes soit individuellement soit en tant que particules constitutives identifiables dans des agrégats ou des agglomérats, ayant une surface spécifique en volume supérieure à 60 m^2/cm^3 , 50 % au moins de ces particules, dans la répartition numérique par taille, répondant au moins à l'une des conditions suivantes* » :

- *une ou plusieurs dimensions externes de la particule se situent dans la fourchette de 1 à 100 nm*
- *la particule présente une forme allongée, telle que celle d'un bâtonnet, d'une fibre ou d'un tube, deux dimensions externes étant inférieures à 100 nm, et l'autre dimension supérieure à 100 nm (longueur)*
- *la particule présente une forme de feuillet, une dimension externe étant inférieure à 100 nm (épaisseur) et les deux autres dimensions supérieures à 100 nm.» (2)*

Introduction

Généralités sur les aérosols particulaires

Cette dernière définition introduit ici deux notions supplémentaires. La première notion est relative à la source du nanomatériau, qui peut être produit de manière intentionnelle (manufacturé) ou non (générée de façon non intentionnelle). La seconde notion concerne les agrégats et agglomérats.

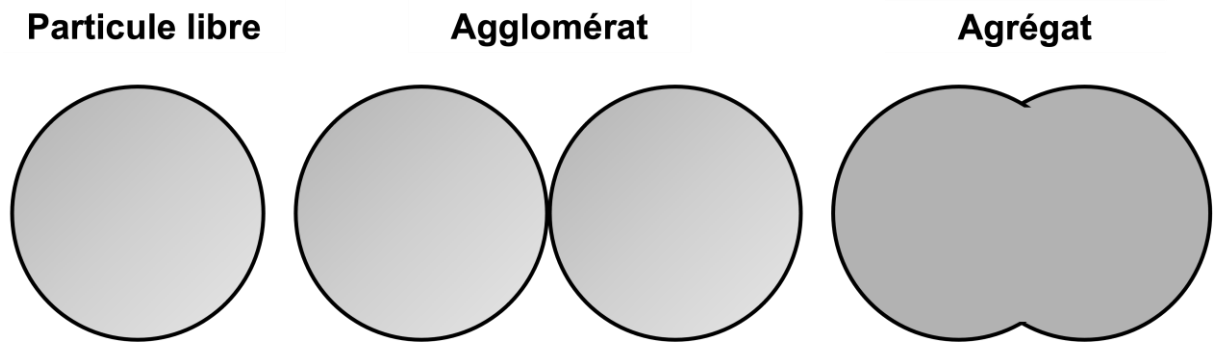


Figure 1 : États des particules au sein d'un aérosol.

Au sein d'un aérosol, les particules peuvent effectivement exister sous trois états : libres, sous forme d'agglomérats ou d'agrégats (**Figure 1**). Les particules isolées sont composées de molécules individuelles avec des contours physiques bien définis à l'inverse des agglomérats et des agrégats. L'unité de mesure pour caractériser ces derniers ne sera alors plus le D_{ae} mais la dimension fractale (grandeur géométrique définissant comment un objet remplit l'espace).

Les agglomérats et agrégats correspondent à des amas de particules liées entre elles de manière plus ou moins importante. Dans le cas des agglomérats, ces amas résultant de liaisons faibles de Van der Waals et électrostatiques sont friables contrairement aux agrégats où les particules sont soudées voire fusionnées entre elles, avec, par conséquent, l'incapacité à être redissocié (2). Il est à noter que la taille d'un agglomérat ou d'un agrégat peut aller au-delà de 100 nm et donc atteindre l'échelle micrométrique. Différents facteurs peuvent influencer la formation de ces agglomérats, notamment le taux d'humidité. En effet, dans une atmosphère avec un taux d'humidité dans l'air important, la formation d'amas sera facilitée. Dans sa définition, la CE indique ainsi que lorsque ces agglomérats/agrégats contiennent en nombre plus de 50% de particules à l'échelle nanométrique, alors ils peuvent être considérés eux-mêmes comme des nanomatériaux.

Introduction

Généralités sur les aérosols particulaires

Bien qu'il n'existe pas encore de consensus international concernant la définition d'un nanomatériau, il est possible de les classer en nano-objets et/ou en matériaux nanostructurés (Figure 2).

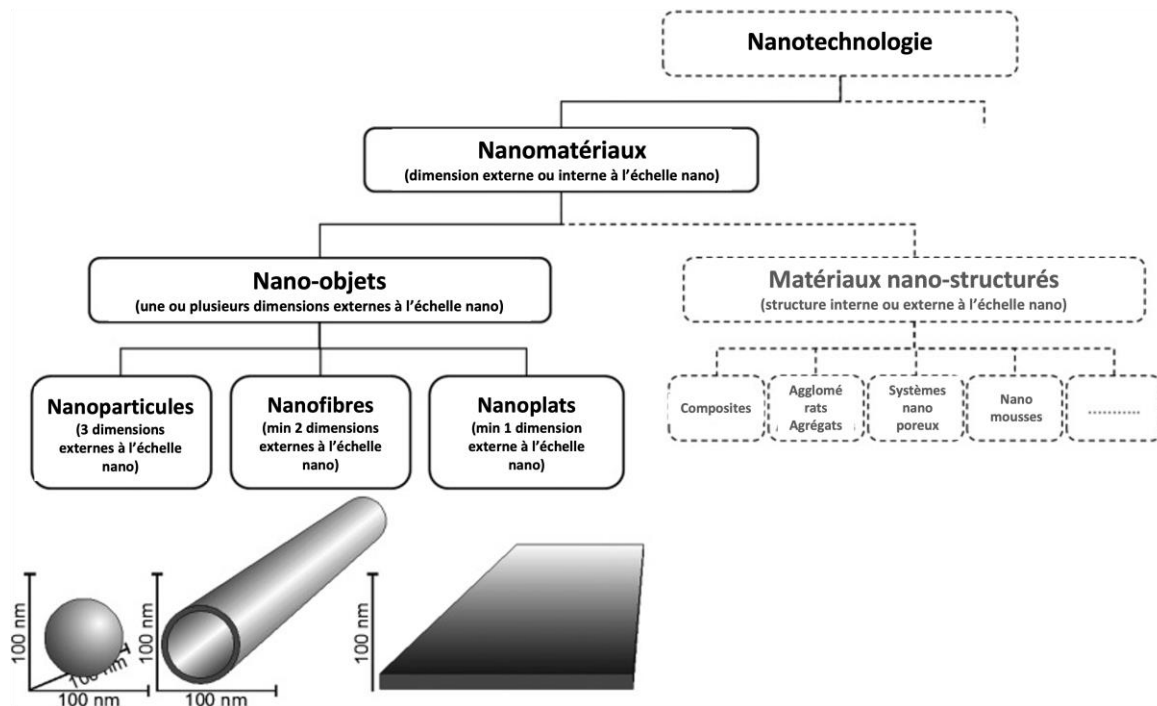


Figure 2 : Classification des nanomatériaux par (3).

Les types de nano-objets peuvent être distingués en trois catégories en fonction du nombre de dimensions externes à l'échelle nanométrique. Ainsi, les NP correspondent à des nano-objets ayant les trois dimensions externes à l'échelle du nm. Les nanofibres, nanotubes, nanofilaments, nanotiges ou encore nanobâtonnets se réfèrent quant à eux des nano-objets dont deux des dimensions externes sont à l'échelle du nm, la troisième dimension étant supérieure à cette taille. Enfin, les nanofeuillets, nanoplats et nanoplaquettes définissent des nano-objets dont seulement une des dimensions externes est à l'échelle du nm (3,4).

Les matériaux nanostructurés, ou nanomatériaux, sont quant à eux des matériaux dont une partie de la structure interne ou de surface est à l'échelle nanométrique. Parmi les matériaux nanostructurés, figurent les agglomérats/ agrégats de nano-objets. Les matériaux nanostructurés regroupent également les nanocomposites, composés de nano-objets soit intégralement dans leur matrice soit à leur surface, et les matériaux nanoporeux, dont les pores sont de taille nanométrique (3,4).

Introduction

Généralités sur les aérosols particuliers

I.1.3 Morphologie

La morphologie d'un aérosol varie en fonction de la forme des particules qu'il contient. En effet, les particules peuvent présenter des formes variées qui sont classées comme régulières telles que des cristaux ou des sphères ou comme irrégulières, majoritairement retrouvées dans le cas des agglomérats/ agrégats.

I.1.4 Problématique de l'expression de la concentration particulaire d'un aérosol

Il existe différentes métriques pour exprimer la concentration particulaire d'un aérosol : celle-ci peut s'exprimer en masse, nombre de particules ou en surface.

La masse d'un aérosol correspond à la masse totale des particules qu'il contient par unité de volume d'air. Celle-ci est le plus souvent exprimée en mg/m^3 .

Le nombre de particules présentes au sein d'un aérosol correspond au nombre total de particules qu'il contient par unité de volume d'air. Celui-ci est le plus souvent exprimé en nombre de particules (#) par mètre cube d'air soit $\#/\text{m}^3$. Il est à noter que bien qu'il représente un ensemble de particules liées de manière plus ou moins importante, un agglomérat ou agrégat est comptabilisé comme une seule particule au même titre qu'une particule isolée.

La surface des particules présentes au sein d'un aérosol correspond à la surface totale des particules par unité de volume d'air. Celle-ci est le plus souvent exprimée en m^2 de surface particulaire par m^3 , soit en m^2/m^3 .

Introduction

Généralités sur les aérosols particuliers

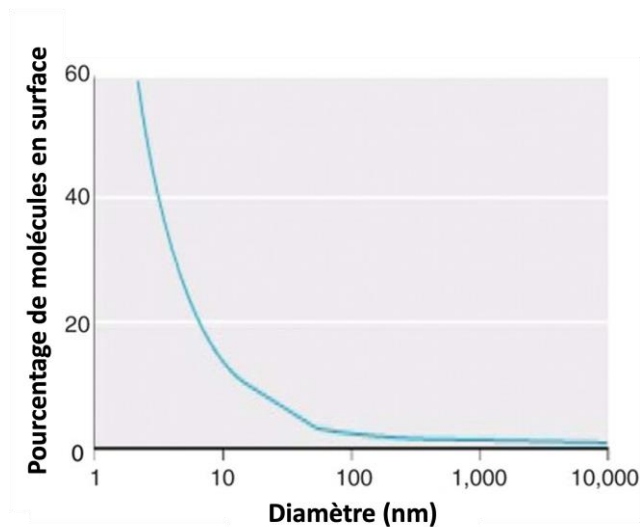


Figure 3 : Pourcentage de molécules en surface en fonction du diamètre d'une particule. Cette courbe illustre la proportionnalité inverse entre taille et surface. En effet, plus la taille diminue et plus le pourcentage de molécules en surface augmente, d'après (5).

La problématique de l'expression de la concentration particulaire d'un aérosol réside dans la complexité à trouver une expression cohérente avec la taille des particules qu'il contient. En effet, à masse égale, le nombre de particules mais aussi leurs surfaces seront plus importantes pour un aérosol contenant des particules à l'échelle nanométrique en comparaison avec un aérosol contenant des particules à l'échelle micrométrique (**Figure 3**). Ainsi, et pour s'affranchir des disparités de taille entre les particules, il a été proposé de prendre en compte le paramètre de la surface spécifique d'une particule, c'est-à-dire son rapport surface sur masse (m^2/mg) (5).

I.2 Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition

I.2.1 Généralités

La silice, ou plus exactement le dioxyde de silicium (SiO_2), est une substance chimique naturelle (minérale ou biogénique, ubiquitaire car retrouvée à plus de 60% au sein de la croûte terrestre) ou synthétique, pouvant être sous forme libre ou sous forme de silicates. Son organisation spatiale est le plus souvent tétraédrique, où 4 atomes d'oxygène sont liés de manière covalente à un atome de silicium pour former le SiO_4 . Dans un cadre continu de tétraèdres SiO_4 , chaque oxygène sera alors partagé entre deux tétraèdres permettant de retenir la formule globale SiO_2 . Les silicates incorporent quant à eux des molécules de SiO_2 à des oxydes métalliques variés (par exemple à base d'Al, Ca, Fe, K, Mg, Na ou Ti).

La silice sous forme libre peut exister à des tailles micrométrique et nanométrique, mais aussi sous deux états physiques ou structures spatiales : cristalline ou amorphe (**Figure 4**).

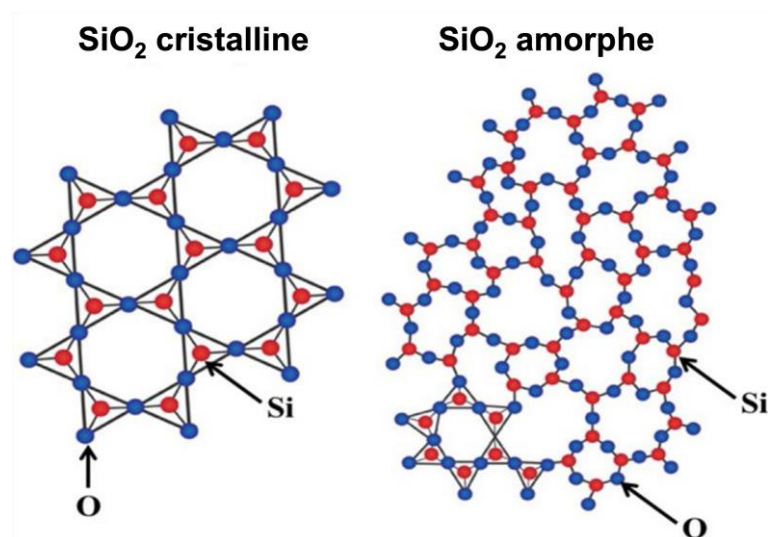


Figure 4 : Structures spatiales de silice (cristalline et amorphe) d'après (6)

1.2.2 Silice cristalline

1.2.2.1 Caractéristiques physico-chimiques

La silice cristalline possède une structure tridimensionnelle régulière où plusieurs tétraèdres de SiO_4 sont reliés entre eux de manière périodique. Les variétés minérales de la silice cristalline les plus répandues sont le quartz, la tridymite et la cristobalite. De même composition chimique, la principale différence entre ces variétés minérales réside dans la configuration spatiale. En effet, dans le motif Si-O-Si reliant plusieurs tétraèdres, l'angle entre les 2 atomes d'oxygène et l'atome de silicium détermine le polymorphisme.

Seul le quartz- α est stable dans les conditions atmosphériques normales de température et de pression. Lorsque celui-ci est chauffé à une température supérieure à 573°C , du quartz- β est obtenu qui lui-même chauffé à une température supérieure à 870°C devient de la tridymite- β . Il est possible d'obtenir de la cristobalite- β de 2 façons, la première étant de chauffer le quartz- β à une température supérieure à 1050°C et la deuxième de chauffer la tridymite- β à une température supérieure à 1470°C . Si les polymorphes de tridymite- β et de cristobalite- β sont refroidis, il est possible d'obtenir alors de la tridymite- α ou de la cristobalite- α avec des chutes de température de 114°C et 270°C , respectivement. Les préfixes α et β utilisés pour nommer ces différents polymorphes désigne donc des formes de silice cristalline obtenues à basse et haute températures respectivement (7,8).

Divers procédés notamment physiques permettent un changement de structure des silices avec un passage d'une structure amorphe à cristalline. De façon spontanée, les fumées de silice, silices amorphes, peuvent se transformer partiellement en cristobalite. De plus, un des procédés de fabrication de silice amorphe synthétique couramment utilisé est la calcination qui consiste à chauffer sous le seuil de fusion en vue d'une décomposition de la matière. Dans le cas de la calcination de diatomites, silice amorphe, de la cristobalite peut alors être générée. Lorsque les diatomites sont calcinées de manière classique, la teneur en silice cristalline peut aller jusqu'à 40%. Lorsque les diatomites sont calcinées par flux, méthode utilisant en plus un agent fondant tel que le carbonate de soude, la teneur en silice cristalline peut alors monter jusqu'à 70%.

I.2.2.2 Principales sources d'expositions à la silice cristalline

I.2.2.2.1 Origine naturelle

La silice cristalline est majoritairement d'origine naturelle, elle est présente dans de nombreux minéraux à l'échelle micrométrique. Le quartz- α est le polymorphe de silice cristalline le plus abondamment retrouvé sur Terre composant d'une grande partie de la lithosphère. Il est retrouvé dans le sable mais aussi les roches sédimentaires (roches siliceuses telles que le grès ou silex), métamorphiques (quartzite) et ignées de type plutonique (granite). La tridymite- α et la cristobalite- α sont retrouvées dans les roches ignées de type volcanique. Les formes β de ces polymorphes sont quant à elles rarement retrouvées à la surface de la Terre (7,8).

I.2.2.2.2 Origine anthropique

Les sources d'expositions d'origine anthropique correspondent à celles où une potentielle exposition survient suite à l'intervention de l'Homme. Dans ces parties, il sera distingué les sources d'expositions d'origine anthropique volontaire, donnant des produits manufacturés, de celles d'origine anthropique involontaire.

I.2.2.2.2.1 Origine anthropique volontaire (manufacturée)

La silice cristalline d'origine naturelle dont le quartz- α est la forme majoritaire est principalement employée dans trois principaux secteurs : la construction (détaillé dans le sous-chapitre I.7 - Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice), l'électronique et la santé :

- Dans le secteur du numérique et des nouvelles technologies, la transformation du quartz en silicium permet d'obtenir un élément conducteur, composant principal des puces électroniques et des panneaux solaires photovoltaïques.
- Dans le secteur de la santé, les farines de silice obtenues à partir du quartz broyé sont utilisées dans les prothèses dentaires telles que les couronnes.

Introduction

Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition

I.2.2.2.2 Origine anthropique involontaire

Les sources d'exposition d'origine anthropique involontaire regroupent les expositions à la silice cristalline émise lors de divers procédés thermiques ou mécaniques de haute énergie altérant des produits manufacturés à base de silice cristalline.

Le **Tableau 1** résume les principaux secteurs industriels en correspondance avec les applications issues des produits à base de silice cristalline (9–11).

Introduction
Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition

Tableau 1 : Principaux secteurs industriels en correspondance avec les applications issues des produits à base de silice cristalline (9–11).

Structure	Cristalline	
Origine	Naturelle	Synthétique
Type	Quartz	Diatomites (calcinées ± flux) mélange de silice amorphe et cristalline
Taille	µm	µm - nm
Agroalimentaire	-	-
Automobile	-	-
Construction	Extraction des sables et roches siliceuses (carrières) Préparation matières premières (cimenteries) Mise en œuvre des matériaux (bétons, ciments, céramiques) Agents de charge (peintures)	Isolants
Cosmétique	-	-
Numérique et nouvelles technologies	Conducteurs (puces électroniques, panneaux solaires photovoltaïques)	-
Papeterie	-	-
Textile	-	-
Santé	Farines de silice (couronnes dentaires)	-

I.2.3 Silice amorphe

I.2.3.1 Caractéristiques physico-chimiques

Les silices amorphes possèdent une structure tridimensionnelle irrégulière où les tétraèdres de SiO_4 ne présentent pas de structure fixe entre eux. A l'exception des terres de diatomées, d'origine naturelle, les autres types de silice amorphe sont d'origine synthétique (SAS), pouvant être produites selon différents procédés détaillés ci-après et également schématisés dans la première Figure de la revue du **sous-chapitre I.4.**

Tout d'abord, des procédés de synthèse par voie humide permettent d'obtenir des silices de type colloïdal, précipitées ou encore sous forme de gel. Les silices de type colloïdal sont synthétisées en faisant passer du silicate de sodium (Na_2SiO_3) sur une résine échangeuse de cations aboutissant à des particules quasi sphériques avec un diamètre entre 7 et 50 nm. Leurs dénominations commerciales sont par exemple A2000® ou encore Ludox®. Une méthode mise au point par le chimiste Werner Stöber à la fin des années 1960 permet également d'obtenir une silice colloïdale appelée silice de Stöber. Cette méthode consiste en des étapes successives d'hydrolyse-condensation où un précurseur, le tétraéthoxysilane (TEOS), est d'abord mis en solution dans de l'eau puis dans une solution d'alcool. L'ammonium, utilisé comme catalyseur, permet d'obtenir des particules sphériques dont le diamètre varie entre 50 nm et 2 μm . La méthode de Stöber est l'approche par voie humide la plus couramment utilisée en chimie pour la synthèse des nanoparticules de silice (SiNPs) car le diamètre des particules peut être facilement contrôlé (12). Par ailleurs, les silices précipitées sont synthétisées en mélangeant en milieu basique une solution de silicate de sodium (Na_2SiO_3) à une solution acide (le plus souvent acide sulfurique) tout en maintenant le pH supérieur à 7 (13). Ce procédé permet d'aboutir à des silices d'une grande porosité dont les particules ont un diamètre entre 5 et 100 nm, leur dénomination commerciale est par exemple Agrosil®, Zeofree® ou Zeosil® (14). Sur le même principe de synthèse mais cette fois-ci avec un pH inférieur à 7, des hydrogels de silice sont élaborés. Lorsque ces hydrogels sont filtrés lavés et séchés, des formes Xérogels sont obtenus. Une étape supplémentaire de frittage (chauffage sous le seuil de la fusion en vue d'une cohésion de la matière) permet

Introduction

Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition

autrement d'aboutir à des Aérogels. Dans les deux cas, ces gels de silice ont des propriétés hydrophiles et poreuses avec un diamètre entre 3 et 20 nm.

D'autre part, des procédés de synthèse par voie thermique permettent d'obtenir des silices de type pyrogénées, fumées ou à l'arc. Les silices pyrogénées sont synthétisées par un procédé d'hydrolyse du tétrachlorure de silicium (SiCl_4) à 1000°C . Ce procédé permet d'aboutir à des silices ayant des propriétés hydrophiles ou hydrophobes selon les traitements avec un diamètre entre 5 et 100 nm. Les dénominations commerciales de ces silices pyrogénées sont par exemple Aerosil[®], Cab-O-Sil[®] ou encore HDK[®]. Quant aux fumées de silice, elles sont plus précisément un sous-produit de la métallurgie dont le diamètre des particules peut varier entre 10 nm et $1\ \mu\text{m}$. Les silices dites « à l'arc » sont des silices amorphes synthétisées à partir de sable hautement purifié par un procédé de fusion (entre 1800 et 2100°C) à l'arc électrique durant environ 15 heures. Ce procédé permet d'aboutir à des silices ayant des propriétés de résistance importante aux chocs thermiques ainsi qu'une faible conductibilité thermique avec un diamètre entre 20 nm et 300 nm.

Enfin, des modifications physico-chimiques, telles que des modifications à la surface des particules ou l'ajout d'un surfactant dans le milieu, permettent d'obtenir des silices aux propriétés diverses. La silice mésoporeuse par exemple, est obtenue par une méthode dite d'autoassemblage coopératif. Cette méthode consiste en des étapes de polycondensation où un précurseur inorganique, le SiO_4^{2-} , est mis en contact d'un surfactant composé de micelles tensioactives. Ensuite retirées, ces micelles tensioactives donneront cette structure mésoporeuse à la silice (15).

I.2.3.2 Principales sources d'expositions

I.2.3.2.1 Origine naturelle

Les diatomites ou terres de diatomées sont des roches siliceuses d'origine biogénique, car formées de squelettes de diatomées, microalgues unicellulaires aquatiques de la division des *Bacillariophyta*. Vivantes, ces *Bacillariophyta* possèdent une enveloppe externe, le frustule, entièrement composé de silice amorphe avec une structure poreuse à l'échelle

Introduction

Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition

micrométrique. Cette structure poreuse, retrouvée dans les terres de diatomées, leur confère des propriétés absorbantes. Par ailleurs, la silice amorphe est aussi un composant des roches ignées de type volcanique telles que la pierre ponce.

I.2.3.3 Origine anthropique

I.2.3.3.1 Origine anthropique volontaire (manufacturée)

Les produits manufacturés à base de silice amorphe détaillés ci-après sont produits par l'Homme en vue d'une application industrielle.

Les diatomites, silice amorphe d'origine naturelle sont exploitées dans cinq principaux secteurs : agroalimentaire, construction (détaillé dans le sous-chapitre I.7 - Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice), cosmétique, papeterie et santé :

- Dans le secteur agroalimentaire, les diatomites sont utilisées comme agent de filtration dans les vins et boissons.
- Dans le secteur du cosmétique, elles sont exploitées pour leur propriété abrasive et entrent dans la composition de nombreux dentifrices notamment. Ils peuvent aussi être ajoutés dans certaines formulations en vue d'obtenir des exfoliants.
- Dans le secteur de la papeterie, elles sont utilisées comme agent de charge pour la fabrication des feuilles de papier.
- Dans le secteur de la santé, elles exercent une action biocide et insecticide mécanique en retenant les parasites au sein de leur structure poreuse. Vendue en pharmacie mais aussi dans les grandes surfaces et magasins spécialisés en jardinerie, cette poudre existe en version alimentaire ou non. La version alimentaire est utilisée comme vermifuge chez certains animaux. La version non alimentaire est utilisée comme insecticide ménager et extérieur à visée des insectes rampants tels que les fourmis, les punaises (y compris punaises de lit), les puces, les blattes ou encore les tiques (16).

Concernant les SAS obtenues par voie humide, celles-ci sont retrouvées dans quasiment tous les secteurs industriels :

Introduction

Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition

- Dans le secteur agroalimentaire, les silices colloïdales sont utilisées comme agent de clarification des boissons et les gels de silice peuvent être utilisés comme agents déshydratants ou desséchants.
- Dans le secteur automobile, les silices précipitées sont utilisées comme charge de renforcement dans les pneumatiques.
- Dans le secteur du cosmétique, les silices précipitées sont utilisées comme agent de charge dans certains dentifrices.
- Dans le secteur du numérique et des nouvelles technologies, les plaquettes de silicium incorporent des silices colloïdales comme agents de polissage.
- Dans le secteur de la papeterie, les silices précipitées sont utilisées dans les étiquettes autocollantes.
- Dans le secteur textile, les silices précipitées sont utilisées comme charge de renforcement dans les semelles de chaussures.

Les SAS obtenues par voie thermique sont également retrouvées dans de nombreux secteurs, à savoir :

- Dans les secteurs agroalimentaires et de la santé, les silices pyrogénées sont très couramment exploitées comme anti-agglomérants, également mentionnées comme additif E551.
- Dans le secteur du numérique et des nouvelles technologies, les silices à l'arc servent à l'encapsulation de nombreux composants électroniques.
- Dans le secteur de la papeterie, les silices pyrogénées sont également utilisées comme agents de charges dans les encres et les adhésifs.

Enfin, les silices mésoporeuses font partie des SAS modifiées en surface apportant des applications innovantes dans le secteur de la santé. En effet, la structure étant constituée de pores permet une encapsulation suivie d'une délivrance contrôlée d'un principe actif (15).

Introduction

Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition

I.2.3.3.2 Origine anthropique involontaire

Comme pour la silice cristalline, les sources d'exposition d'origine anthropique involontaire regroupent les expositions potentielles situées en périphérie des zones d'activités aboutissant aux produits manufacturés à base de silice amorphe. Par ailleurs, les fumées de silice étant un sous-produit de la métallurgie, elles ont été rejetées dans l'atmosphère jusque dans les années 1980 avant d'être exploitées pour les diverses applications industrielles citées ci-dessus et résumées dans le **Tableau 2**.

Introduction

Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition

Tableau 2 : Principaux secteurs industriels en correspondance avec les applications issues des produits à base de silice amorphe (10,11,13)

Structure		Amorphe						
Origine	Naturelle	SAS (voie humide)			SAS (voie thermique)			SAS (modifiées en surface)
Type	Diatomites	Colloïdales	Précipitées	Gels de silice	Pyrogénées	Fumées de silice	Silices à l'arc	Silices mésoporeuses
Taille	µm	µm - nm	nm	nm	nm	µm - nm	µm - nm	µm - nm
Agroalimentaire	Agent de filtration (vins et boissons)	Agent de clarification (boissons)		Agents déshydratants et desséchants	Anti-agglomérant (E551)			
Automobile		Charge de renforcement (pneumatique)						
Construction	Agents de charge (peintures) Isolants	Agents de charge (vernis, peintures) Revêtements des sols (propriétés antisalissantes et antistatiques)	Agents de charge (bétons projetés)	Isolants thermiques et phoniques	Agents de charge (peintures) Charges de renforcement (élastomères, silicones)	Incorporé dans les bétons haute performance (propriétés de fluidité, résistance à la compression et diminution de la perméabilité)		
Cosmétique	Abrasifs (dentifrice) et exfoliants	Agent de charge (dentifrices)		Abrasifs et épaississants				
Numérique et nouvelles technologies		Agents de polissage (plaquettes de silicium)				Encapsulation des composants électroniques		
Papeterie	Agents de charge (feuilles de papiers)	Étiquettes autocollantes			Agents de charges (encres et adhésifs)			
Textile		Charge de renforcement (semelles de chaussures)						
Santé	Insecticide	Agents déshydratants et desséchants			Anti-agglomérant (E551)			Délivrance contrôlée de médicaments

I.3 État des connaissances chez l'Homme

I.3.1 Pénétration et devenir des particules dans l'appareil respiratoire

I.3.1.1 Généralités

L'appareil respiratoire représente la voie d'exposition majoritaire des aérosols particulaires. Il peut être subdivisé en 3 régions : extra-thoracique, trachéo-bronchique et alvéolaire. Dans certaines représentations plus dichotomiques, les voies aériennes supérieures désignent la région extra-thoracique et les voies aériennes inférieures les régions trachéo-bronchique et alvéolaire.

Du point de vue anatomique, le poumon est l'organe principal de l'appareil respiratoire, composé des bronches, bronchioles et alvéoles. L'Homme possède deux poumons : le poumon gauche composé de 2 lobes (supérieur et inférieur) et le poumon droit composé de 3 lobes (supérieur, moyen et inférieur). La trachée se divise au niveau de la carène en deux bronches souches, droite et gauche. Chez l'Homme, chaque bronche souche va se diviser de façon dichotomique en bronches. Il existe au total chez l'Homme 23 degrés de division bronchique pour aboutir à la 23^{ème} ramification aux bronchioles respiratoires. Ces bronchioles respiratoires sont une particularité chez l'Homme, elles-mêmes s'ouvrent sur 2 à 5 sacs alvéolaires (**Figure 5**) (17).

Les fonctions de l'appareil respiratoire sont multiples : une fonction de conduction de l'air dans les régions extra-thoracique (intégrant le nez, la bouche, le pharynx et le larynx) et trachéo-bronchique jusqu'aux bronchioles terminales, puis, la fonction respiratoire à proprement parler des bronchioles respiratoires à la région alvéolaire pour permettre les échanges gazeux.

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

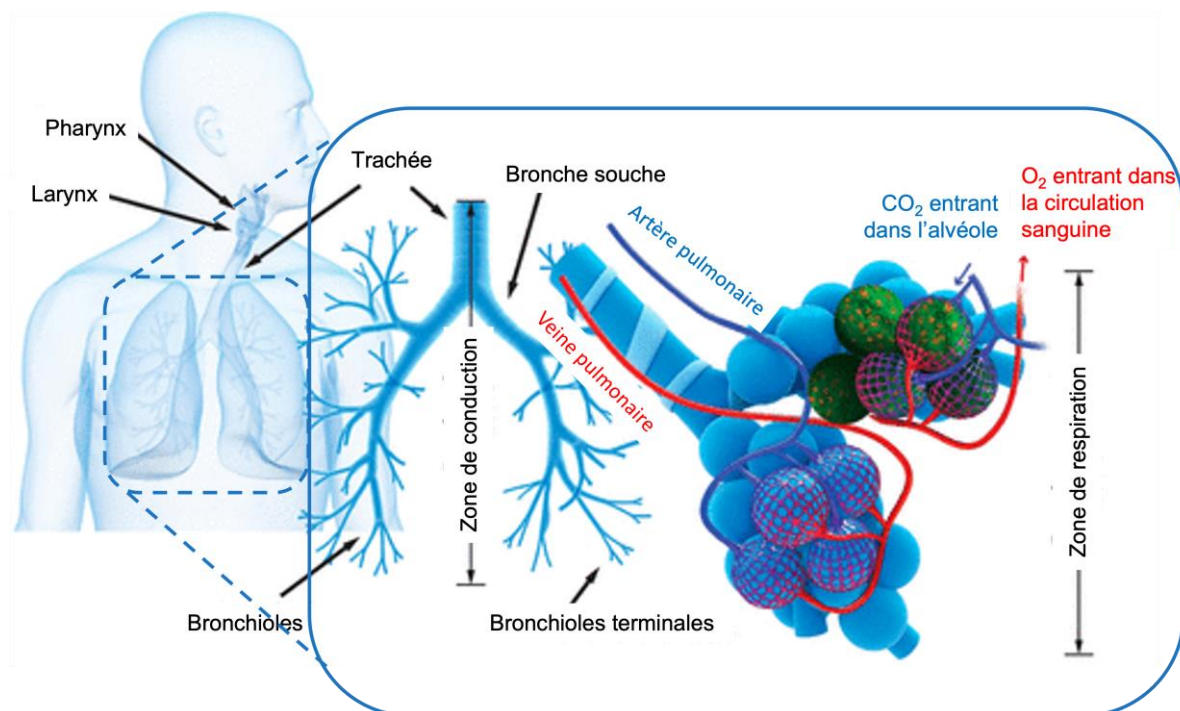


Figure 5 : Représentation des différentes régions de l'appareil respiratoire, d'après (17). La région extra-thoracique intègre le nez, la bouche, le pharynx et le larynx et est prolongée de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales par la région trachéo-bronchique, elle-même prolongée la région alvéolaire.

I.3.1.1.1 Région trachéo-bronchique

La région trachéo-bronchique est le prolongement de la région extra-thoracique, celle-ci va de la trachée, conduit d'environ 12 à 22 mm de diamètre, jusqu'aux bronchioles respiratoires mesurant quant à elles 0,5 à 1 mm de diamètre.

Du point de vue histologique, la région trachéo-bronchique contient plusieurs populations cellulaires ayant des caractéristiques différentes en fonction de leur localisation bronchique ou bronchiolaire :

- Au niveau bronchique, en partant de la couche la plus interne à la plus externe, on retrouve :
 - Un épithélium cylindrique et pseudostratifié, contenant plusieurs couches cellulaires dont toutes les cellules s'insèrent sur la membrane basale. Il est composé majoritairement de cellules ciliées et de cellules caliciformes sécrétant du mucus, mais contient également des cellules souches (cellules basales de remplacement) et des cellules neuroendocrines.

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

- Une couche de fibres élastiques, soutenant l'épithélium bronchique.
- Des glandes séromuqueuses qui entourent la couche de fibres élastiques. Il s'agit de la principale source de production de mucus au niveau bronchique.
- Une couche de cellules musculaires lisses de forme hélicoïdale.
- Du cartilage, sous forme de plaques.
- Un tissu conjonctif lâche que l'on appelle l'adventice.
- Au niveau bronchiolaire, en partant de la couche la plus interne à la plus externe, on retrouve :
 - L'épithélium de forme cylindrique s'aplatissant de plus en plus pour aboutir à une forme cubique simple et monostratifiée. Il est également composé de cellules ciliées mais pas de cellules à mucus, ces cellules étant remplacées par les cellules Club (anciennement appelées cellules de Clara) qui sont des cellules sécrétant un liquide composé de certaines protéines du surfactant, telles que la protéine SP-A.
 - Une gaine plus fine de fibres élastiques, soutenant cet épithélium bronchique aminci.
 - Une couche circulaire de cellules musculaires lisses, soutenant ces précédentes couches.A noter que les glandes séromuqueuses et le cartilage sont absentes dans cette partie bronchiolaire.

I.3.1.1.2 Région alvéolaire

Vient enfin la région alvéolaire où l'air amené lors de l'inspiration depuis la trachée jusqu'aux alvéoles permet ainsi un mécanisme d'échange entre l'apport d'O₂ lors de l'inspiration et l'évacuation du CO₂ produit par l'organisme lors de l'expiration. Ce mécanisme d'échange gazeux est appelé l'hématose et se déroule au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. L'Homme possède au total environ 400 millions d'alvéoles, ayant un diamètre d'environ 200 µm et qui se regroupent en sacs alvéolaires *via* leurs conduits. Ce nombre important d'alvéoles permet de faciliter les échanges entre les gaz et le sang, cela représentant *in fine* une surface d'échange totale de 150 à 200 m² (18).

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

Du point de vue histologique, un sac alvéolaire contient plusieurs alvéoles délimitées les unes des autres par des cloisons ou septa. Ces cloisons alvéolaires comprennent les populations cellulaires suivantes :

- Les cellules épithéliales alvéolaires, également appelées pneumocytes. Il en existe 2 types : les pneumocytes de type I et de type II.
 - Les pneumocytes de type I sont des cellules très aplaties tapissant 90% de la surface de l'alvéole et participant aux échanges gazeux en étant partie intégrante de la membrane alvéolo-capillaire. En effet, une de leur sous-couche membranaire est au contact d'une des sous-couches membranaires des cellules endothéliales au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, lieu de l'hématose. Les échanges gazeux sont en effet favorisés à ce niveau car l'épaisseur de la barrière alvéolo-capillaire est très fine (entre 0,2 et 0,5 μm).
 - Les pneumocytes de type II sont des cellules de forme cubique ayant des microvillosités au pôle apical. Ces cellules sont impliquées dans la production du surfactant. Le surfactant est un film liquidien protéino-lipidique composé d'une phase aqueuse du côté des cellules épithéliales et d'une phase protéino-lipidique entourant la lumière et contenant 90% de phospholipides et 10% de protéines. En raison de sa composition, le surfactant est un agent tensioactif essentiel pour empêcher le collapsus des alvéoles lors de chaque inspiration. Les pneumocytes de type II permettent également la régénération des pneumocytes de type I par transdifférenciation en cas de mortalité cellulaire, leur indice de prolifération est un index de destruction alvéolaire important par exemple en cas de toxicité alvéolaire d'origine chimique.
- L'interstitium composé d'une matrice extracellulaire contenant du collagène de type I et de l'élastine, de fibroblastes et de cellules immunitaires telles que des macrophages (que l'on qualifie de macrophages interstitiels), des polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) et des lymphocytes.
- D'autres macrophages sont apposés sur l'épithélium alvéolaire, il s'agit des macrophages alvéolaires présents dans la lumière alvéolaire et retenus dans la phase protéino-lipidique du surfactant. Chaque alvéole en contient en moyenne entre un et deux, ils représentent 90% des cellules de la lumière alvéolaire (19,20).

Introduction État des connaissances chez l'Homme

Les différentes populations cellulaires des régions trachéo-bronchiques et alvéolaires sont illustrées dans la **Figure 6**.

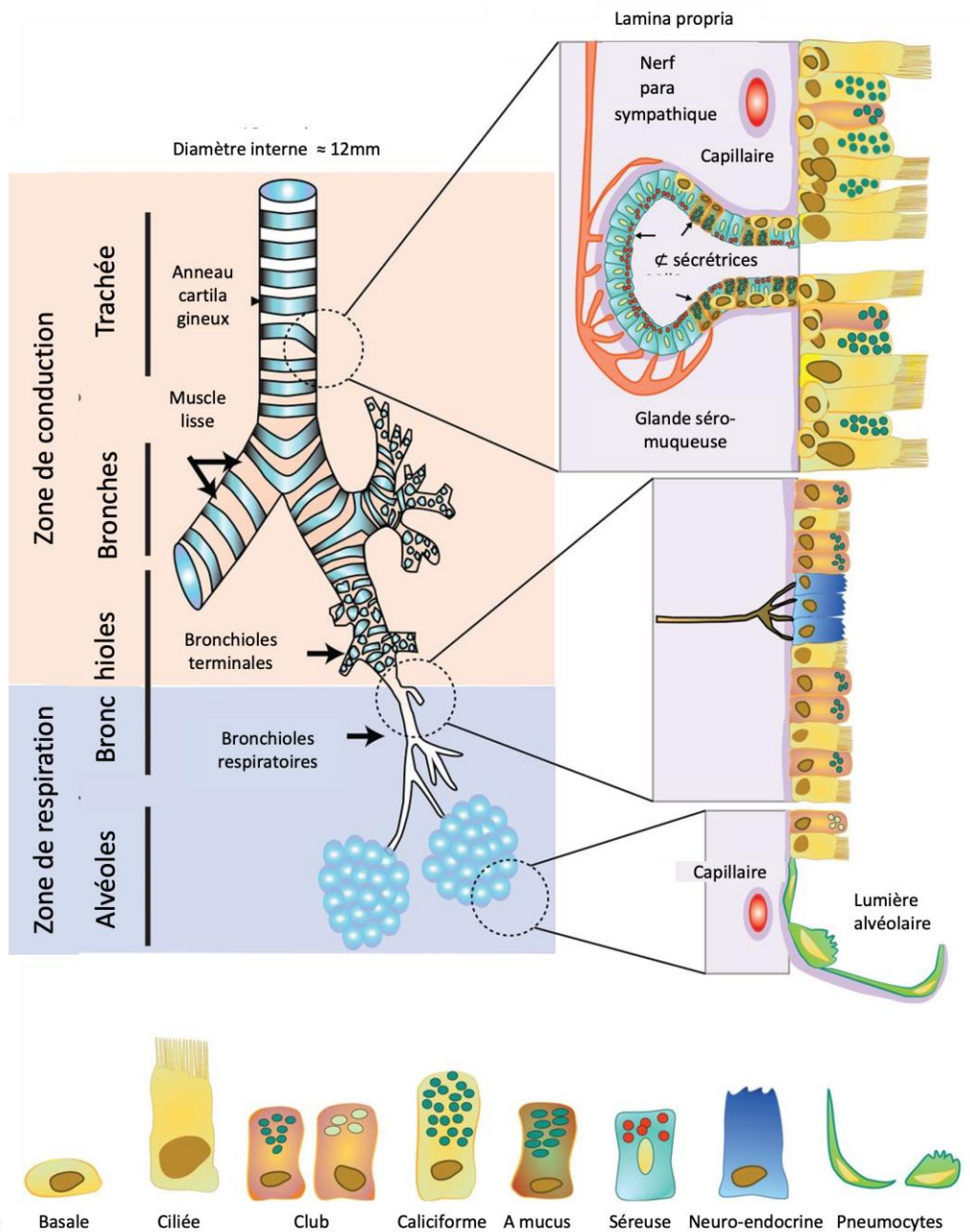


Figure 6 : Populations cellulaires présentes dans les régions trachéo-bronchique et alvéolaire, d'après (21).

I.3.1.2 Pénétration des particules

Lorsque les particules sont émises dans l'air sous forme d'aérosol, celles-ci pénètrent majoritairement dans l'appareil respiratoire par inhalation *via* la cavité nasale principalement, mais aussi par la cavité buccale. En effet, l'Homme possède une ventilation bimodale, nasale

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

et orale, contrairement aux rongeurs par exemple qui possèdent un mode de ventilation uniquement nasal. Une quantité moindre de ces particules entrées *via* la cavité buccale, peut également atteindre l'appareil digestif. Par ailleurs, il a également été démontré que les particules pouvaient pénétrer par voie nasale le cerveau *via* le nerf olfactif (3).

Le degré de pénétration des particules au sein des voies respiratoires dépend de nombreux facteurs pouvant être reliés, d'une part, directement aux caractéristiques physico-chimiques des particules, mais aussi, d'autre part, aux caractéristiques anatomiques et à la pré existence d'une pathologie pulmonaire.

Ces caractéristiques physico-chimiques tiennent compte majoritairement de la taille (D_{ae}) et de la morphologie des particules. Des facteurs reliés à la structure anatomique et/ou à la présence éventuelle d'une pathologie pulmonaire sous-jacente modifiant les conditions physiologiques habituelles peuvent aussi influencer leur pénétration. Sur le plan anatomique, certaines structures de la région extra-thoracique contribuent à freiner la pénétration des particules. C'est par exemple le cas des poils au niveau de la cavité nasale, recouverte également d'un épithélium pavimenteux stratifié, squameux et sec où certaines particules peuvent être évacuées par éternuement. A l'état physiologique et pour un même individu, les paramètres de fréquence respiratoire et de volume courant peuvent être modifiés en fonction du mode d'activité de l'individu : au repos ou à l'effort. En effet, ces paramètres respiratoires étant augmentés par l'activité physique, cela aboutira à un degré plus important de pénétration de l'aérosol qu'au repos. De même, si un individu est atteint d'une pathologie pulmonaire modifiant ces paramètres respiratoires, le degré de pénétration des particules en sera directement impacté (22).

Introduction État des connaissances chez l'Homme

I.3.1.3 Déposition

Une fois pénétrées, les particules peuvent atteindre les différentes régions de l'appareil respiratoire et s'y déposer. Il existe 5 mécanismes de déposition des particules au sein de ces différentes régions représentés dans la **Figure 7** et détaillés ci-après : l'interception, l'impaction, la sédimentation, la diffusion et l'attraction électrostatique (23,24).

- L'interception est un mécanisme par lequel les particules de morphologie allongées se déposeront lorsqu'une de ses extrémités aura intercepté une structure de l'appareil respiratoire. Ce mécanisme concerne majoritairement les fibres comme l'amiante.
- L'impaction est un mécanisme par lequel les particules ne poursuivent plus l'écoulement de l'air mais une trajectoire linéaire et percutent les parois de l'appareil respiratoire dues à leur inertie. Les particules les plus grossières se déposeront alors dans la région extra-thoracique et celle avec un D_{ae} inférieur à 30 μm pourront atteindre les bronches de la région trachéo-bronchique et celle ayant un $D_{ae} < 10 \mu\text{m}$ pourront en partie aller jusqu'à la région alvéolaire.
- La sédimentation est un mécanisme par lequel les particules, attirées par la force de gravité, se déposeront à la surface inférieure des bronches et bronchioles horizontales. Ce mécanisme est valable pour les particules grossières avec un D_{ae} entre 2,5 à 5 μm ainsi que les particules fines avec un D_{ae} entre 0,5 à 2,5 μm .
- La diffusion est un mécanisme par lequel les particules les plus fines avec un $D_{ae} < 0,5 \mu\text{m}$, et en particulier pour les particules ultrafines avec un $D_{ae} < 0,1 \mu\text{m}$, lorsqu'elles entrent en collision avec des molécules à l'état gazeux, du fait d'un mouvement aléatoire également appelé mouvement Brownien.
- L'attraction électrostatique est un mécanisme par lequel les particules chargées se déposeront au sein d'une structure de l'appareil respiratoire par laquelle leur charge sera attirée.

Introduction État des connaissances chez l'Homme

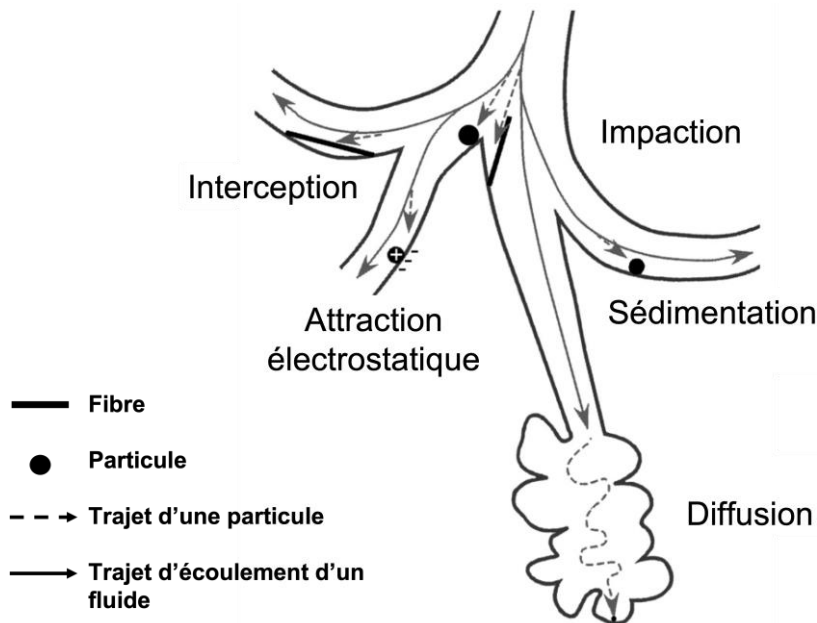


Figure 7 : Principaux mécanismes de dépôt des particules au sein de l'appareil respiratoire, d'après (23).

I.3.1.4 Clairance pulmonaire

La clairance pulmonaire correspond à l'ensemble des processus d'élimination des particules (mais aussi des agents pathogènes) déposées au sein de l'appareil respiratoire. Les mécanismes de clairance diffèrent selon les régions extra-thoracique, trachéo-bronchique ou alvéolaire. Deux principaux mécanismes ont été identifiés : la clairance muco-ciliaire et la clairance macrophagique et d'autres mécanismes de défense minoritaires peuvent également intervenir (25).

I.3.1.4.1 Clairance muco-ciliaire

La clairance muco-ciliaire a lieu depuis la région trachéo-bronchique vers la région extra-thoracique pour aller vers le carrefour aérodigestif. La clairance muco-ciliaire, également appelée « tapis » ou « escalator » muco-ciliaire, s'effectue au niveau de l'épithélium nasal et au niveau de l'épithélium bronchique. Il s'agit d'un processus d'élimination rapide, car la demi-vie d'élimination des particules *via* ce mécanisme est estimée à quelques heures voire quelques jours, en général moins de 24 heures. Le tapis muco-ciliaire est constitué de cellules à mucus et de cellules ciliées possédant des cils à leur pôle apical. Dans un premier temps, la

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

viscosité et l'humidité générées par le mucus vont permettre la capture des particules. Ce mucus contient une couche supérieure, très visqueuse composée à 98% d'eau et une couche inférieure, appelée le liquide péri-ciliaire, peu visqueuse évitant que le mucus n'adhère à l'épithélium et facilitant le battement des cils (21,26). Dans un second temps, un battement synchrone des cils, allant du bas vers le haut du tractus respiratoire, avec une fréquence d'environ 15 Hz (27), fait remonter le film muqueux jusqu'à la glotte où les particules seront alors évacuées *via* le carrefour aéro-digestif soit par expectoration, soit par ingestion. Il est à noter que plus les particules sont hydrosolubles et plus elles seront éliminées facilement par le mucus.

I.3.1.4.2 Clairance macrophagique

La clairance macrophagique a lieu dans les régions bronchique et alvéolaire où les macrophages alvéolaires vont exercer leur fonction de phagocytose. Ce mécanisme de clairance concerne majoritairement les particules fines d'un $D_{ae} < 0,5 \mu\text{m}$, qui ont atteint la région alvéolaire par diffusion. Il s'agit d'un processus long, car la demi-vie d'élimination des particules *via* ce mécanisme est estimée à environ 400 jours. La phagocytose des particules par les macrophages consiste en l'internalisation et la digestion des particules par les lysosomes du macrophage. Ces particules digérées vont ensuite être relarguées en vue d'une évacuation par le tapis muco-ciliaire mais aussi par la circulation lymphatique, en transitant par l'intermédiaire des macrophages interstitiels. Lorsque les macrophages atteignent leur capacité maximale de phagocytose d'autres macrophages sont recrutés à travers la barrière alvéolo-capillaire. Ces macrophages sont initialement issus de monocytes provenant de la circulation sanguine.

Il existe deux phénotypes de macrophages : les macrophages de phénotype M1 et les macrophages de phénotype M2, ayant chacun des rôles définis. Cette dénomination M1/M2 dérive directement de l'appellation des différents phénotypes de lymphocytes T helper Th1/Th2. Les macrophages M1 participent à la phagocytose des particules et des agents pathogènes, ils sécrètent dans l'environnement des molécules pro-inflammatoires (protéines, cytokines et chemokines notamment). Les macrophages M2 peuvent être divisés en 3 sous-phénotypes : M2a, M2b et M2c. Les macrophages M2a participent à la phagocytose des cellules apoptotiques. Les macrophages M2b sécrètent des molécules anti-inflammatoires

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

(impliquées dans des processus de résolution de l'inflammation). Enfin, les macrophages M2c participent au remodelage pulmonaire (19).

I.3.1.4.3 Autres mécanismes de défense

Dans la région alvéolaire et lorsque le poumon est agressé par une exposition de manière permanente à un aérosol particulaire et/ou gazeux, d'autres cellules immunitaires peuvent être recrutées en seconde ligne à travers la barrière alvéolo-capillaire. C'est le cas des polynucléaires neutrophiles qui ont eux aussi une capacité de phagocytose. Il est à noter que d'autres cellules immunitaires sont retrouvées parmi les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, mais dans une moindre mesure quantitativement : polynucléaires éosinophiles, lymphocytes et plaquettes engagés également dans la défense immunologique, notamment pour les deux premiers types cellulaires.

I.3.1.5 Rétention pulmonaire et translocation

Si les mécanismes de clairance sont dépassés, une rétention pulmonaire des particules survient si les particules sont biopersistantes du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques, notamment leur degré de solubilité. La quantité de particules restantes dans les voies respiratoires est alors qualifiée de charge pulmonaire. Il est à noter que plus les particules sont insolubles et plus la charge pulmonaire sera importante. Il est important de noter que la biopersistence de particules minérales peu ou pas hydrosolubles peut être très longue de l'ordre de plusieurs dizaines d'années après des expositions importantes et prolongées dans le temps permettant de réaliser des analyses minéralogiques à la recherche de particules minérales fibreuses ou non fibreuses à partir des parenchymes pulmonaires ou de liquide de lavages broncho-alvéolaires.

Indirectement et dans une moindre mesure, les particules inhalées peuvent, transloquer pour atteindre la circulation sanguine, mais aussi la circulation lymphatique (28). En transloquant *via* la barrière alvéolo-capillaire, les particules pourront atteindre la circulation sanguine et ainsi pénétrer dans d'autres organes comme le cœur, les reins ou même le cerveau si elles traversent la barrière hémato-encéphalique. De la même manière, en

Introduction État des connaissances chez l'Homme

transloquant *via* la circulation lymphatique, les particules pourront atteindre la circulation lymphatique et ainsi pénétrer dans certains organes lymphoïdes tels que la rate, les ganglions lymphatiques du tractus respiratoire ou de la plèvre, ou encore le tissu lymphoïde associé aux muqueuses plus communément appelé MALT (acronyme de l'anglais mucosa associated lymphoid tissue) (29).

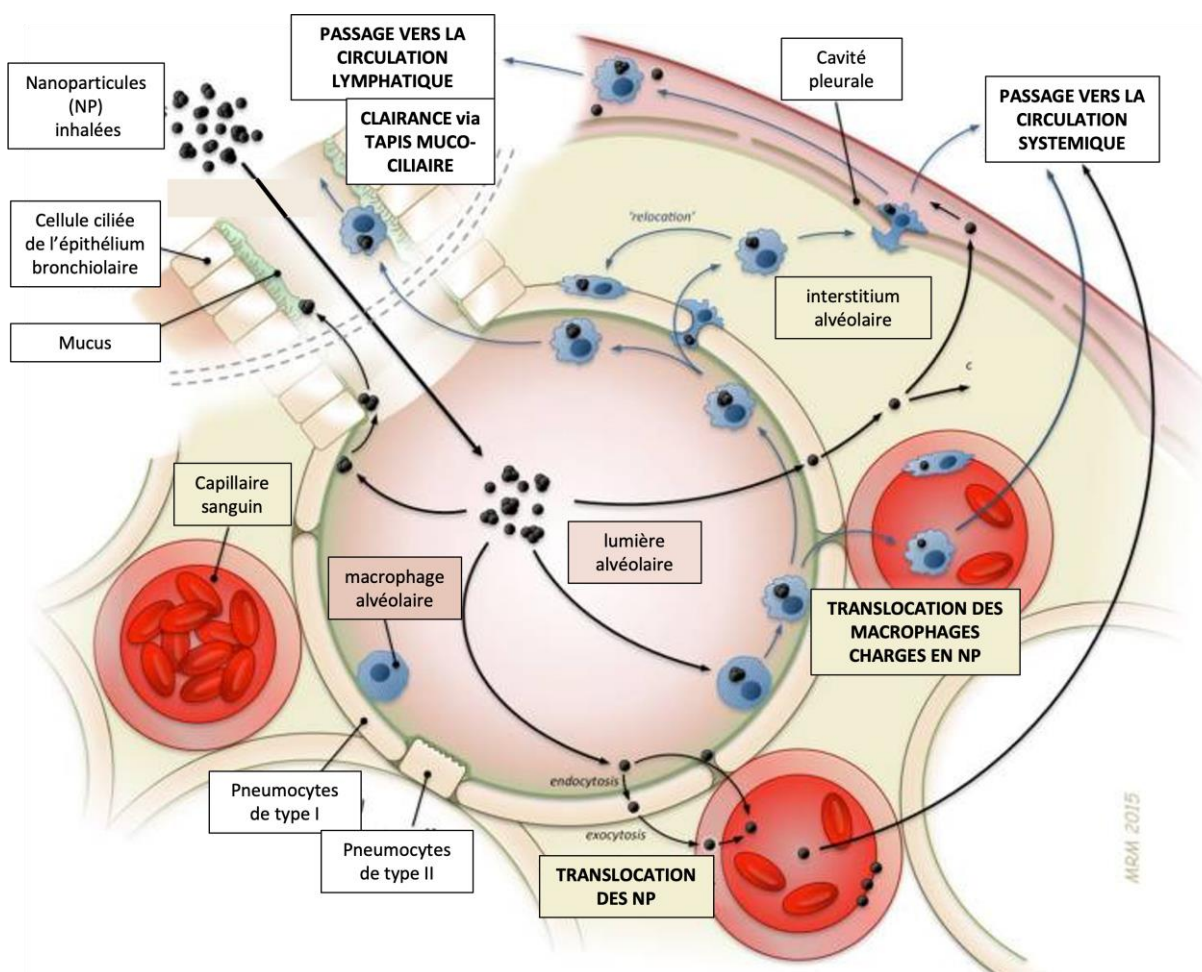


Figure 8 : Principaux mécanismes de clairance et de translocation des nanoparticules dans la région alvéolaire, d'après (29)

Introduction **État des connaissances chez l'Homme**

I.3.2 Données épidémiologiques des effets de la silice chez l'Homme

Jusqu'à récemment, la structure spatiale de la silice était considérée comme l'élément déterminant de la toxicité de la silice en faveur d'après la littérature d'une plus grande toxicité de la silice cristalline allant jusqu'à conférer à la silice amorphe une absence d'effet toxique.

I.3.2.1 Pathologies non tumorales liées à la silice cristalline

I.3.2.1.1 Pathologies respiratoires

Les pathologies respiratoires liées à la silice cristalline sont majoritairement en lien avec une exposition professionnelle, ces pathologies font partie de la famille des pneumoconioses.

I.3.2.1.1.1 Silicoses

La silicose est la pneumoconiose causée par l'inhalation de silice cristalline. Dans l'histoire des maladies professionnelles, la silicose a joué un rôle clé. Définie historiquement en 1930 lors de la conférence d'experts internationaux de Johannesburg, la silicose a pu dès lors être indemnisée chez des ouvriers travaillant dans les mines de charbon, très touchés par cette pathologie à l'époque (30). Récemment, des cas de silicoses aiguës, allant jusqu'à la transplantation pulmonaire dans certains cas, ont été signalés en Europe du Sud, Israël et Australie chez des travailleurs ayant fabriqué ou usiné des plans de travail en pierre reconstituée, également appelée « quartz de synthèse » ou « César stone », contenant un pourcentage important de silice cristalline (jusqu'à 98%) (31). A l'issue de cette recrudescence de cas, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a lancé une auto-saisine « en vue de mettre à jour les connaissances concernant les dangers, expositions et risques relatifs à la silice cristalline et de proposer d'éventuelles mesures de réduction des risques et de prévention ». Un rapport d'expertise collective est paru en avril 2019 (10). A l'échelle mondiale, des éditoriaux parus notamment dans *The Lancet Respiratory Medicine* en 2019 viennent aussi mettre en exergue la nécessité d'une meilleure prévention vis-à-vis de cette pathologie connue depuis bientôt 100 ans (32,33).

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

De façon plus précise, il est possible de distinguer les formes aiguës (silico-protéinose aiguë et silicose accélérée) des formes chroniques (silicose chronique) en fonction des niveaux d'exposition et la chronologie de l'exposition.

Concernant les formes aiguës de silicose, la silico-protéinose aiguë correspond à la forme de silicose la plus rapide puisque cette pathologie peut survenir entre quelques semaines et 2 ans après une exposition à la silice cristalline. La silicose dite « accélérée » se développe, quant à elle, suite à une exposition d'environ une dizaine d'années. Dans les deux cas, ces formes aiguës de silicoses sont provoquées par des niveaux d'exposition élevés.

Concernant les formes chroniques de silicose, la silicose chronique correspond à la forme de silicose la plus fréquente se développant suite à une exposition d'une durée plus longue entre 15 et 20 ans. Cette forme de silicose est provoquée par des niveaux d'exposition en général un peu plus modérés. Les symptômes typiques sont une toux accompagnée d'expectorations, ainsi qu'une dyspnée.

Du point de vue clinique, la silicose est définie par deux principales entités : une fibrose pulmonaire et une formation de lésions nodulaires, plus communément appelés nodules silicotiques. Les nodules silicotiques sont la conséquence d'une biopersistance de particules de silice cristalline dans le poumon. En effet, l'accumulation de ces particules induit un recrutement accru de macrophages (**Figure 9A**), qui laissent place à la formation de nodules lorsque leur capacité de phagocytose est dépassée (**Figure 9B**). Histologiquement, les nodules silicotiques sont des formations fibrohyalines avec un centre acellulaire contenant une particule de silice cristalline, facilement détectée par sa biréfringence lors d'une observation au microscope à lumière polarisée (34). Il est important de noter que toute particule biréfringente observée n'est pas forcément une particule de silice.

La fibrose massive progressive (FMP) est une forme postérieure à la silicose pulmonaire, caractérisée par des atteintes histologiques avec des lésions de 10mm ou plus correspondant à la fusion de plusieurs nodules silicotiques.

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

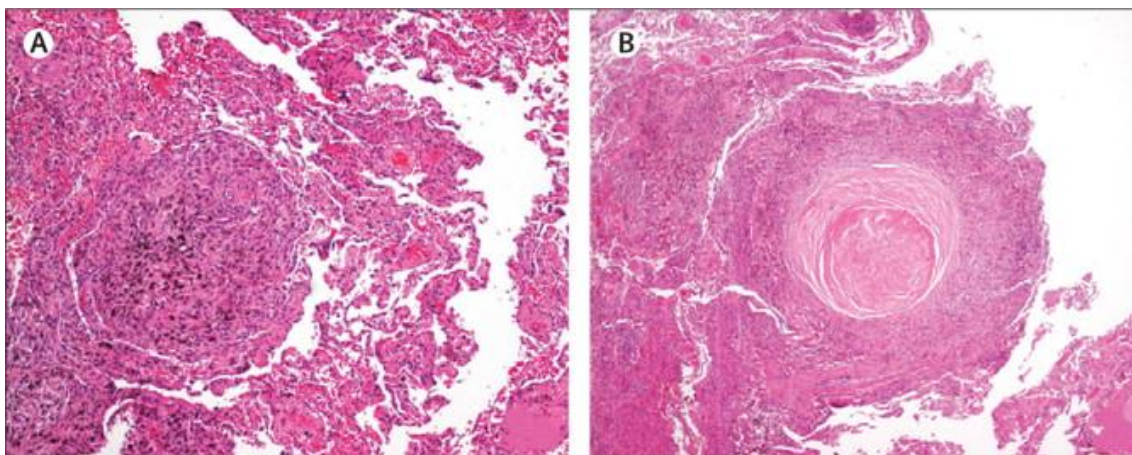


Figure 9 : Coupes histologiques de poumons contenant des lésions silicotiques, d'après (34). La partie **A** correspond à l'accumulation précoce de macrophages contenant des particules de silice cristalline (grossissement X100). La partie **B** représente la résultante chronique liée à la surcharge de particules de silice cristalline : la formation d'un nodule fibrohyalin (grossissement X40).

Sur l'échelle de temps du développement des silicozes, il est de plus en plus discuté que les formes localisées spécifiquement au niveau ganglionnaire seraient antérieures à l'apparition des formes pulmonaires avec des nodules silicotiques retrouvés au niveau des ganglions médiastinaux (35,36). Dans le dernier rapport, les experts de l'ANSES recommandent d'intégrer la forme ganglionnaire silicotique sans syndrome micronodulaire associé à des silicozes pulmonaires précoces (10).

1.3.2.1.1.2 Pathologies bronchiques et bronchiolaires liées à la silice cristalline

La maladie des petites voies aériennes (MPVA) correspond à une atteinte fonctionnelle des petites voies aériennes (petites bronches et bronchioles) diagnostiquée par une spirométrie avec une chute des débits distaux. Histologiquement, les lésions dans cette zone sont principalement inflammatoires et fibrosantes avec un dépôt important de particules de silice au sein de l'épithélium altérant directement la clairance muco-ciliaire (10,37).

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie respiratoire chronique atteignant les grosses bronches. Elle est très fréquente, souvent lentement progressive, et particulièrement invalidante, avec un fort impact en santé publique dans les

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

pays développés. En effet, elle est la 3ème cause de mortalité dans le monde depuis 2019 d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (38) et touche environ 5 à 10% de la population adulte de plus de 45 ans, soit environ 3,5 millions de sujets et 18 000 décès par an en France (39). Le principal facteur étiologique de la BPCO (avec une fraction de risque attribuable de plus de 80%) est sans conteste le tabagisme (40), mais il existe aussi des facteurs professionnels dont la fraction de risque attribuable est estimée à environ 15%. Ces facteurs professionnels sont l'exposition à des gaz, des poussières, des vapeurs et des fumées dans certains secteurs professionnels, comme : l'industrie textile (coton), certaines activités agricoles (élevage de porc et de volaille, production laitière), l'industrie minière, les fonderies et la sidérurgie et le secteur du BTP (41). Dans de nombreuses études épidémiologiques, la silice est une substance chimique associée à la survenue de BPCO (42).

La BPCO peut s'accompagner de deux autres entités de façon inconstante : la bronchite chronique et l'emphysème. La bronchite chronique est caractérisée par une inflammation des bronchioles et des bronches aboutissant à une sécrétion accrue de mucus, les symptômes typiques sont une toux accompagnée d'expectorations pendant au moins 3 mois par an depuis plus de 2 années consécutives. L'emphysème est, quant à lui, par une distension anormale et permanente des espaces aériens associée à une destruction des cloisons interalvéolaires. Le symptôme typique mais non spécifique est la dyspnée (d'effort et/ou de repos en fonction de la sévérité) (43). Il en existe deux types, l'emphysème pan-lobulaire et l'emphysème centro-lobulaire, tous deux reliés à des étiologies qui leur sont propres : génétique pour le premier, en lien avec des expositions chroniques telles que la silice cristalline pour le second. La bronchite chronique et l'emphysème sont tous deux également associés à une exposition à la silice cristalline sans que le patient ait une BPCO. La BPCO peut conduire au final à une insuffisance respiratoire chronique sévère.

I.3.2.1.1.3 Autres pathologies pulmonaires liées à la silice cristalline

Indépendamment de la silicose, il a été rapporté dans certaines études épidémiologiques une association dose-dépendante entre une exposition à la silice cristalline et la survenue de tuberculose (44). Il est à noter que la tuberculose peut être associée à une silicose existante

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

(dans ce cas plus spécifiquement nommée silico-tuberculose) ou non. De même, une fibrose pulmonaire peut survenir et être directement reliée à l'exposition à la silice cristalline (10).

I.3.2.1.2 Pathologies non respiratoires liées à la silice cristalline

Au sein des maladies auto-immunes systémiques (MAIS), il est distingué les connectivites et les vascularites dont la physiopathologie se manifeste au niveau du tissu conjonctif et des vaisseaux, respectivement. Parmi les connectivites, il a été établi dans l'expertise de l'ANSES que la sclérodermie systémique a un lien de causalité certain et important avec une exposition à la silice cristalline. Par ailleurs, l'expertise de l'ANSES rapporte un lien de causalité certain entre l'exposition à la silice cristalline et le lupus érythémateux disséminé d'une part, et la polyarthrite rhumatoïde d'autre part. Par ailleurs, une authentique silicose peut être associée à une sclérodermie ou une polyarthrite rhumatoïde, ces associations sont alors appelées : syndrome de Caplan-Colinet et syndrome d'Erasmus, respectivement (10). Il est à noter que certains facteurs environnementaux ou professionnels, comme la silice cristalline, peuvent être des facteurs déclenchants, mais aussi aggravants de l'une de ces trois pathologies auto-immunes. Parmi les vascularites, la vascularite à anticorps anti cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA+) est une pathologie auto-immune vasculaire comportant une formation d'anticorps dirigés contre le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles. L'expertise de l'ANSES rapporte dans ce cas un lien de causalité possible sans relation dose-réponse (10). Par ailleurs, l'émergence de maladies auto-immunes, telles que la sclérodermie systémique, le syndrome d'Erasmus ou encore la vascularite à ANCA+, a également été observée chez les travailleurs utilisant la pierre reconstituée ou « quartz de synthèse» (45).

I.3.2.2 Pathologies tumorales liées à la silice cristalline

La silice cristalline a été classée par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) en 1997 dans le groupe 1, c'est à dire comme agent cancérigène avéré pour l'Homme (46), du fait notamment d'études épidémiologiques et de méta-analyses allant dans le sens d'une relation dose-effet entre l'exposition à la silice cristalline et la survenue de cancer broncho-pulmonaire. Plus récemment, en 2017, l'Union Européenne a classé la silice cristalline comme agent cancérigène certain (47). Néanmoins, une analyse groupée et basée

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

sur 14 cohortes vient nuancer cette relation dose-effet puisque le risque de cancer broncho-pulmonaire a été mis en évidence y compris à des niveaux d'exposition faibles : entre 0 et 1,09 mg/m³ par an (48).

Par ailleurs, les cancers extra-pulmonaires sont très peu évalués dans les cohortes de patients exposés à la silice cristalline, mais certains cancers, notamment digestifs (gastriques, intestinaux et gastro-intestinaux) sont suspectés par certains auteurs, mais sans association avérée (10).

I.3.2.3 Pathologies non tumorales liées à la silice amorphe

Contrairement à la silice cristalline, les effets respiratoires liés à une exposition à la silice amorphe sont moins bien connus. En effet, il a été rapporté que l'exposition à ces formes de silice provoquait une irritation des voies aériennes supérieures et pouvait par conséquent causer l'aggravation de pathologies respiratoires préexistantes, telles que l'asthme ou la bronchite chronique (10,13). Néanmoins, ces données ne précisent ni l'origine (naturelle ou synthétique) ni la taille de ces silices amorphes incriminées.

Concernant les silices amorphes naturelles, il a été rapporté un cas clinique de pneumoconiose chez un patient exposé aux diatomites (49). De plus, une étude prospective a suivi 36 sujets travaillant dans des carrières de pierre ponce durant 25 ans en moyenne (de 1999 à 2014). Le type de pneumoconiose spécifiquement causé par l'inhalation de poussières de pierre ponce est appelé liparitose. Les résultats de cette étude ont ainsi permis d'établir une définition de la liparitose sur le plan diagnostique avec la présence de « plaques pleurales » au scanner thoracique selon les auteurs, mais aussi symptomatique (dyspnée, toux et asthénie) (50,51).

Concernant les SAS sous forme nanoparticulaire, quelques études de cohorte prospectives récentes ont été mises en place. La première est une cohorte prospective de travailleurs exposés aux SAS dans 14 usines de nanomatériaux (entre 20 et 100 nm) depuis 2012 à Taïwan (52). Parmi les 227 travailleurs suivis, seuls 37 travailleurs ont été identifiés comme exposés aux SAS seules. Une des conclusions des auteurs sur ces 37 travailleurs a porté sur une diminution plus importante de la fonction respiratoire avec un débit expiratoire maximal

Introduction

État des connaissances chez l'Homme

(DEM) à 25% de la capacité vitale forcée (CVF) plus faible ($p < 0,01$), en comparaison à des salariés non exposés après un suivi à 6 mois (53). Il est à noter que ces statistiques ont été effectuées après un appariement de chaque salarié basé sur l'âge, l'origine ethnique, la consommation de tabac et d'alcool mais aussi la mastication de noix de bétel (coupe-faim très utilisé en Asie provoquant un risque de cancer des voies aériennes supérieures (54). Par ailleurs, une étude transversale rétrospective a inclu 462 travailleurs exposés dans 5 usines allemandes aux SAS précipitées et aux SAS pyrogénées. Il s'agit de la première étude basée sur une quantification de l'exposition spécifique aux SAS. Concernant les résultats, il a été observé qu'une exposition cumulée aux SAS ($10\text{mg}/\text{m}^3$ par an) était faiblement associée à la diminution de la CVF (diminution de 11mL par an, $p < 0,05$) mais n'affecterait pas le volume expiratoire maximal seconde (VEMS) ou le coefficient de Tiffeneau (rapport VEMS/CVF) (55).

En raison du faible nombre d'études épidémiologiques et des données très limitées, le lien de causalité entre l'exposition à la silice amorphe et la survenue de pathologies respiratoires professionnelles reste à préciser. De plus, il est important de noter que dans les cas rapportés de liparitose par exemple, la pierre ponce peut également être contaminée par de la silice cristalline à des taux faibles ($< 5\%$). Par ailleurs, dans la catégorie des SAS nanoparticulaires, d'autres études sont attendues afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle les SAS obtenues par voie thermique seraient plus réactives que les SAS obtenues par voie humide (56).

I.3.2.4 Pathologies tumorales liées à la silice amorphe

Les silices amorphes sont classées dans le groupe 3 du CIRC, soit comme agent cancérogène possible pour l'Homme, à cause du manque de données épidémiologiques et expérimentales.

I.4 Toxicologie *in vivo* et *in vitro* de la silice en fonction de la structure et de la taille

L'objectif de cette revue de la littérature, publiée dans *Nanomaterials* en juillet 2022 et intitulée « Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review » est de réaliser pour la première fois une revue systématique des effets pulmonaires non tumoraux des 4 types de silice selon leur structure (cristalline ou amorphe) et leur taille (micro- ou nanométrique) *in vivo* et *in vitro* (57). La partie ci-après se compose donc d'un résumé des points principaux soulignés dans l'article, ainsi que l'article original en anglais.

I.4.1 Résumé de l'article

Introduction : De nombreuses études expérimentales menées *in vivo* et *in vitro* se sont intéressées à la toxicité pulmonaire des particules de silice. Si anciennement la toxicité de la silice était uniquement basée sur le dogme seul de sa structure cristalline, aujourd'hui de nombreuses études expérimentales *in vivo* et *in vitro* vont dans le sens que certaines NP de silice amorphe présentent une toxicité similaire à celle de la silice cristalline à l'échelle micrométrique (58–60). Cette similitude d'effets pourrait être liée à la désorganisation de la chimie de surface de la silice amorphe, notamment en lien avec la conformation des silanols¹ et des siloxanes² (61–63). Cette revue vise donc à résumer les connaissances actuelles sur les effets pulmonaires non tumoraux de l'exposition à la silice cristalline et amorphe aux échelles micro- et nanométriques.

¹ silanols : désigne un atome de silicium (Si) relié à un groupement hydroxyle (-OH) sous la conformation Si-OH

² siloxanes : désigne des atomes de silicium (Si) sous la conformation Si-O-Si

Méthodologie : Une recherche d'articles par la combinaison des mots-clés « (silice [Titre] OU quartz [Titre] OU nanoquartz [Titre]) ET (poumon OU pulmonaire) ET toxicité ET (particule ou nanoparticule) EXCEPTE (cancer OU tumeur OU génotoxicité) » a été effectuée sur Pubmed sur une période allant de janvier 1980 à décembre 2021. Les articles sur les effets pulmonaires

Introduction

Toxicologie *in vivo* et *in vitro* de la silice en fonction de la structure et de la taille

tumoraux ou génotoxiques de la silice ont été exclus. Au total, 117 articles pertinents ont été retenus (50 études *in vivo*, 47 études *in vitro* et 20 études *in vivo* et *in vitro*).

Résultats : Les effets toxicologiques pulmonaires (non tumoraux) ciblés par cette revue ont été regroupés dans les grandes catégories suivantes : l'inflammation, la fibrose, la mort cellulaire et les mécanismes associés, le stress oxydant, la transition épithelio-mésenchymateuse, la formation de granulomes ainsi que la clairance muco-ciliaire. Une synthèse illustrée de ces résultats retrouvés *in vivo* et *in vitro* pour chaque type de silice est aussi proposée respectivement dans les **Figures 10** et **11**.

Introduction

Toxicologie in vivo et in vitro de la silice en fonction de la structure et de la taille

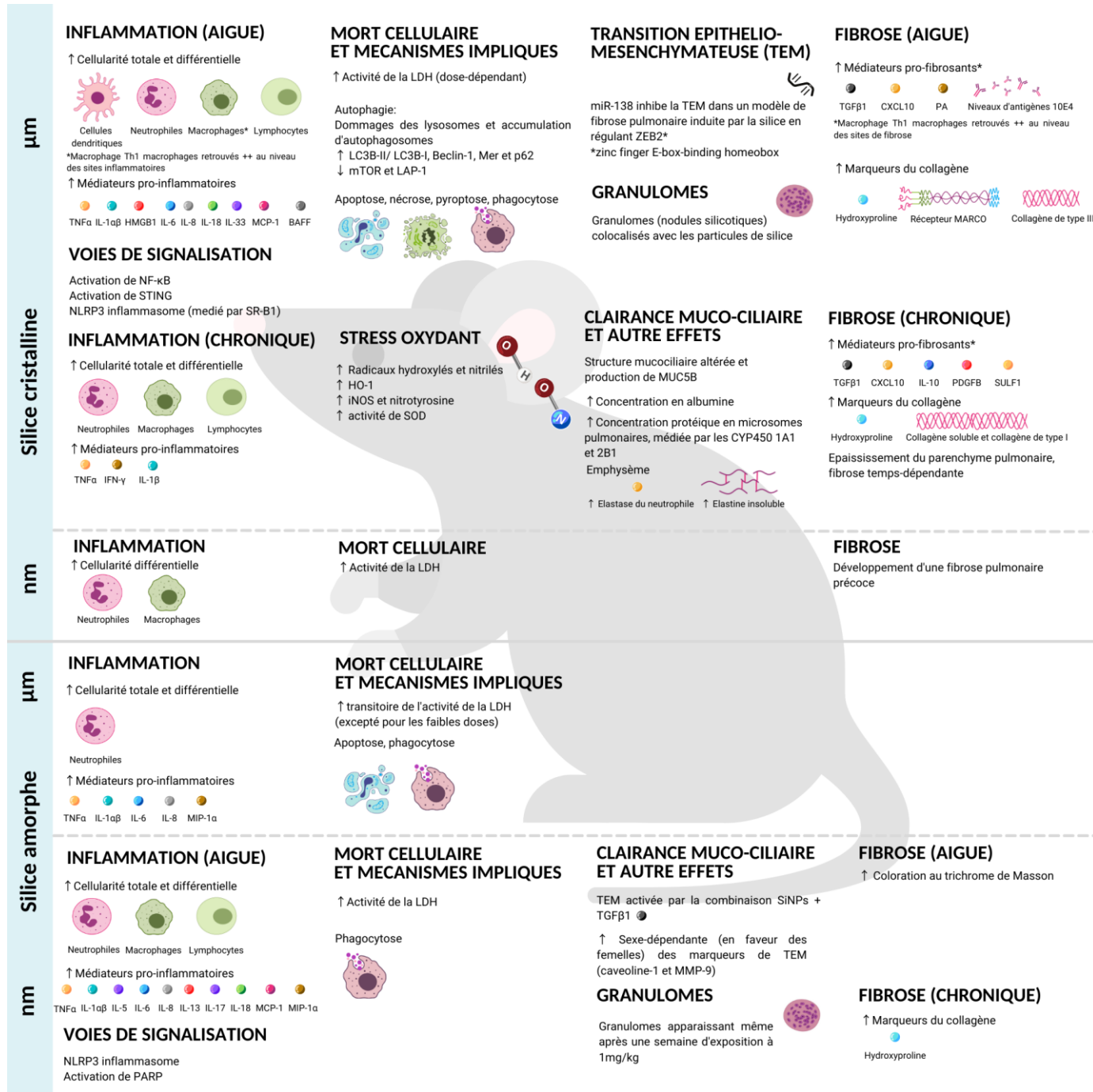


Figure 10 : Synthèse des effets biologiques retrouvés *in vivo* (majoritairement chez les rongeurs, exposés par instillation intra-trachéale ou aspiration oro-pharyngée) pour chaque structure et taille de silice.

Introduction

Toxicologie in vivo et in vitro de la silice en fonction de la structure et de la taille




	EPITHELIALES 	MACROPHAGES 	FIBROBLASTES 
µm	<p>INFLAMMATION ↑ Médiateurs pro-inflammatoires IL-1β HMGB1 IL-6 IL-8 MCP-1</p> <p>VOIES DE SIGNALISATION NLRP3 inflammasome Activation de NAD(P)H</p> <p>FIBROSE ↑ Médiateurs pro-fibroblastes SULF1 FGF-2 bFGF</p> <p>↑ Marqueurs d'épaississement Collagène Fibronectine</p>	<p>INFLAMMATION ↑ Médiateurs pro-inflammatoires TNFα IFN-γ IL-1αβ HMGB1 IL-6 IL-8 IL-13 IL-18</p> <p>VOIES DE SIGNALISATION Activation de NF-κB Activation de COX-2/PGE-2 Activation de STING Activation de PI3K/Akt/mTOR NLRP3 inflammasome</p> <p>↑ Autres marqueurs : ABA, pCREB, AP-1</p>	<p>VOIES DE SIGNALISATION Activation de COX-2/PGE-2</p>
Silice cristalline	<p>MORT CELLULAIRE ET MECANISMES IMPLIQUES ↑ relargage de LDH Apoptose (ERK1/2, SFK et phosphorylation de p38)</p> <p>STRESS OXYDANT ↑ relargage de ROS</p> <p>TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE ↑ marqueurs de TEM (MMP-2, MMP-9, Col-1, Col-3, α-SMA, vimentine) implication de miR-138</p>	<p>FIBROSE ↑ Marqueur pro-fibroblast bFGF (réactivité dépendante de la surface)</p> <p>MORT CELLULAIRE ET MECANISMES IMPLIQUES ↑ relargage de LDH (dose dépendant) Autophagie : ↑ LC3 Apoptose, nécrose, phagocytose</p> <p>STRESS OXYDANT ↑ relargage de ROS (taille-dépendant) co-localisé dans la mitochondrie</p>	<p>FIBROSE ↑ Coloration au trichrome de Masson ↑ Contraction de la matrice</p> <p>TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE ↑ α-SMA</p>
nm	PAS DE DONNEES	PAS DE DONNEES	PAS DE DONNEES
µm	<p>INFLAMMATION ↑ Médiateurs pro-inflammatoires IL-6 IL-8</p> <p>MORT CELLULAIRE ET MECANISMES IMPLIQUES ↑ relargage de LDH</p> <p>STRESS OXYDANT ↑ relargage de ROS ↑ GSH intracellulaire (+ importante en comparaison avec la taille nano)</p>	<p>INFLAMMATION ↑ Médiateurs pro-inflammatoires MIP-1α IL-1αβ MIP-1α</p> <p>VOIES DE SIGNALISATION Activation de COX-2 NLRP3 inflammasome</p> <p>MORT CELLULAIRE ET MECANISMES IMPLIQUES ↑ relargage de LDH (dose-dépendant) Autophagie Apoptose, nécrose, phagocytose</p> <p>STRESS OXYDANT ↑ relargage de ROS (taille-dépendant) co-localisé dans la mitochondrie et dans les phagolysosomes ↑ GSH intracellulaire</p>	<p>VOIES DE SIGNALISATION Activation de COX-2/PGE-2</p>
Silice amorphe	<p>INFLAMMATION ↑ Médiateurs pro-inflammatoires TNFα IL-1αβ IL-6 IL-8 MIP-1α</p> <p>VOIES DE SIGNALISATION Activation de NF-κB Activation de ERK and PARP NLRP3 inflammasome (médié par SR-B1)</p> <p>FIBROSE Co-localisation de SINPs et TGF-β1 dans la membrane ↑ Phosphorylation de Smad2</p> <p>MORT CELLULAIRE ET MECANISMES IMPLIQUES ↑ relargage de LDH (dose-dépendant) Autophagie : dommages des lysosomes et altération du flux autophagique Apoptose (phosphorylation de p38) Phagocytose (via l'activation de NF-κB)</p> <p>STRESS OXYDANT ↑ relargage de ROS (temps et dose-dépendant) ↑ GSH intracellulaire ↑ HO-1 et 8-OHdG ↑ peroxydation lipidique et dysfonction mitochondriale</p> <p>TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE ↑ vimentine (+ incubation avec TGF-β1)</p> <p>CLAIRANCE MUCO-CILIAIRE ↓ Fréquence des battements ciliaires</p>	<p>INFLAMMATION ↑ Médiateurs pro-inflammatoires TNFα IL-1αβ IL-8 MIP-1α</p> <p>VOIES DE SIGNALISATION Activation de NF-κB NLRP3 inflammasome</p> <p>FIBROSE ↑ Médiateurs pro-fibroblastes* TGFβ1 *Macrophages Th2 favorise l'internalisation de SINPs</p> <p>MORT CELLULAIRE ET MECANISMES IMPLIQUES ↑ relargage de LDH (temps et dose-dépendant) Autophagie Apoptose, nécrose, phagocytose</p> <p>STRESS OXYDANT ↑ relargage de ROS (dose-dépendant) dans le compartiment endosomal</p>	<p>INFLAMMATION SERPINB2 identifiée comme un potentiel biomarqueur de la réponse inflammatoire</p> <p>FIBROSIS SERPINB2 identifiée comme un potentiel biomarqueur de la fibrose ↑ Marqueurs du collagène Hydroxyproline Collagène de type I</p> <p>MORT CELLULAIRE ET MECANISMES IMPLIQUES ↓ Viabilité cellulaire (taille-dépendante) Apoptose</p> <p>STRESS OXYDANT Pas de différence dans la formation de ROS</p> <p>TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE ↑ α-SMA</p>
nm			

Figure 11 : Synthèse des effets biologiques retrouvés *in vitro* sur 3 populations cellulaires pulmonaires (cellules épithéliales, macrophages et fibroblastes) pour chaque structure et taille de silice.

Introduction

Toxicologie *in vivo* et *in vitro* de la silice en fonction de la structure et de la taille

Discussion : Cette revue systématique de la littérature sur les effets respiratoires de la silice cristalline ou amorphe à l'échelle micro- ou nanométrique, permet de s'interroger sur plusieurs points de discussion.

Le premier concerne celui de la pertinence de la dose employée dans une étude. En effet, la toxicité de la silice pouvant être liée à l'importance de la dose inhalée, la notion de la pertinence de la dose employée dans une étude expérimentale *in vivo* ou *in vitro* s'avère être un élément déterminant. En effet, dans la majorité des études, les doses employées étaient particulièrement élevées et difficilement extrapolables à la réalité des niveaux de concentration inhalés par l'Homme en vie réelle, avec un facteur allant de 1,2 à 30.

Le second point est celui de l'absence de prise en compte d'un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques. En effet, en dehors de la structure ou de la taille, d'autres caractéristiques physico-chimiques, comme la porosité, la forme, la chimie de surface et la présence d'impuretés, sont rarement considérées pour expliquer la toxicité des échantillons de silice employés dans ces études.

Enfin, les particules de silice étant majoritairement émises de manière anthropique, il est important de souligner que le procédé d'émission des particules de silice peut influencer sa toxicité. En effet, des particules fraîchement émises seraient plus réactives que leurs formes vieilles ce qui laisse suggérer un nouvel élément à prendre en compte pour la toxicité pulmonaire de la silice (64).

Conclusion : Cette revue de la littérature apporte pour la première fois une comparaison des effets toxicologiques pulmonaires des différents types de silice en fonction de leur taille et de leur structure, avec une nouvelle perception de leurs effets toxicologiques respectifs. Si certains éléments permettent de confirmer qu'indépendamment de la taille, les structures cristallines ou amorphes ont des mécanismes de toxicité apparaissant relativement similaires, d'autres éléments viennent souligner la nécessité d'obtenir une meilleure caractérisation physico-chimique (notamment basée sur l'analyse des silanols présents à la surface des particules et la présence d'impuretés) et de tenir compte également des procédés de synthèse pour les silices néosynthétisées.

I.4.2 Extrait de «Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review».



Review

Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review

Vanessa Marques Da Silva ¹, Manon Benjdir ¹, Pierrick Montagne ¹, Jean-Claude Pairon ^{1,2}, Sophie Lanone ¹ and Pascal Andujar ^{1,2,*}

¹ University Paris Est Créteil, INSERM, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, F-94010 Créteil, France; vanessa.marques-da-silva@inserm.fr (V.M.D.S.); manonbn@gmail.com (M.B.);

montagnepierrick@gmail.com (P.M.); jc.pairon@chicreteil.fr (J.-C.P.); sophie.lanone@inserm.fr (S.L.)

² Hôpital Intercommunal de Créteil, Service de Pathologies Professionnelles et de l'Environnement, F-94010 Créteil, France

* Correspondence: pascal.andujar@chicreteil.fr; Tel.: +33-1-57-02-20-95

Abstract: Silicon dioxide (SiO₂) is a mineral compound present in the Earth's crust in two mineral forms: crystalline and amorphous. Based on epidemiological and/or biological evidence, the pulmonary effects of crystalline silica are considered well understood, with the development of silicosis, emphysema, chronic bronchitis, or chronic obstructive pulmonary disease. The structure and capacity to trigger oxidative stress are recognized as relevant determinants in crystalline silica's toxicity. In contrast, natural amorphous silica was long considered nontoxic, and was often used as a negative control in experimental studies. However, as manufactured amorphous silica nanoparticles (or nanosilica or SiNP) are becoming widely used in industrial applications, these paradigms must now be reconsidered at the nanoscale (<100 nm). Indeed, recent experimental studies appear to point towards significant toxicity of manufactured amorphous silica nanoparticles similar to that of micro-metric crystalline silica. In this article, we present an extensive review of the nontumoral pulmonary effects of silica based on in vitro and in vivo experimental studies. The findings of this review are presented both for micro- and nanoscale particles, but also based on the crystalline structure of the silica particles.

Keywords: silica; silicon dioxide; amorphous silica; crystalline silica; quartz; nanoparticles; particles; lung; toxicity; experimental studies



Citation: Marques Da Silva, V.; Benjdir, M.; Montagne, P.; Pairon, J.-C.; Lanone, S.; Andujar, P. Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 2392. <https://doi.org/10.3390/nano12142392>

Academic Editor: Antti Joonas Koivisto

Received: 7 June 2022
Accepted: 11 July 2022
Published: 13 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Silica is the common name given to materials composed of silicon dioxide (SiO₂), which exist in crystalline (including α - and β -quartz, cristobalite, and tridymite) or amorphous forms [1]. Upon heating, α -quartz is transformed into β -quartz, tridymite, and cristobalite. Quartz is the most common form of crystalline silica and exists in both natural and synthetic forms (notably the porous synthetic crystalline silica family, porosil). Amorphous silica can be subdivided according to its natural (e.g., diatomaceous earth) or anthropic origins (e.g., fumed or precipitated silica). The toxicity of silica has been linked to its crystallinity and capacity to generate free radicals. Occupational exposure of miners and construction workers to micrometric crystalline silica particles (0.5–10 μ m) has been extensively studied. This exposure is associated with an increased risk of developing lung diseases such as silicosis (pneumoconiosis characterized by interstitial lung inflammation and fibrotic granuloma, also known as silicotic nodules), chronic bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, pulmonary tuberculosis, and even lung cancer in some studies [2–4]. Extrapulmonary diseases, such as rheumatoid arthritis or systemic sclerosis, have also been associated with exposure to crystalline silica [5]. In contrast, until now, naturally occurring amorphous micrometric silica has generally been considered less harmful because of its structure [6,7]. Some studies reported pneumoconiosis among

diatomaceous earth workers, but these cases were due to contamination of amorphous silica with crystalline silica [6,8]. This contamination is therefore a major problem when attempting to assess the toxic effects of amorphous micrometric silica [6].

The advent of nanotechnology now makes it possible to produce manufactured amorphous silica nanoparticles (NPs) (<100 nm) in various forms without any crystalline silica contamination. These synthetic forms of amorphous silica may be classified based on the processes used to produce them: wet processes (colloidal silica, precipitated silica, or silica gel), thermal processes (pyrogenic silica, silica fumes, fused silica), and chemically or physically surface-modified silica (e.g., mesoporous silica) (Figure 1). In line with their distinct physicochemical properties, manufactured amorphous silica NPs are used in a variety of products. For example, these engineered nanomaterials are incorporated as fillers in paints, rubber (e.g., in tires), as anticaking agents in powdered materials, or as additives in animal and human food, agrochemical products, toothpastes, silicones (e.g., in hair conditioners), building materials (e.g., in insulation, coatings and adhesives), printing inks or cosmetics [9]. Some in vivo and in vitro experimental studies seem to suggest that amorphous silica NPs display similar toxicity to micrometric crystalline silica [10]. This similarity in effects may be linked to the extensive involvement of surface chemistry (i.e., the conformation of silanols and siloxanes). This hypothesis partly overturns the old dogma relating to silica toxicity that was solely based on its crystalline structure [9,11,12]. With this review, we aim to summarize current knowledge on the nontumoral lung effects of exposure to crystalline and amorphous silica at micro- and nanometric scales.

Synthetic amorphous Silica: principal synthesis processes						
Wet processes			Thermal processes			Chemical or physical modification processes
Colloidal silica, obtained by Na_2SiO_3 + cation exchange resin or Stöber method or microemulsion method	Precipitated silica, obtained by Na_2SiO_3 (pH > 7) + acid solution	Silica gel, obtained by Na_2SiO_3 (pH < 7) + acid solution	Fumed (pyrogenic) silica, obtained by SiCl_4 hydrolysis (1000 °C)	Silica fumes, subproduct of metallurgy industry	Fused silica obtained by electric arc process (1800–2100 °C)	Surface modifications, surfactant addition
e.g., A2000, Ludox, Stöber silica	e.g., Agrosil, Zeofree, Zeosil	e.g., Aerogel, Xerogel	e.g., Aerosil, Cab-O-Sil, HDK	e.g., Microsilica	e.g., Silica glass (amorphous)	e.g., Mesoporous silica

Figure 1. Processes by which amorphous silica is synthesized.

2. Materials and Methods

2.1. Search Strategy

English-language papers published from 1 January 1980 to 31 December 2021 were identified through the MEDLINE database <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/> (accessed on 31 January 2022). The following keyword combination was used: "(silica [Title] OR quartz [Title] OR nanoquartz [Title]) AND (lung OR pulmonary) AND toxicity AND (particle OR nanoparticle) NOT (cancer OR tumor OR genotoxicity) NOT review. We also used these following filters: "Full text—English" (Figure 2).

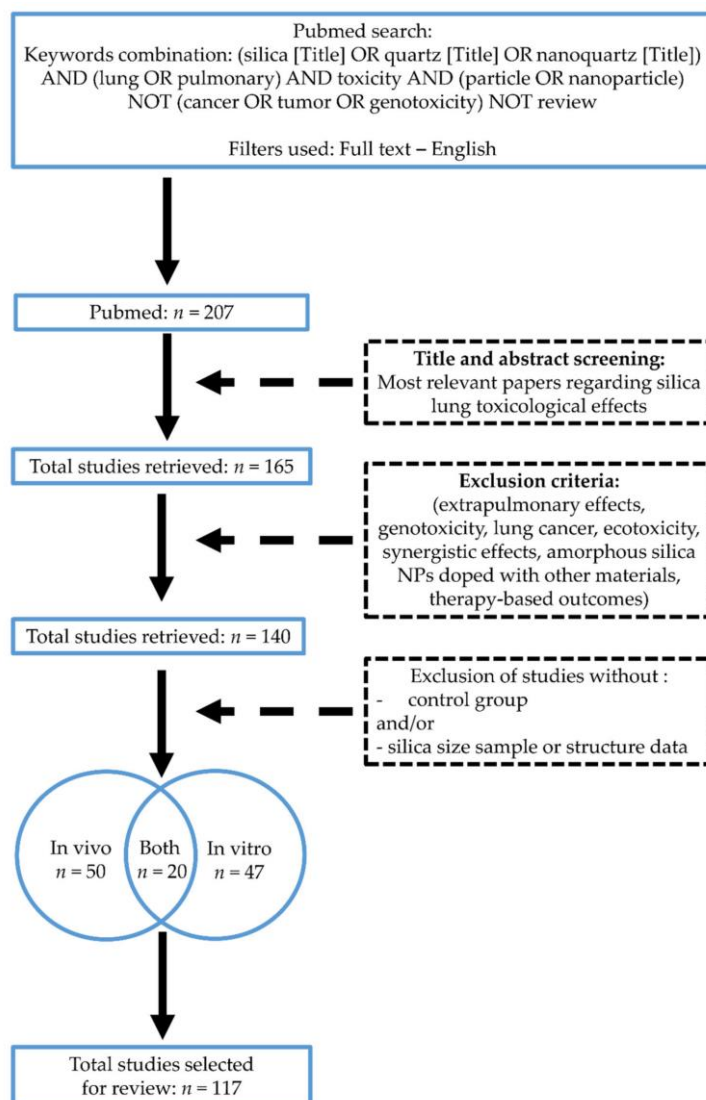


Figure 2. Article-selection flow chart.

2.2. Selection Criteria

The selection criteria applied to the articles identified were as follows, the article had to present: (a) a detailed description of the physicochemical characteristics of the silica used, such as primary size, composition, and crystallinity; (b) toxicological endpoints for in vitro experimental studies, such as inflammation, cytotoxicity, apoptosis, necrosis and/or autophagy, oxidative stress, and immunotoxicity using immortalized cell lines or primary cells; and/or (c) toxic effects in laboratory animals specifically relating to in vivo experiments using rodents. From each paper selected, we extracted the information relating to the physicochemical characteristics of silica, the type of cellular or animal model, and

the toxicological endpoints (Tables S1–S7). The main micrometric crystalline silica particles used are quartz particles [e.g., Min-U-Sil from U.S. Silica Corporation or Pennsylvania Glass Sand Corporation (Katy, TX, USA)], S5631 from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), DQ-12 from DMT GmbH and Co (Essen, Germany), IUF Dusseldorf, Institute for Occupational Safety and Health of German Social Accident Insurance, Dorentruper Sand und Thonwerke GmbH of Dorentrup, Crystalline Dowson and Dobson quartz (generous gift from Dr. J.H. Bachmann, Johannesburg, South Africa), α -quartz (such as Sikron F600 from National Institute of Occupational Health or Poison Control, Beijing, China), Norquartz-45 from Glamsland, Norway, or freshly or aged fractured quartz from Generic Respirable Dust Technology Center, USA]. The other type of micrometric crystalline silica particles used is α -cristobalite (from C&E Mineral Corporation, King of Prussia, PA, USA). The only nanometric crystalline silica particle used is hydrothermally synthesized nanoquartz. For amorphous silica, the main micrometric particles used are colloidal silica (e.g., fine colloidal silica from Fuso Chemical Corporation, Osaka, Japan), precipitated silica (e.g., Zeofree80 from JM Huber Corporation, Edison, NJ, USA), fumed silica (e.g., Aerosil from Sigma), or modified surface particles. As described in Figure 1, the main nanometric amorphous silica particles used are precipitated silica (e.g., Pre20), colloidal silica (e.g., NexSil20 from Nyacol Nano Technologies, Ashland, MA, USA, SM30 or TM-40 Ludox from Sigma-Aldrich, ultrafine colloidal silica from Fuso Chemical Corporation, Col15 and Col40/80), fumed silica (pyrogenic) (e.g., Aerosil from Degussa, Francfort, Germany or Sigma-Aldrich, Pyr20 or Pyr25/70), or mesoporous SiNPs (from NanoAmor, Houston, TX, USA or Sigma).

2.3. Exclusion Criteria

To specifically focus on nontumoral adverse pulmonary effects linked to silica, papers reporting on other aspects such as extrapulmonary effects, genotoxicity, lung cancer, ecotoxicity, synergistic effects, amorphous silica NPs doped with other materials, and therapy-based outcomes were excluded [13]. We also excluded articles that did not include a control group.

2.4. Selection of Papers for Review

We thus examined in three stages the papers returned by these searches (Figure 2). The first step retrieved 207 articles after application of the previously defined keyword combinations and filters. The second step involved screening the title and abstract of each article to identify the studies that best matched our search terms; 165 relevant papers were retained. The third step was a full analysis of each article. During this step, the exclusion criteria applied to 25 articles. Any papers for which suitability was unclear during the second or third step were discussed by P. Andujar and V. Marques Da Silva until a consensus was reached. Finally, 117 articles reporting a minimal set of physicochemical characterization methods and toxic effects with control groups were retained for this review. The distribution was as follows: 50 articles reporting in vivo experimental studies, 47 articles presenting in vitro studies, and 20 articles including both in vivo and in vitro results.

3. Experimental Designs

3.1. In Vivo Experimental Studies in Rodents

In vivo experimental studies have mainly been conducted in rodent models (generally wild-type, but also transgenic, rats, mice or Syrian hamsters). Tables S1–S4 summarize the in vivo experimental studies that have been performed with each type of silica. Tables are organized by exposure route (whole-body inhalation, nose-only inhalation, intratracheal instillation, oropharyngeal aspiration, or intranasal instillation). The associated bullet lists summarize doses administered and exposure duration for each exposure route.

Referring to the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) guidelines [14], acute studies last less than 24 h; acute studies in rats investigating whole-body inhalation exposure generally last 4 h, or 6 h for nose-only exposure. Repeated exposure can be used to investigate adverse effects following daily or 5 times per week

inhalation exposure to a chemical substance. Subacute and subchronic studies last at least 28 or 90 days, respectively (the latter covers approximately 10% of the lifespan of a rat) [14]. Thus, acute, subacute, subchronic, or chronic studies involve a range of durations: less than one day; from 2 to 28 days; from 29 to 90 days; and more than 90 days, respectively.

- **Micrometric Crystalline Silica**

In whole-body inhalation studies with micrometric crystalline silica, rodents were exposed to repeated high or very high doses, ranging from 6.2 to 100 mg/m³, over 10 to 90 days, generally for 6 h per day [15–20]. In contrast, in “nose-only” inhalation studies, rats were exposed to repeated doses of 15 mg/m³ for 21 to 59 days, also for 6 h per day [21,22]. Intratracheal instillations have mostly been performed as a single administration in animals, with cumulated doses ranging from 0.01 to 640 mg/kg, with observation timepoints covering the full range (acute, subacute or subchronic, or chronic) [23–48]. Oropharyngeal aspirations in mice were also mostly performed as a single administration of a very high dose (cumulated doses from 40 to 160 mg/kg), but only acute observation timepoints (1 to 56 days) were reported [49–52].

- **Nanometric Crystalline Silica**

In the only study we identified using nanoquartz [46], rats were exposed intratracheally with a single administration of between 1 and 5 mg/kg. Observation timepoints were acute or subchronic (from 1 to 90 days).

- **Micrometric Amorphous Silica**

In whole-body inhalation studies with micrometric amorphous silica, rats were exposed to repeated doses ranging from 10 to 150 mg/m³ over 10 to 90 days, for 6 h per day [20]. Intratracheal instillations were performed mainly as a single dose (0.03 to 150 mg/kg) in rodents [38,53–58]. Single-dose oropharyngeal aspirations (1.6 to 10 mg/kg) were administered to mice [54,59].

- **Nanometric Amorphous Silica**

In whole-body inhalation studies with nanometric amorphous silica, rats were exposed to repeated high or very high doses, from 10 to 150 mg/m³, over 10 to 90 days, for 6 h per day [60]. In “nose-only” inhalation studies, rats were exposed to ambient doses between 2.6 and 27 mg/m³, for 4 or 6 h per day, with observation timepoints covering the full range [26,43]. Intratracheal instillations in rodents were performed mainly as a single 0.02 to 160 mg/kg dose, and observation timepoints once again covered the full range (acute, subacute, subchronic, or chronic) [38,43,53–57,61–68].

3.2. In Vitro Experimental Studies

Tables S5–S7 summarize all the in vitro studies reviewed for each type of silica. Tables are organized by cell type (bronchial epithelial cell, macrophage, fibroblast) and species (e.g., human or rodent cells). Few reports presenting coculture results were found. As indicated above, no study relating to crystalline silica NPs was identified according to our criteria.

4. Biological Effects of Micro- and Nanometric Crystalline or Amorphous Silica

Table 1 (in vivo studies) and Table 2 (in vitro studies) summarize the biological effects according to the crystalline nature and size of silica particles implemented. Supplementary Tables S1–S7 present the biological effects reported in each article retained for review.

Introduction

Toxicologie in vivo et in vitro de la silice en fonction de la structure et de la taille

Table 1. Summary of results in vivo studies in mice and rats.

Silica Types	Type of Effects	Inflammation	Fibrosis	Cell Death and Linked Mechanisms	Oxidative Stress	Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT)	Granulomas	Muco-Ciliary Clearance and Other Effects
Crystalline, micrometric size	Acute (and subacute)	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ total cell count (neutrophils, macrophages, dendritic cells, lymphocytes) – ↑ proteins (TNFα, IL-1α, β, HMGB1, IL-6, IL-8, IL-18, IL-33, MCP-1, BAFF) – NLRP3 inflammasome + STING pathways – SR-B1 is a silica receptor mediating inflammasome activation – M1 macrophages dominant at inflammatory sites 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ profibrotic markers (TGFβ1, CXCL10, PA, 10E4 antigen levels) – ↑ collagen markers (hydroxyprolin, MARCO receptor, collagen III) – M2 macrophages dominant at fibrotic sites – ↓ miR-158 in fibrotic lung tissues 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ LDH activity (dose-dependent) – cell death by apoptosis, pyroptosis, necrosis, autophagy * – other cell defense mechanisms: phagocytosis – lysosome damage and autophagosome accumulation – ↑ LC3B-II/LC3B-I, Beclin-1, Mer, and P62 – ↓ mTOR and LAP-1 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ hydroxyl and nitric radicals – ↑ HO-1 – ↑ SOD activity – ↑ iNOS and nitrotyrosine (localized in granulomatous regions and BALT) – NF-κB activation 	<ul style="list-style-type: none"> – miR-158 inhibits EMT in silica-induced pulmonary fibrosis by regulating ZEB2 (zinc finger E-box-binding homeobox) 	<ul style="list-style-type: none"> – granulomas (silicotic nodules) colocalized with silica – emphysema (↑neutrophil elastase and insoluble elastin) – ↑iNOS and nitrotyrosine (localized in granulomatous regions and BALT) 	<ul style="list-style-type: none"> – impaired muco-ciliary structure and MUC5B production – ↓albumin concentration – ↑lung microvascular protein concentration (mediated by CYP4501A1 and 2B1)
	Chronic (and subchronic)	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ total cell count (neutrophils size-dependent, macrophages, lymphocytes CD4 CD80) – ↑ proteins (TNFα, IFNγ, IL-1β) – NLRP3 inflammasome + STING pathway 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ profibrotic markers (TGFβ1, CXCL10, IL-10, PDGFB, SULF1) – ↑ collagen markers (hydroxyprolin, soluble collagen, type I collagen) – lung tissue thickening, time-dependent fibrosis 	No data	No data	No data	No data	No data
Crystalline, micrometric size	Acute (and subacute)	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ macrophages accumulation 	<ul style="list-style-type: none"> – early pulmonary fibrosis development 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ LDH activity 	No data	No data	No data	No data
	Chronic (and subchronic)	No data	No data	No data	No data	No data	No data	
Amorphous, micrometric size	Acute (and subacute)	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ total cell count (neutrophils) – ↑ proteins (TNFα, IL-1α, β, IL-6, IL-8, MIP-1α, MIP-2) – less severity compared with NPs 	No data	<ul style="list-style-type: none"> – transient increase in LDH activity (not occurring at low doses) – cell death by apoptosis – other cell defense mechanisms: phagocytosis 	No data	No data	No data	No data
	Chronic (and subchronic)	No data	No data	No data	No data	No data	No data	
Amorphous, nanometric size	Acute (and subacute)	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ total cell count (neutrophils size-dependent, macrophages, lymphocytes) – ↑ proteins (TNFα, IL-1α, β, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17a, IL-18, MCP-1, MIP1α) – NLRP3 inflammasome – PARP pathway 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ Masson's trichrome staining 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ LDH activity – other cell defense mechanisms: phagocytosis 	No data	<ul style="list-style-type: none"> – EMT activated by nanosilica + TGFβ1 – ↑ sex dependent (higher in females) of EMT markers (caveolin-1 and MMP-9) 	<ul style="list-style-type: none"> – granulomas appearing even after 1 week of exposure to 1 mg/kg 	No data
	Chronic (and subchronic)	No data	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ dose-dependent collagen markers (hydroxyprolin) 	No data	No data	No data	No data	

Note: * Autophagy: cellular process that allows the degradation of cytoplasmic components such as damaged or unwanted proteins or organelles after their capture in a double lipid membrane—the autophagosome; Phagocytosis: a critical mechanism through which innate immune cells eliminate microbes, necrotic or apoptotic cells, and mineral particles.

Introduction

Toxicologie in vivo et in vitro de la silice en fonction de la structure et de la taille

Table 2. Summary of results in vitro studies in epithelial cells, macrophages, and fibroblasts.

Silica	Inflammation	Fibrosis	Cell Death and Linked Mechanisms	Oxidative Stress	Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT)	Muco-Ciliary Clearance and Other Effects	Type of Cells
Crystalline, micrometric size	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ proinflammatory markers (IL-1β, HMGB1, IL-6, IL-8, MCP-1) – NLRP3 inflammasome pathway 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ profibrotic markers (SULFI, FGF-2, bFGF) – ↑ thickening markers (collagen and fibronectin) 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ LDH release – Cell death by apoptosis (ERK1/2, SFK and p38 phosphorylation) 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ ROS release – NAD(P)H pathway 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ EMT markers (MMP-2, MMP-9, Col-1, Col-3, α-SMA, vimentin) – miR-138 inhibits EMT in silica-induced pulmonary fibrosis by regulating ZEB2 (zinc finger E-box-binding homeobox) 	No data	Epithelial
	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ proinflammatory markers (TNF-α, IFN-γ, caspase-1, IL-1α β, HMGB1, IL-6, IL-8, IL-13, IL-18) – ↑ other molecules (ABA, pCREB, AP-1) – NLRP3 inflammasome + STING + cyclooxygenase (↑ COX-2)-prostaglandin (↑ PGE2) pathways 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ profibrotic marker bFGF (surface-reactivity dependent) – TGF-β activated kinase (TAK) involved in silica-mediated COX-2 expression 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ LDH release (dose dependent) – cell death by apoptosis, necrosis, autophagy * – other cell defense mechanisms: phagocytosis * – ↑ LC3, PI3K/Akt/mTOR pathway 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ ROS release (size dependent) colocalized in mitochondria – nuclear translocation of NF-κB (binding site in COX-2 promoter) – NF-κB inducing kinase (NIK) involved in silica-mediated COX-2 expression 	No data	No data	Macrophage
	<ul style="list-style-type: none"> – activation of cyclooxygenase-prostaglandin pathway 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ fibrosis parameters (Masson's trichrome staining, α-SMA, matrix contraction) 	No data	No data	No data	No data	Fibroblast
Amorphous, micrometric size	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ proinflammatory markers (IL-6, IL-8) 	No data	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ LDH release 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ ROS release and intracellular GSH (higher compared to nanosize) 	No data	No data	Epithelial
	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ proinflammatory markers (TNF-α, IL-1α β, MIP-1α) – NLRP3 inflammasome + cyclooxygenase (↑ COX-2) pathways 	No data	<ul style="list-style-type: none"> – cell death by apoptosis, necrosis, autophagy + Ca²⁺ pathway – other cell defense mechanisms: phagocytosis 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ ROS release colocalized in mitochondria and phagolysosomes and intracellular GSH – ↑ K⁺ efflux 	No data	No data	Macrophage
	<ul style="list-style-type: none"> – activation of cyclooxygenase-prostaglandin pathway 	No data	No data	No data	No data	No data	Fibroblast
Amorphous, nanometric size	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ proinflammatory markers (TNF-α, CXCL1, IL-1α β, IL-6, IL-8, MIP-1α β) – NLRP3 inflammasome + PARP pathways – SR-B1 is a silica receptor-mediated inflammasome activation 	<ul style="list-style-type: none"> – colocalization of silica and TGF-β1 in cell membrane – ↑ phosphorylation of Smad2 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ LDH release (dose dependent, not occurring at low doses) – cell death by apoptosis (p38 phosphorylation), autophagy – other cell defense mechanisms: phagocytosis through NF-κB activation – lysosome damage and impairment in autophagic flux 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ ROS release (time and dose dependent), lipid peroxidation and intracellular GSH – ↑ HO-1 and 8-OHdG – mitochondrial dysfunction – downregulation of NRF-2 signaling – phosphorylation of MAPKs (p38 and JNK) and p65 – ERK pathway 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ EMT marker vimentin (incubation with TGF-β1) 	<ul style="list-style-type: none"> – ↓ ciliary beat frequency 	Epithelial
	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ proinflammatory markers (TNF-α, caspase-1, IL-1α β, IL-8, MIP-1α) – NLRP3 inflammasome pathway 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ profibrotic marker TGF-β – M2 macrophages promotes NPs internalization 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ LDH release (time and dose-dependent, only with highest doses) – cell death by apoptosis, autophagy – other cell defense mechanisms: phagocytosis 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ ROS release (dose-dependent, in endosomal compartment) – NF-κB activation 	No data	No data	Macrophage
	<ul style="list-style-type: none"> – SERPINB2 (plasminogen activator inhibitor 2) protein identified as a potential biomarker of inflammatory responses 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ collagen markers (hydroxyprolin, type I collagen) – SERPINB2 protein identified as a potential biomarker of fibrosis 	<ul style="list-style-type: none"> – ↓ cell viability (size dependent) – cell death by apoptosis 	<ul style="list-style-type: none"> – no difference in ROS formation 	<ul style="list-style-type: none"> – ↑ EMT markers (α-SMA) 	No data	Fibroblast

Note: * Autophagy: cellular process that allows the degradation of cytoplasmic components such as damaged or unwanted proteins or organelles after their capture in a double lipid membrane—the autophagosome; Phagocytosis: a critical mechanism through which innate immune cells eliminate microbes, necrotic or apoptotic cells, and mineral particles.

4.1. Acute and Chronic Inflammation

Inflammation is an immune response under the control of multiple regulatory systems; it is generally triggered in reaction to an exogenous or endogenous aggression. Inflammation is part of the natural immune response to a danger signal, and subsequently promotes the induction of a specific immune response. If the inflammatory response is inadequate or poorly controlled, it can become aggressive.

- Micrometric Crystalline Silica and Inflammation

Micrometric crystalline silica particles induce lung inflammation—triggering expression of numerous inflammatory markers and increased total cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) [17,25,29,30,37,38,40,41,43,44,47,51], and activating inflammatory cell recruitment. In terms of cellular profile, significant increases in total phagocytic cells, such as neutrophils and alveolar macrophages, are reported [17,19,24,27,29,33,37,38,40,41,43,44,47,51,69]. These observations are confirmed in histological analyses, with significant recruitment of neutrophils and alveolar macrophages to the alveolar area [23]. Some studies also report a significant increase in dendritic cells [44] and lymphocytes in BALF [29,40]. Activation of cellular cytolysis has been reported based on multiple markers, such as increased lactate dehydrogenase (LDH) activity and elevated serum albumin concentrations [70]. In addition, analyses of protein expression revealed a significant increase in total protein levels, confirming an acute and subchronic inflammatory status [24,25,27,29,32,37,41,47,51]. Cytokine expression profiling, as analyzed by ELISA, Western blot, or flow cytometry, revealed increased levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- α (tumor necrosis factor) [27,37,44,70], IL-1 α (interleukin) [38], IL-1 β [38], IL-6 [44], IL-18 [51], IL-33 [38], KC (keratinocyte chemoattractant) [37], MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2) [70], and HMGB1 (high-mobility group box 1) [51]. Alveolar macrophages were shown to release proinflammatory cytokines, increasing vascular permeability and leading to the recruitment of inflammatory cells [37,38,44,51]. In rats exposed to micrometric crystalline silica, the recruitment of neutrophils to acutely inflamed alveolar regions involves several cytokines, including IL-1 β , TNF- α , and KC (CXCL1 cytokine of the chemokine CXC motif ligand family) [58]. Cell types producing cytokines include macrophages, neutrophils, or epithelial cells [58]. Moreover, expression of the genes coding for IFN- γ (Interferon), IFN- α/β , and CXCL10 (or interferon- γ induced protein 10, IP-10) is reported to increase after exposure to micrometric crystalline silica [28,31]. According to the literature, CXCL10 is secreted by several cell types, such as monocytes, endothelial cells and fibroblasts, in response to IFN- γ . Several roles have been attributed to CXCL10, including acting as a chemoattractant for monocytes/macrophages.

Chronic inflammation was also investigated at timepoints ranging from 90 to 180 days in several in vivo studies involving single- or repeated-exposures. Exposure for more than 3 months to micrometric crystalline silica induces a significant increase in total cell count in BALF [29,47]. The specific cell types recruited were essentially neutrophils and macrophages [20,21,26,29,39,47], whereas CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes were reported elsewhere [26,29]. Increased infiltration of inflammatory cells following exposure for more than 3 months is also observed histologically [44], along with larger type II epithelial cells [16]. Specific observations linked dose-dependent lung inflammation to accumulation of cells in the terminal respiratory tissue [16], in particular neutrophils [39,45] and foamy multinucleated alveolar macrophages [45]. In addition to the cellular profile, a significant increase in total protein levels is also reported for exposure regimes exceeding 3 months [29,37,47,51]. The increase appeared to be dose dependent in one study [26]. The types of proteins increased are mainly proinflammatory markers such as TNF- α [27,28,71], IFN- γ [26,28], and IL-1 β [28,71].

In vitro experiments with human or rodent primary cells or cell lines confirm the presence of high levels of proinflammatory proteins or mRNA after exposure to micrometric crystalline silica (cristobalite or quartz). In human and rodent epithelial cell lines, exposure to micrometric crystalline silica particles also significantly increased proinflammatory

markers such as IL-1 β and HMGB1 (in a surface-reactivity-dependent manner) [35], and IL-6 [72,73]. Other studies reported increased IL-8 levels [73–75], which were potentially directly correlated with increases in IL-1 β [76], MCP-1 [77], and MIP-2 [70,74,77]. Only one article reported no significant increase in mRNA expression levels of IL-1 α , IL-1 β , and IL-6 in the human bronchial epithelial cell line 16HBE following incubation with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ silica [72]. Human and rodent macrophages exposed to cristobalite or quartz also significantly increased their production of proinflammatory markers including IL-1 α [38], IL-1 β [51,78], HMGB1 (in a surface-reactivity-dependent manner) [35], IL-6 [78], IL-8 (potentially directly correlated with the increase in IL-1 β) [76], IL-13 [31], BAFF (B cell activator factor) [69], and IL-18 [51]. TNF- α production also increased [70,78], to a more significant extent with smaller (300 nm) particles [79].

The NF- κ B (nuclear factor-kappa B) family of transcription factors is activated in response to a variety of stimuli and is known to be one of the multiple regulators of several genes encoding inflammatory proteins. TNF-family cytokines activate NF- κ B signaling pathways. Magnone and colleagues [80] showed that abscisic acid (ABA) and lanC-like protein 2 (LANCL2) are key mediators in quartz-induced inflammation. These two mediators are induced in murine RAW264.7 macrophages and in rat alveolar macrophages. Autocrine ABA released after quartz exposure sequentially activates the plasma membrane receptor LANCL2 and NADPH oxidase, triggering Ca $^{2+}$ influx resulting in NF- κ B nuclear translocation and significant release of both TNF- α and PGE2. Macrophages silenced for LANCL2 or preincubated with a monoclonal antibody binding ABA show almost no NF- κ B nuclear translocation, or TNF- α and PGE2 release, in response to quartz exposure [80]. Moreover, after micrometric crystalline silica exposure, NF- κ B regulates inducible PGE2 synthase expression.

The COX-2/PGE-2 arachidonic acid metabolism pathway has also been investigated in primary human lung fibroblast cultures. Micrometric crystalline silica particles (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induce activation of the COX-2 and PGE-2 pathways. Indeed, a significant increase in COX-2 gene and protein expression is observed alongside (dose-dependent) increased expression of the proteins mPGES and PGE2 [81]. Quartz particles also trigger activation of the cyclooxygenase–prostaglandin pathway in human and rat alveolar macrophages. Choi and colleagues [82] suggest that silica activates transcription of the human COX-2 gene through the induction of NF- κ B activity. Moreover, eicosanoid levels measured after silica exposure reveal a significant increase in expression of PGE2 [83,84] and leukotriene B4 [84], but also C4, D4, and E4 expression [83], alongside a significant decrease in thromboxane B2 (TxB2) expression [83,84]. It should be noted that opposite results tend to be reported when surfactant is added with silica [84]. Following incubation with ascorbic acid-treated and untreated quartz, COX-2 and PGE-2 mRNA levels were increased in the murine macrophage cell line RAW264.7, and in rat alveolar macrophages derived from BALF compared to controls [85].

Furthermore, micrometric crystalline silica induces both acute and chronic inflammation in the specific immunodeficient animal model, NMRI mice. Indeed, intratracheal instillation of micrometric crystalline silica in these animals triggers a type 1 immune response, with significant expression of the IL-12 p40 subunit [29], along with a type 2 immune response, with significant increases in IL-4 and IL-13 expression [49] and an augmented IgG1/IgG2a ratio [29,49]. Interestingly, we found only one study reporting a link between inflammation and the animal's sex. Thus, following oropharyngeal exposure of mice to 40 mg/kg silica, inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10) were increased to a greater extent in females compared to males at 7 days post exposure [52]. Following chronic exposure to low concentrations, 8 weeks after the last dose, males were found to be more susceptible to chronic silica-induced lung disorders, such as alveolitis, and showed greater dendritic cell presence compared to females [52].

- Nanometric Crystalline Silica and Inflammation

Following a single intratracheal installation of 5 mg/kg nanoquartz in rats, neutrophil infiltration was detected in BALF until 30 days. High total protein levels were also observed

in BALF 24 h after a single 1 mg/kg dose of nanoquartz, and until 30 days after a single 5 mg/kg dose [46].

- Micrometric Amorphous Silica and Inflammation

As for crystalline microparticles, micrometric amorphous silica induces a significant increase in total cells in BALF from mice instilled with 100 mg/kg of silica [38]. No similar infiltration is observed in rats after instillation of 0.03 mg/kg [55]. In terms of differential cellularity, a significant increase in neutrophil numbers is reported [20,38,54]. In lung tissue sections, this increase is also observed with neutrophilic inflammation in alveoli in mice exposed intratracheally to 120 mg/kg of silica particles [63]. Other observations indicate that 3 days after the last instillation, silica could lead to bronchiolar degeneration or necrosis, with swelling of type II alveolar cells and accumulation of particle-laden alveolar macrophages [63]. In addition to this cellular profile, a significant increase in total protein levels is reported [56]. ELISA-based quantification reveals that the proteins increased mainly correspond to the proinflammatory markers IL-1 α [38], IL-1 β [38], and IL-6 [57].

In vitro studies confirm high levels of proinflammatory proteins or increased mRNA expression following exposure to micrometric amorphous silica, leading to IL-1 α [38] and IL-1 β [86] production by mouse alveolar macrophages, and the release of IL-6 and IL-8 by human pulmonary epithelial cell lines [73,87]. Moreover, amorphous particles more potently induce IL-6 than crystalline silica [73], and the enhanced potency is confirmed for both cytokines when comparing 500 nm particles to 50 nm particles in protocols applying the same total surface area [87].

Very little mention is made in the literature of the effects of micrometric amorphous silica on COX-2/PGE-2, and we found no data on effects on the NF- κ B pathway. However, as for micrometric crystalline silica, micrometric amorphous silica can activate the COX-2/PGE-2 pathway. Increased COX-2 gene and protein expression were observed following exposure to a concentration of 10 μ g/mL. These results lead to the conclusion that micrometric amorphous silica is more potent than crystalline silica [81].

- Nanometric Amorphous Silica and Inflammation

As described for micrometric crystalline and amorphous silica, in vivo experimental studies with nanometric amorphous silica confirm that it also induces a significant increase in total BALF cells [38,43,56,61,62]. Examination of the different cell types in BALF reveals a significant increase in neutrophil [38,43,56,57,62], eosinophil [54], and macrophage and lymphocyte [56] numbers. The neutrophil influx is size dependent (higher upon exposure to smaller particles) [43,54,55]. Histological analyses confirmed severe neutrophilic inflammation in lung tissue [61], localized specifically in alveoli [63] and BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) [56]. The increased macrophage count was also histologically observable—with accumulation of particle-laden alveolar macrophages [63]. Other observations indicated that at 3 days after instillation, silica could lead to a slight thickening of the alveolar septum [56]. This thickening is associated with bronchiolar degeneration, necrosis, and alveolar type II cell swelling. According to Lee and colleagues [60], inhaled particles could also accumulate in peribronchiolar or perivascular BALT. Although only one study reported a significant increase in total protein levels [56], mRNA levels for the proinflammatory markers TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, and MIP-2 were found to be significantly increased in BALF [61]. Increased protein expression was also detected for IL-1 α [38], IL-1 β [38,61], IL-6 [57,61], TNF- α , IL-8, MCP-1, and MIP-2 [61]. These results were all confirmed by in vitro experimental studies. Indeed, after exposure to nanometric amorphous silica, high expression of proinflammatory proteins or mRNA molecules is detected in human and rodent pulmonary epithelial cell lines. Thus, reports indicate significantly increased protein expression for a number of proinflammatory markers such as TNF- α [62,88], CXCL1 [62], IL-6 [62,88,89], IL-8 [88,89], MIP-1 α [88], MIP-1 β [88] and MIP-2 [90], and increased mRNA expression for IL-6 and IL-8 [87,91].

Interestingly, increased IL-6 and IL-8 expression appeared to be size dependent: a higher increase was detected with 10 nm particles compared to 50 nm particles in the human bronchial epithelial cell line BEAS-2B [92].

As for micrometric crystalline or amorphous silica, amorphous nanosilica induces the NF- κ B pathway in human BEAS-2B cells and THP-1 cells (human leukemia monocytic cell), and murine RAW264.7 macrophages [66,87,92–94]. Only one in vivo study examined this pathway [65]; the authors reported no COX-2 effect at 24 h, 7 days, or 30 days after intratracheal instillation in rats (600 μ g nanosilica).

Conclusion on acute and chronic inflammation:

Overall, acute or subacute inflammation is the most studied response to silica exposure. Whatever the size and crystallinity, all types of silica particles induce neutrophilic inflammation in BALF. Exposure to silica (except nanocrystalline silica, for which no data are available) consistently involved increased expression of inflammatory proteins, whatever the cell type (macrophage/monocyte, epithelial cell, or fibroblast) or animal model. The main proteins implicated are TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8. In addition, the COX-2/PGE-2 pathway is activated upon exposure to micrometric silica whatever its crystallinity (no data for nanometric silica), and the NF- κ B pathway is activated by exposure to microcrystalline silica and nanometric silica (no data for micrometric amorphous silica or nanoquartz).

4.2. Inflammasome

Inflammasomes are innate immune system complexes that constitute molecular receptors and sensors regulating the activation of caspase-1 protein and inducing inflammation (e.g., IL-1 β secretion) in response to various stimuli (e.g., infectious agents, particles, chemical agents, or host-derived molecules).

- Micrometric Crystalline Silica and Inflammasome

Among the pathways regulating cytokine release induced by micrometric crystalline silica, some authors have highlighted the significant role played by NOD-like receptor pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome formation in response to cellular damage [35]. Inflammasomes then trigger a significant increase in IL-1 β expression alongside augmented caspase-1 activity. Early release of alarmins (IL-1 α and IL-33, but not HMGB1) into the alveolar space is implicated in this process. Indeed, release of these molecules was shown to precede the expression of pro-IL-1 β in cultured murine macrophages and neutrophil infiltration in the lungs of exposed mice [38]. Silica exposure induces a significant increase in expression of NLRP3, ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) and caspase-1 mRNA [51,95], which is associated with higher caspase-1 activity in human THP-1 cells [35]. Activated caspase-1 can then cleave pro-IL-1 β to produce IL-1 β [51,96], triggering neutrophil recruitment [97]. In addition, in mouse alveolar macrophages, IL-1 α induces significant pro-IL-1 β production [38]. Finally, siRNA-mediated knockdown of NLRP3 reduced IL-1 β production in mouse macrophage cultures (RAW264.7) and primary rat macrophages [86]. NF- κ B activation and increased TNF- α and IL-1 production were also observed in rat BALF from 5 days after exposure to silica by inhalation; these effects persisted up to 116 days after exposure [98].

- Nanometric Crystalline Silica and Inflammasome: No data.
- Micrometric Amorphous Silica and Inflammasome

The literature is very limited when it comes to how micrometric amorphous silica affects the inflammasome. However, as for micrometric crystalline silica, exposure to micrometric amorphous silica leads to activation of the NLRP3 inflammasome. Indeed, some authors reported that particle-induced IL-1 β release was reduced in RAW264.7 cultures (mouse macrophages) and in primary rat macrophages following siRNA-mediated NLRP3 knockdown [86].

- Nanometric Amorphous Silica and Inflammasome

As for both micrometric and amorphous crystalline silica forms, exposure to amorphous nanosilica activates the inflammasome. Indeed, murine alveolar macrophages, murine bone-marrow-derived macrophages and human THP-1 cells exposed to amorphous nanosilica all present increased levels of IL-1 β as a result of NLRP3 inflammasome activation and increased caspase-1 activity [66,67,86,93]. Functional expression cloning identified the class B scavenger receptor SR-B1 as a receptor for amorphous and crystalline silica [99]. Silica was shown to bind to the extracellular α -helix of this protein in both mouse macrophages and human peripheral blood monocytes. By deleting the *SR-B1* gene and using monoclonal antibodies, this receptor was shown to be associated with canonical inflammasome activation [94,99]. Thus, SR-B1-mediated recognition of silica is associated with caspase-1-mediated inflammatory responses. As shown by Rabolli and colleagues [38] using micrometric crystalline silica, early release of IL-1 α and IL-33 triggers pro-IL-1 β and neutrophilic inflammation in nanosilica-treated murine macrophage cultures and in the lungs of exposed mice. Interestingly, reducing the surface silanol density of nanosilica by doping with titanium and aluminum could reduce NLRP3 inflammasome activation in human THP-1 cells and in bone-marrow-derived macrophages [59]. The reduction follows a dose-dependent pattern. Furthermore, high expression of IL-1 β , thioredoxin-interacting protein (TXNIP) and NLRP3 inflammasome proteins are also associated with nanosilica exposure in an asthmatic mouse model (ovalbumin (OVA)-induced model) [100]. Similar results were reported by Marzaioli and colleagues [67]. In addition, in vitro and in vivo analyses revealed attenuation of inflammasome expression when amorphous nanosilica was coated with phosphonate or amino (-NH₂) groups, but not with PEGylated nanosilica [67].

Conclusion on inflammasome:

Overall, all types of silica particles—whatever their size and crystallinity (except nanocrystalline silica, for which no data are available)—induce inflammasome activation, in particular through caspase-1 mediated by the NLRP3 complex. This activation results in increased IL-1 β protein levels.

4.3. Acute and Chronic Fibrosis

Fibrosis is a dysfunctional wound repair process, characterized by a failure of tissue regeneration and excessive deposition of extracellular matrix (ECM) by fibroblasts. TGF- β 1 is one of the most potent inducers of ECM production, including collagen fibers and other matrix proteins.

- Micrometric Crystalline Silica and Fibrosis

Acute fibrosis was observed in lung parenchyma and BALF after exposure of various animal models to microcrystalline silica. This type of silica significantly alters profibrotic markers, for example by increasing expression of cytokine CXCL10 [28] and TGF- β [37,39,50,101], or by enhancing PA (plasminogen activator) activity [30]. Immunohistochemistry analysis revealed a significant increase in 10E4 antigen levels accompanied by a decrease in SULF1 (sulfatase 1) protein levels [36]. This enzyme is implicated in heparan sulfate proteoglycan desulfatation and acts as a coreceptor for many heparin-binding growth factors and cytokines; it is also involved in cell signaling [36]. More recently, rats exposed to microcrystalline silica by intratracheal instillation were found to display pulmonary inflammation and fibrosis from 1 to 28 days after exposure. Numbers of fibroblasts and inflammatory cells decreased gradually from day 14, which is considered a crucial timepoint in silicosis progression [102]. In human epithelial cells, Perkins and colleagues [36] also suggest a potential role for SULF1 in silica-induced proliferative and fibrogenic signaling that could lead to epithelial hyperplasia, fibroblast recruitment, and deposition of ECM. Indeed, SULF1 overexpression leads to a significant increase in the expression of proliferative (CCND1, JUN, VEGFA, and BIRC3) and fibrogenic (COL1A1, PAI1, AVTA2, and collagen) genes after incubation with $150 \times 10^6 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ cristobalite. In a surface-reactivity-dependent manner [35], other fibrosis markers are also significantly increased, including FGF-2 [76] and bFGF [72,95]. In human fibroblast cells, exposure to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Min-U-Sil significantly increases indicators of fibrosis, such as Masson's trichrome staining, α -SMA expression, and

matrix contraction [103]. Moreover, cathepsin K, controlled by TGF- β 1, is overexpressed in silica-exposed fibroblast cultures [50]. In human THP-1 cells, exposure to silica induces a significant surface-reactivity-dependent increase in bFGF [35] and TGF- β expression [104]. As collagen deposition is one of the main mechanisms underlying fibrosis, some studies assessed collagen markers. Several groups reported a significant increase in hydroxyproline content [24,49,50] and expression of the MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) receptor [44]. In vitro, Bodo and colleagues [72] detected significant collagen and fibronectin production in human 16HBE cells. Using histological methods, other authors observed increased fibroblast proliferation and collagen deposition in mice 4 weeks after intratracheal instillation of 40 mg/kg of silica [24]. More recently, it was observed that overexpression of the multifunctional miR-138 alleviates silica-induced pulmonary fibrosis in mice [105].

Chronic fibrosis was also investigated in lung parenchyma and BALF after exposure to microcrystalline silica. As shown previously with acute fibrosis, this type of silica induces a significant increase in expression of various profibrotic markers, such as TGF- β 1 [37,39,50], CXCL10 [28], IL-10 [27,37,39], and PDGF-B [37,39]. Immunohistochemistry revealed contrasting effects of chronic versus acute exposure, with a significant increase in SULF1 protein levels and decreased 10E4 antigen levels following chronic exposure [36]. Some studies assessed collagen markers and reported significantly increased hydroxyproline content [23–25,27,37,39,44,50], along with soluble collagen [37] and type I collagen [27]. Using histological methods, lung tissue thickening [45] was linked to progressive and time-dependent fibrosis [47], but also to the emergence of fibrotic nodules 120 days after mice were intratracheally exposed to 100 mg/kg of silica particles [29].

- Nanometric Crystalline Silica and Fibrosis: No data.
- Micrometric Amorphous Silica and Fibrosis: No data.
- Nanometric Amorphous Silica and Fibrosis

Wang and colleagues [64] observed a significant increase in histological score for Masson's trichrome staining in samples from mice exposed to SiNP-100. This staining colocalized with TGF- β 1 at the cell membrane. Moreover, in human epithelial cells, immunofluorescence analysis revealed significant colocalization of 100 nm (but not 10 nm) SiNP and TGF- β 1 at the membrane of human epithelial cells (A549) [64]. These cells enhanced and prolonged TGF- β 1 activity in their corona, which induces fibrogenic pathways; free TGF- β 1 does not have this effect [64]. Investigation of the pathways regulating amorphous nanosilica-induced TGF- β 1 release revealed Smad2 to be implicated in the fibrogenic pathway. Indeed, incubation with 100 nm (but not 10 nm) SiNP led to a significant and prolonged increase in Smad2 phosphorylation [64]. In addition, one study linked exposure to amorphous silica NPs and alveolar remodeling in a sex-dependent manner. Thus, in rats exposed intratracheally to 2 mg/kg of 20 nm SiNP, females showed a significant increase in expression of caveolin-1, a regulator of ECM (including collagen) deposition, and MMP-9 compared to males [62].

For chronic fibrosis, Sutunkova and colleagues [43] reported a significant dose-dependent increase in the fibrotic marker hydroxyproline after 90 days' exposure in rats ("nose-only" inhalation exposure; dose range 2.6 to 10.6 mg/m³).

Conclusion on acute or chronic fibrosis:

No data are available for micrometric amorphous silica or nanoquartz. In studies involving exposure of rodent models to microcrystalline silica or nanosilica, acute or subacute fibrosis was generally studied. Both types of particles induce a significant increase in profibrotic markers in lung parenchyma and in BAL. Thus, TGF- β 1 is the main marker enhanced, and the effect is dose dependent with nanosilica.

4.4. Cell Death

Cell death is a biological event that is required for the natural process of cell regeneration, but it may also be triggered by factors such as disease, aggression, or injury. Morphologically, cell death can take various forms, including apoptosis or autophagy. The

destruction of cells, known as cytolysis, can be detected based on the release of nonspecific intracellular cytotoxicity markers (e.g., lactate dehydrogenase (LDH) or albumin protein).

4.4.1. Cytotoxicity

- Micrometric crystalline silica and cytotoxicity

LDH seems to be an important factor in the reaction to silica exposure. Indeed, LDH activity is reported to be significantly increased in a large number of studies [18–21,27,29,30,37,41,45,47,51,69], with the increase being potentially dose dependent [26]. Cellular cytolysis has also been reported based on serum albumin concentrations [98]. In vitro experimental studies in a human epithelial cell line demonstrate that exposure to 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of quartz particles triggered increased LDH release [73]. However, no significant differences were detected when using rat epithelial cells, even with high quartz concentrations (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, equivalent to 130 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) [106]. In a non-pulmonary macrophage cell line exposed to at least 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ silica, LDH activity increased significantly [107] in a dose-dependent manner [108].

- Nanometric crystalline silica and cytotoxicity

The unique study identified using nanoquartz showed that these particles induce cytotoxicity after a single intratracheal installation in rats, as indicated by high levels of LDH in BALF, detected only after the 5 mg/kg single dose, and until 3 months post exposure [46].

- Micrometric amorphous silica and cytotoxicity

In contrast to the effect of crystalline silica, after exposure to amorphous silica, LDH release seems to be more transient. Indeed, in rats exposed to 10 mg/m^3 of precipitated silica or 50 mg/m^3 colloidal silica, a significant increase in LDH release was detected at early stages but not 10 days after the initial exposure [20]. Moreover, no significant difference in LDH release was found in rats exposed to 1.2 mg/kg silica particles (200 nm) either intratracheally [55] or by nose-only inhalation [109]. However, when using a human pulmonary epithelial cell line, incubation with 300 and 500 nm silica particles triggered increased LDH release [73,87].

- Nanometric amorphous silica and cytotoxicity

In vivo, LDH release in rats following intratracheal exposure to 30 μg (1.2 mg/kg) of amorphous silica nanoparticles was not significantly different to levels in controls [55]. In contrast, when using a human pulmonary epithelial cell line exposed to nanosilica, LDH activity was significantly increased [87,89,92] in a dose-dependent manner [90,110]. At lower nanosilica concentrations (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), no significant difference in LDH release was demonstrated in human A549 adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells or THP-1 cells [88]. Finally, based on LDH release, nanosilica significantly increased cytotoxicity in non-pulmonary mouse RAW264.7 macrophages and human THP-1 macrophages at high doses (from 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [104,111], and also in human H441 lung adenocarcinoma cells (up to 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NexSil20 or Ludox TM-40) [89]. The effect was time- and dose dependent. In [89], no significant effect on cell viability (MTS assay) was demonstrated with either type of nanosilica at 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In contrast, in Chinese hamster fibroblast V79 cells, Guichard and colleagues [112] observed a significant and size-dependent (no effects for sizes greater than 20 nm) decrease in cell viability (WST-1 assay) with pyrogenic, precipitated, or colloidal amorphous silica particles.

Conclusion on cytotoxicity:

Overall, whatever the size and crystallinity, silica has a dose-dependent cytotoxic effect, revealed by LDH release in multiple studies.

4.4.2. Apoptosis

Apoptosis is a process of programmed cell death whereby a programmed sequence of events allows the elimination of cells without any release of internal constituents into the

surrounding area. Apoptosis plays a crucial role during early fetal development, childhood, and adulthood in the elimination of old, unnecessary, and unhealthy cells.

- Micrometric crystalline silica and apoptosis

Upon exploration of the pathways regulating crystalline-silica-induced cytotoxicity, a number of authors highlighted the crucial role played by apoptosis. Indeed, a significant increase in caspase-3 cleavage is reported in mice following exposure to 1 mg DQ-12 [28]. Calculation of the cleaved/uncleaved caspase-3 ratio also indicated activation of the apoptotic pathway in rodent alveolar and non-pulmonary macrophages exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ silica [28,113]. Similarly, in a human epithelial cell line, incubation with 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ quartz led to phosphorylation of SFK, p38 [75], and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 [74,75,114]. Moreover, ERK activation was linked to a significant increase in mRNA expression, corresponding to activation of c-fos and JUN family members in rodent cells following exposure to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ quartz [114]. Propidium iodide staining revealed a significant increase in macrophage death [113], which was time- and concentration dependent [115].

For this type of silica, in mice exposed to 1 mg DQ-12, and in non-pulmonary macrophages incubated with 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quartz, other cell death pathways have been implicated [28], such as pyroptosis, with a significant increase in gasdermin D cleavage, and necrosis, assessed based on MLKL (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase) phosphorylation. Autophagy, as estimated based on Fas and p62 expression levels, was also highly increased in histiocytes (in granulomas) [42]. Moreover, in mouse alveolar macrophages (MH-S cells) incubated with 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ crystalline silica, Joshi and colleagues [116] showed that this exposure can result in either apoptosis or necrosis, with either form of cell death occurring in a well-defined but temporally variable order.

- Nanometric crystalline silica and apoptosis: no data
- Micrometric amorphous silica and apoptosis

An increased apoptotic index (TUNEL assay) is reported in lung parenchyma [56] and in mouse alveolar macrophages (MH-S cells) following exposure to 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of 3 μm silica (no effects for 1 μm silica) [113]. Propidium iodide staining and caspase-3 cleavage demonstrated a significant increase in cell death rates.

- Nanometric amorphous silica and apoptosis

The essential role played by apoptosis, and specifically the potential induction of ER-stress was highlighted in some articles [89]. However, viability was reported to be relatively little affected after exposure to 50 nm nanosilica, with insignificant toxicity (based on propidium iodide staining) in human epithelial cells (BEAS-2B cells) at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [91]. In contrast, incubation with 10 nm Si at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (and to a lower extent with 50 nm Si at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced p38 phosphorylation in human BEAS-2B cells at timescales from 1 to 8 h after exposure [92]. Other authors used a caspase-3 assay to demonstrate activation of the apoptotic pathway in Chinese hamster fibroblast V79 cells exposed to at least 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (negligible effects for particle sizes greater than 20 nm) [112].

Conclusion on apoptosis:

Overall, whatever the size and the crystalline structure (no data available for nanoquartz), silica triggers apoptosis. Furthermore, it can be clearly seen that apoptosis is mainly mediated via the intrinsic and/or mitochondrial pathway (caspase-dependent pathway) in a size- and dose-dependent manner.

4.4.3. Autophagy

Autophagy is a cellular process that allows the degradation of cytoplasmic components such as damaged or unwanted proteins or organelles after their capture in a double lipid membrane—the autophagosome. Degradation occurs after fusion of the autophagosome with a lysosome to form the autolysosome.

- Micrometric crystalline silica and autophagy

Exposure to crystalline silica disrupts normal autophagic degradation in alveolar macrophages leading to autophagosome accumulation and lysosome disruption. Indeed, crystalline silica regulates autophagic activity via the PI3K/Akt/mTOR (phosphatidylinositol 3 kinase/ α -serine-threonine protein kinase/mammalian target of rapamycin) signaling pathway. In addition, recent studies indicate that autophagy reduces crystalline-silica-induced apoptosis of alveolar macrophages when mTOR is inhibited by rapamycin [117]. However, the authors did not specify the mean size and concentration of silica applied. Autophagy also reduces TNF- α and TGF- β (transforming growth factor- β) expression in silica-exposed alveolar macrophages [101]. Moreover, mitophagy contributes to this process when mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) released by alveolar macrophages leads to dysregulation of mitochondrial function [118]. Recently, the cGAS-STING (stimulator of interferon genes) pathway, which is crucial for immune defense, has been explored. STING activation triggers multiple signaling cascades leading to activation of the NF- κ B pathway and autophagy. One recent study linked inflammation triggered by exposure to micrometric crystalline silica with a role for the STING protein [28]. In this study, non-pulmonary macrophages were incubated with 250 μ g/mL quartz, leading to an increase in ds-DNA alongside overexpression of the STING and cGAS genes. In parallel, quartz disrupts lysosomes, resulting in excessive autophagosome formation; the backlog in autophagic degradation in alveolar macrophages then triggers an apoptotic mechanism. Another recent study showed that exposure to micrometric crystalline silica also induces lysosome damage and autophagosome accumulation in lung tissues in wild-type mice, and reduced autophagosome formation in Gas-6^{-/-} and Mer^{-/-} mice [119]. The growth arrest protein Gas-6 binds the TAM (Tyro3, Axl, and Mertk) receptor, a member of a family of tyrosine kinase receptors. Gas-6 depletion suppresses mitophagy by activating mTOR signaling to decrease autophagosome formation. Significant increases in the LC3B-II/LC3B-I ratio, ATG5 (only after 7 days), Beclin-1, Mer and P62 protein, and/or mRNA expression were observed in WT mice [119]. In addition, expression of p-mTOR and LAMP1 was significantly decreased after exposure to micrometric crystalline silica [119].

- Nanometric crystalline silica and autophagy: no data
- Micrometric amorphous silica and autophagy: no data
- Nanometric amorphous silica and autophagy

As for micrometric crystalline silica, amorphous nanosilica induces autophagy mainly via oxidative stress and the PARP (poly (ADP-ribose) polymerase)/TRPM2 (transient receptor potential melastatin-2) signaling pathways. Indeed, after inhibition of reactive oxygen species (ROS) generation, the PARP and TRPM2 channels suppress nanosilica-induced lysosome impairment and autophagy dysfunction in human BEAS-2B cells and in mouse lungs [68]. PARP and TRPM2 are known to promote autophagy via the mTOR and c-JNK (c-Jun N-terminal kinase) signaling pathways, respectively [120]. Lysosome acidification is a prerequisite for particle-induced lysosome membrane permeabilization, and the subsequent leakage of lysosome cathepsins is a primary regulator of NLRP3 inflammasome activity and HMGB1 protein release [51]. Furthermore, the induction of autophagy correlates with the extent of cytotoxicity, suggesting that nanosilica exposure causes irreversible cellular damage, ultimately leading to autophagic cell death [104].

Conclusion on autophagy:

Overall, microcrystalline or nanometric amorphous silica induce autophagy mainly via oxidative-stress-mediated upregulation of autophagy-related genes and differential regulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Induction of autophagy correlates with the extent of cytotoxicity, suggesting that both types of particles cause irreversible cellular damage leading to autophagic cell death. In support of this hypothesis, lysosomal and autophagic dysfunction is a known mechanism of microcrystalline silica toxicity.

4.5. Oxidative Stress

Oxidative stress results from an imbalance between the production of oxidants (e.g., ROS or free radicals) and antioxidant defenses; it can lead to cell and tissue damage, and is also involved in the aging process.

- Micrometric Crystalline Silica and Oxidative Stress

The relationship between silica exposure, oxidative stress, and pulmonary damage has been investigated in numerous studies.

In acute studies, ROS release seems to be an important reaction to exposure to silica. Indeed, some studies reported a significant increase in the $\cdot\text{OH}$ hydroxyl radical [32,41], specifically localized in phagocytes [21]. Some studies suggest that ROS release is size dependent (only triggered by exposure to particles smaller than 300 nm) [28,79]. In vitro studies in non-pulmonary macrophages demonstrate that mitochondrial ROS release is triggered by silica exposure, and immunofluorescence assays staining for MitoSOX confirmed that ROS originate in mitochondria [28]. Other oxidant markers were also increased, such as the NOx concentration [22] and lipid peroxidation levels [22]. In response to ROS release, significant increases in the enzyme heme-oxygenase-1 (HO-1) are detected specifically in alveolar macrophages [121]. Antioxidant markers, such as glutathione peroxidase [17] and SOD activity [22], also increase significantly [22], in particular the mitochondrial Mn-SOD (at both mRNA and protein levels) [16,17].

In lungs from rats exposed to micrometric crystalline silica by inhalation (15 mg/m³, 6 h/day) for 20, 40, or 60 days, a relationship was observed between increasing ROS production levels and the time post exposure [98]. Lung NO (nitric oxide) production was also significantly increased in silica-exposed rats, with further increases during the post exposure period [98]. NO and ROS production both increase in alveolar macrophages after exposure of lungs to micrometric crystalline silica, with iNOS (inducible nitric oxide synthase) protein expression displaying a dose-effect pattern in response to silica exposure [98]. In addition to iNOS expression, oxidative stress elicited by crystalline silica also leads to increased expression of antioxidant enzymes, such as manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) and glutathione peroxidase [13]. In human bronchial epithelial cells, exposure to silica is linked to significantly increased intracellular H₂O₂ [122]. Superoxide anions (O₂^{•-}), and H₂O₂ are generated in silica-treated medium by a process requiring iron [122]. Furthermore, generation of oxidants in cells following exposure to crystalline silica microparticles and silica activation leads to the activation of multiple cell signaling pathways. These pathways include MAPK/ERK kinase (MEK), and ERK phosphorylation, and increased expression of inflammatory cytokines [13]. In rats chronically exposed by inhalation (15 mg/m³ silica, 6 h/day, 5 days/week for up to 4 months), generation of ROS and NO, in particular, is temporally and anatomically associated with the development of lung damage, alongside inflammation, granulomas, and fibrosis [71]. Based on these observations, a central role has been suggested for NO in the initiation of silicosis [71]. In an iNOS-KO mouse model, Zeidler and colleagues [70] showed that activation of alveolar macrophages was reduced in iNOS-KO mice compared to WT mice. Moreover, lung hydroxyproline levels were significantly lower in iNOS-KO versus WT mice, suggesting that iNOS-derived NO also contributes to the pathogenesis of silica-induced lung disease in WT animals [70].

- Nanometric Crystalline Silica and Oxidative Stress: No data.
- Micrometric Amorphous Silica and Oxidative Stress

Brown and colleagues [55] assessed oxidative stress based on Nrf2 staining and found no particular induction in rats exposed intratracheally to 1.2 mg/kg of 0.2 μm silica particles [55]. However, in vitro studies with a mouse lung epithelial cell line (FE1 cells) indicate that incubation with at least 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of micrometric amorphous particles had a higher potential to induce ROS and intracellular glutathione (GSH) than exposure to nanometric particles [123]. Similarly, when mouse alveolar macrophages (MH-S cells) were incubated with 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, NOX2-generated ROS were specifically detected in the

cytoplasm in parallel to an increase in phagosomal ROS. During late apoptosis, these species were also associated with mitochondrial ROS production [124].

- Nanometric Amorphous Silica and Oxidative Stress

In vitro studies in human and rodent lung epithelial cells indicate that ROS release appears to represent an important cellular response to silica exposure. Indeed, some articles indicated that exposure to nanosilica triggers ROS release in a mouse lung epithelial cell line (FE1 cells) [123]. ROS release was shown to be time dependent in BEAS-2B human lung epithelial cells [91], and dose dependent in human A549 adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells [110]. In parallel to ROS release, HO-1 mRNA and protein levels were significantly increased after exposure to 50 nm silica particles at 50 µg/mL [91], with induction shown to involve the Nrf-2-ERK MAP kinase signaling pathway in human BEAS-2B cells [125]. Other oxidative stress markers were also perturbed in a dose-dependent manner in human epithelial cells: lipid peroxidation was significantly increased, whereas intracellular GSH was slightly depleted [110,126]. However, oxidative stress is only detected at high doses. Indeed, human epithelial cell lines exposed to low concentrations (10 µg/mL) of nanosilica display no significant differences in ROS formation, intracellular GSH, or SOD activity [127]. Among markers of oxidative stress, altered cell membrane integrity was also detected, with a decrease in phospholipids determined by metabolic analysis [126]. These effects may be species specific, however, as Guichard and colleagues [112] observed no significant difference in terms of ROS formation following exposure of a Chinese hamster fibroblast cell line to nanosilica [112].

Conclusion on oxidative stress:

Overall, all types of silica particles, with the exception of nanocrystalline silica (for which no data is available), induce a considerable degree of oxidative stress with disruption of the oxidant/antioxidant balance in a dose-dependent manner. The pathways triggered generally lead to NO and/or ROS formation (e.g., intracellular $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ or H_2O_2) rather than depletion of antioxidant capacity (e.g., GSH).

4.6. Alveolar Macrophage Phenotype and Phagocytic Activity

- Micrometric Crystalline Silica and Macrophages

Zhao and colleagues [128] showed that crystalline silica particles could disrupt alveolar macrophage polarization of in mice [128]. Indeed, inhalation of α -quartz by rodents induces (arginase-1 positive) M2 anti-inflammatory alveolar macrophage phenotype polarization. M2 macrophages are the archetypical phagocytic subtype, displaying a strong potential to take up mineral particles without triggering inflammation. M2 subtypes owe their phagocytic capacity to the expression of abundant levels of scavenger receptors for quartz; they also appear to be relatively insensitive to inflammatory stimuli, as suggested by their low-level expression of iNOS. However, accumulation of quartz particles in M2 macrophages leads to macrophage overload, when the cells can no longer encapsulate any further quartz particles. As a consequence, free quartz particles distributed in interstitial lung tissue also come into contact with activated M1 inflammatory macrophages (iNOS-positive), triggering secretion of inflammatory cytokines. These silica-laden M1 macrophages initiate the formation of lung granuloma, where further silica particles are sequestered. In addition to overload, the capacity of M2 macrophages to clear particles is perturbed by lipopolysaccharides, which cause them to secrete IL-1 β in response to α -quartz exposure. This IL-1 β in turn stimulates M1 macrophages and dendritic cells to produce TNF- α and IFN- β , respectively [128], further exacerbating the localized inflammation.

Phagocytosis is a critical mechanism through which innate immune cells eliminate microbes, necrotic or apoptotic cells, and mineral particles, such as crystalline silica. Expression levels for various markers of activated phagocytosis have been reported to be altered after exposure to microcrystalline silica: significant increase in lysosomal enzymes NAG (N-acetyl glucosaminidase) [20,23] and glucuronidase [23], heightened levels of extracellular cathepsins (L, B, V) and intracellular cathepsin B [51] and cathepsin K [50],

increased free cytosolic Ca^{2+} concentration and plasma membrane potential in bovine macrophages exposed to microcrystalline silica, and significantly decreased pHi [129]. However, phagocytosis could also be impaired by microcrystalline silica. Indeed, scanning electron micrograph (SEM) observations of pulmonary macrophages showed a deficit of phagocytic function in rats exposed to repeated 100 mg/m^3 doses of Min-U-Sil through an aerosol chamber [19].

- Nanometric Crystalline Silica and Macrophages: No data.
- Micrometric Amorphous Silica and Macrophages

The phenotypic profiles of alveolar macrophages exposed to micrometric amorphous silica are not reported in the literature. However, as with microcrystalline silica, phagocytosis of micrometric amorphous silica particles seems to be activated, as indicated by significant increases in lysosomal enzymes NAG (*N*-acetyl glucosaminidase) in rat macrophages [20], free cytosolic Ca^{2+} concentration [129] and plasma membrane potential [129], and a significant decrease in pHi observed following exposure, in bovine macrophages for these three last ones [129]. Endolysosomal leakage is demonstrated in mouse alveolar macrophages (MH-S cells) exposed to $50 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ of $3 \text{ }\mu\text{m}$ amorphous silica (no effects for $1 \text{ }\mu\text{m}$ amorphous silica) [113]. When NOX activity is inhibited in the same cell line, delayed phagolysosomal leakage occurred after exposure to $20 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$ of amorphous silica particles [124].

- Nanometric Amorphous Silica and Macrophages

Inhaled nanosilica are phagocytosed by alveolar macrophages [60]. Surprisingly, we only found one study that analyzed how nanosilica affects macrophage polarization [130]. The results indicated that increased nanosilica uptake in human THP-1 cell lines is associated with M2 polarization [130]. In corroboration of this conclusion, various markers of activated phagocytosis are detected after exposure to nanosilica. Indeed, in mouse pulmonary epithelial cells, incubation with nanosilica (12 nm) significantly modifies the expression of genes implicated in lysosomal functions, but also the internalization of the nanosilica itself and lysosomal rearrangements in the cytoplasm [123]. In addition, Sanchez and colleagues [131] reported a significant increase in basal calcium concentration [Ca^{2+}] in human and rodent epithelial cell lines [131].

Conclusion on alveolar macrophage phenotype and phagocytic activity:

The main cell types used to study immune responses to silica were innate immune cells such as monocytes and macrophages (but also epithelial cells for nanosilica). No analysis of phenotypic profiles of alveolar macrophages exposed to micrometric amorphous silica or nanoquartz was found in the literature. Furthermore, the data on phagocytic responses are very limited for amorphous silica, whatever its size. Therefore, no firm conclusions can be drawn for these two types of particles. However, with microcrystalline silica or nanosilica, exposure is mainly linked to M2 polarization. Overall, microcrystalline silica of any size can be eliminated by phagocytosis, but it may also impair phagocytosis, and consequently disrupt the elimination of microbes, necrotic or apoptotic cells, and other mineral particles. Microcrystalline silica-laden M1 macrophages initiate lung granuloma formation. Although nanometric amorphous silica is mainly internalized by macrophages, and associated with M2-polarization, epithelial cells may also be involved. Currently, no data are available on a potential nanosilica-linked impairment of alveolar macrophage phagocytic processes.

4.7. Epithelial–Mesenchymal Transition

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is the process whereby epithelial cells, which cover the internal and external surface of the organism, are transformed into mesenchymal cells. EMT is the key step in lung fibrogenesis, and TGF- β 1 is a potent mediator of this process.

- Micrometric Crystalline Silica and EMT

HMGB-1 is a nuclear protein that interacts with nucleosomes, transcription factors, and histones in order to organize DNA and regulate transcription. Recently, Ma and colleagues [132] showed that, in BALF from mice intratracheally instilled with crystalline silica, HMGB-1 is involved in macrophage and neutrophil accumulation, and in modulating IL-6 and TNF- α expression levels [132]. HMGB-1 seems to be implicated in fibronectin and collagen-1 expression, suggesting that HMGB-1-mediated EMT contributes to the development of silicosis on day 28 and 84 after microcrystalline silica administration [132]. Results from in vitro studies indicate that incubation of human epithelial cells with 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of microcrystalline silica leads to a significant increase in the EMT-related markers MMP-2 (matrix metalloproteinase), MMP-9, Col-1, and Col-3. Western blot analysis also revealed higher expression of α -SMA (smooth muscle actin) and vimentin (mesenchymal marker), along with weaker expression of E-cadherin and ZO-1 (epithelial marker) [133]. Moreover, Hu and colleagues [134] suggest that microcrystalline silica-induced EMT is mediated by Snail, a transcription factor that downregulates E-cadherin and upregulates vimentin expression [134]. More recently, in human A549 cells exposed to micrometric crystalline silica, expression of α -SMA and vimentin were found to be significantly increased, whereas E-cadherin was significantly decreased after transfection with miR-138 [105].

- Nanometric Crystalline Silica and EMT: No data.
- Micrometric Amorphous Silica and EMT

Recently, contrary to microcrystalline silica, following exposure to micrometric amorphous silica, reduced α -SMA protein activity was observed in human A549 cells. This reduction was the result of inhibition of silica-induced EMT, regulated by ZEB2. Furthermore, this delayed EMT was associated with upregulation of miR-138 [105].

- Nanometric Amorphous Silica and EMT

One study with nanosilica (100 nm SiNP) demonstrated possible induction of EMT in mice after intratracheal instillation [64]. Thus, the authors showed 100 nm SiNP in combination with TGF- β 1 to promote EMT in human A549 cells after incubation. The effect strictly required TGF- β 1, as it was significantly reduced upon inclusion of a TGF- β 1 receptor blocker (SB431542) [64]. Similarly, when human epithelial cells are incubated with 100 nm SiNP and TGF- β 1, EMT is triggered. This effect is associated with a higher expression of vimentin (mesenchymal marker) and weaker E-cadherin (epithelial marker) expression. No effect was observed with 10 nm particles, suggesting that the effect is size dependent [64]. TGF- β 1 was also increased in THP-1 cells exposed to amorphous nanosilica [104].

Conclusion on epithelial to mesenchymal transition:

Overall, despite the limited data available, it appears that EMT is mainly induced by microcrystalline silica and nanometric amorphous silica, with a possible size-dependent effect. EMT could lead to lung fibrogenesis as a result of TGF- β 1 expression.

4.8. Granulomas (or Silicotic Nodules)

The hallmark of pulmonary silicosis is the formation of granulomas, also known as silicotic nodules: well-demarcated, rounded fibrotic lesions that tend to concentrate in the upper lung lobes.

- Micrometric Crystalline Silica and Granuloma

In addition to fibrosis, silicotic nodules are often observed at chronic stages when silica is retained in the lungs [18,27,35,39]. Indeed, aggregated/agglomerated silica particles are found in granuloma centers [24,42]. Furthermore, some studies reported emphysema-like effects, with a significant increase in neutrophil elastase levels [33], along with increased insoluble elastin [24].

- Nanometric Crystalline Silica and Granuloma: No data.
- Micrometric Amorphous Silica and Granuloma: No data.
- Nanometric Amorphous Silica and Granuloma

According to Lee and Kelly [60], in rats exposed in chambers to 50 to 150 mg/m³ of colloidal amorphous silica, granulomas initially form in a dose-dependent manner in alveoli. Particle-laden alveolar macrophages are observed alongside epithelioid cell proliferation [60]. This type of lesion can appear after just 1 week in mice exposed intratracheally to at least 1 mg/kg nanosilica particles [61]. However, in contrast to micrometric crystalline silica, collagen deposition is minimal in granulomas induced following exposure to nanosilica [60].

Conclusion on granulomas:

Despite the limited data available (no data for micrometric amorphous silica or nanoquartz), silicotic nodules are mainly induced by microcrystalline silica, but can also be triggered by nanometric amorphous silica. In comparison with microcrystalline silica, collagen deposition is minimal in silicotic nodules induced following exposure to nanosilica.

4.9. Muco-Ciliary Clearance and Other Effects

Muco-ciliary clearance is one of the processes by which the lungs clean themselves of dust and particles that enter with inhaled air. A constant beating of the cilia entrains a conveyor belt of mucus from the bottom of the lungs to the top of the trachea.

- **Micrometric Crystalline Silica and Muco-Ciliary Clearance**

Microcrystalline silica could affect muco-ciliary clearance. Indeed, Yu and colleagues [48] reported a perturbed muco-ciliary structure and altered MUC5B production in mice following intratracheal exposure to a dose of 100 mg/kg [48]. Moreover, intratracheal instillation of 50 mg/kg silica in rats significantly increased the albumin concentration in BALF, suggesting an impact on the capillary–epithelial barrier [40]. Finally, changes in lung metabolism were observed in rats intratracheally exposed to 20 mg Min-U-Sil, with a significant increase in lung microsomal concentrations of proteins linked to CYP4501A1- and 2B1-mediated reactions [32].

- Nanometric Crystalline Silica and Muco-Ciliary Clearance: No data.
- Micrometric Amorphous Silica and Muco-Ciliary Clearance: No data.
- Nanometric Amorphous Silica and Muco-Ciliary Clearance

In human and rodent epithelial lung cell lines, compared to control conditions, incubation with 300 µg/mL of 10 nm colloidal silica particles led to a decrease in ciliary beat frequency through a significant inhibition of the TRPV4 cation channel and a TRPV4-independent increase in basal [Ca²⁺] [131]. In vitro, porcine pulmonary surfactant extract incubated with at least 250 µg/mL of (50 nm) nanosilica displayed altered surfactant parameters. Indeed, the compression isotherm (a parameter simulating the physiological conditions in alveoli during breathing) and the foaming ability (a key indicator of the interface properties of pulmonary surfactant) were significantly perturbed [135].

Conclusion on muco-ciliary clearance and other effects:

Despite the limited data available (no data for micrometric amorphous silica or nanoquartz), in vivo exposure to very high doses of microcrystalline silica leads to disrupted muco-ciliary clearance in rodents. However, it should be noted that no data were available at realistic doses. In vitro, meanwhile, exposure to nanosilica leads to a decrease in ciliary beat frequency and altered pulmonary surfactant properties.

5. Discussion

5.1. Relevance of Doses Used

The majority of the experimental studies on animals reviewed here involved high—sometimes unrealistic—doses. Extrapolation to real human exposure levels in the workplace reveals maximal atmospheric concentrations ranging from a few mg/m³ to a few tens of mg/m³ when the occupational exposure limit values for most countries are significantly exceeded. Indeed, the exposure limit value for quartz recommended in the United States (NIOSH-REL value) is 0.05 mg/m³, and in France it is 0.1 mg/m³; for amorphous silica (nonspecific dusts) it is 6 or 4 mg/m³, respectively. These values should be kept in mind

when considering data from whole-body inhalation studies, where the atmospheric concentrations used sometimes exceed 150 mg/m^3 (<https://www.osha.gov/chemicaldata/613> (accessed on 7 June 2022) and <https://www.osha.gov/chemicaldata/278> (accessed on 7 June 2022)). With intratracheal or pharyngeal instillation, considering the regulatory daily occupational thresholds in most Western countries (examples above), realistic equivalent cumulative doses should be about $0.5 \text{ }\mu\text{g}$ per mouse per week for quartz, and $50 \text{ }\mu\text{g}$ per mouse per week for amorphous silica [136]. Similarly, for in vitro studies, if a silica mass concentration of 5 mg/m^3 is applied, the realistic cumulative daily dose would be around $0.2 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ according to the equation: Daily dose deposited on alveolar surface = (occupational exposure limit (OEL) ($5 \text{ }\mu\text{g/L} = 5 \text{ mg/m}^3$) \times percentage of deposited fraction of emitted aerosol (50% for NP with a mean aerodynamic diameter of 20 nm) \times mean minute ventilation ($22.5 \text{ L/min} = \text{tidal volume of } 1.5 \text{ L} \times \text{respiratory frequency of } 15/\text{min}$) \times duration (480 min, 8 h per day))/alveolar surface ($1,500,000 \text{ cm}^2 = 150 \text{ m}^2$) [136]. However, in the studies used for this review, very high doses were used in most studies: ranging from 6.2 to 150 mg/m^3 in whole-body inhalation studies, 2.6 to 27 mg/m^3 in “nose-only” inhalation studies, and 0.02 to 640 mg/kg in intratracheal instillation studies. The use of such doses presents certain advantages in toxicology when seeking to assess risks, but cannot be considered to mimic actual work situations. Therefore, the biological, cellular, and tissue effects observed following exposure to such high doses are difficult to extrapolate to realistic working conditions. Consequently, when considering the data presented, it is essential to take into account the relevance of the dose applied. Interestingly, Di Cristo and colleagues designed a human-relevant 3D in vitro platform for simulation of workplace exposure to nanoparticles. Based on efficiency of pulmonary clearance of inhaled silica nanoparticles compared to recent in vivo data, this in vitro platform could compare tested doses to occupational exposure limit values [137].

5.2. Silica Physicochemical Characteristics

The in vitro and in vivo experimental studies reviewed here indicated that silica, whatever its crystallinity, shape, or size, can affect lung biodistribution and can induce adverse lung effects. However, we noted some inconsistencies in the toxicity dataset as a whole. For example, differences in physicochemical properties sometimes contributed to significant variations in toxicity. In this literature review, the physicochemical characteristics of silica, such as its chemical composition, primary particle size, and crystallinity, were taken into account. This selection effectively excluded many articles where no elementary physicochemical characterization was presented. Most studies associated toxic endpoints with crystallinity and size, whereas only a few linked toxicity to porosity, shape, surface charge, and surface chemistry. Studies using amorphous silica nanoparticles, aggregated or agglomerated states in vehicle or cell culture medium, were almost never included for this review. The reason for this exclusion is that these physicochemical characteristics considerably alter the overall size, shape, and surface area, potentially influencing the biological impact of the particles tested [55,87,88,138,139]. The presence of impurities, (e.g., metals) on nanoparticle surface may play an important role in nanosilica toxicity [135]. In addition, the modified surface of mesoporous silica nanoparticles by some surfactants or chemical agents can also modulate cytotoxic responses [140]. Interestingly, particle surface area could also be transformed by natural molecules, such as ascorbic acid. Indeed, ascorbic acid is known to generate hydroxyl radicals on the surface of quartz particles in the sponge *Chondrosia reniformis* [141]. Therefore, it appears critical to determine how these physicochemical variations influence lung toxicity. However, the nature of these variations remains unclear, limiting our understanding of the specific toxicities of each form of silica to considerations of crystalline structure and size.

Moreover, recent studies indicate that hydroxyl groups at the surface of silica—as with hydrophilic (geminal or vicinal hydroxyl structure) or hydrophobic (siloxane structure after silanols condensation) surfaces—could significantly change its biological toxicity [10]. Indeed, the presence of silanols at the surface of nanosilica or micrometric crystalline silica

appears to better correlate with toxicity than their crystallinity [142]. Further studies will be required to verify this hypothesis. Finally, in silicosis patients, the association of crystalline silica particles with bacterial endotoxins, such as lipopolysaccharides (LPS), is well known to further disrupt autophagic degradation of alveolar macrophages, resulting in an accumulation of autophagosomes and disrupting lysosomal function [143]. In our review, very few studies were found that considered this type of variation in physicochemical conditions.

5.3. Influence of Silica Particle Generation Processes

For exposure and risk assessment in occupational settings involving nanoparticles, it is important to understand their mechanisms of release from non-nanostructured materials, or their industrial manufactured process characteristics [144–146]. The manufacturing method used to produce synthetic silica particles (such as precipitated, pyrogenic, or fumed silica), especially for amorphous silica nanoparticles, could strongly influence their adverse biological effects [147]. In addition, the toxicological specificities of micrometric or nanometric silica particles emitted after fracturing of nanostructured or nonstructured materials (e.g., by high-energy rotating tools) are very rarely addressed in the literature. Nevertheless, silica particles are commonly emitted through this process in a large number of occupational activities, such as construction. It is important to bear in mind that the freshness of fractured silica particles could also influence their toxicity. Indeed, according to some authors, the spatial organization of surface silanols is more toxic for freshly emitted particles [12,59,142]. Porter et al. [148] indicated that none of the doses of aged crystalline silica used in their study induced NO production. In contrast, induction of this highly cytotoxic product has been reported in vivo with freshly fractured silica particles [148]. The other important question is: can silica nanoparticles be emitted after fracturing? To our knowledge, this question still remains unsolved. More systematic studies are clearly required to verify these production process-dependent differences.

5.4. Silica and Lung Toxicity

In the past, most research was focused on micrometric silica particles measuring between 0.5 and 10 μm , mainly in crystalline form. More recently, synthetic amorphous nanosilica, due to its many industrial applications, has received greater attention. Studies suggest that these different forms may have distinct toxicological properties. Thus, nanosilica may present specific hazards to human health, including an enhanced ability to penetrate intracellular compartments in the lung and to access the systemic circulation [149]. It should be noted that the choice of cell type, treatment medium, culture system, and assay conditions, along with the animal model used in experimental studies, can influence the toxic responses to amorphous or crystalline silica, regardless of the particle size used [122,150]. The lack of in vitro and in vivo studies implementing crystalline silica nanoparticles, apart from that of Warheit and colleagues [46], makes comparison of toxicity mechanisms between amorphous nanosilica and micrometric crystalline silica essential, while awaiting the possible advent of crystalline silica nanoparticles. A general overview of lung toxicity induced by different types of silica is shown in Tables 1 and 2. Alterations to lung inflammation, oxidative stress, cytotoxicity, and phagocytosis are induced not only by micrometric crystalline and amorphous silica nanoparticles, but also by micrometric amorphous silica, even if far fewer studies are available. Fibrosis and epithelial–mesenchymal transition have so far only been observed with amorphous silica nanoparticles and rarely with micrometric amorphous silica particles (due to the limited number of studies using this class of silica). Crystalline silica-induced granulomas are well known and responsible for silicosis in humans. However, observations with amorphous nanosilica lead us to suggest that this type of lesion could be induced by lower doses and following faster kinetics [61]. Correlation between in vitro and in vivo effects indicates that specific cells or tissues are potential targets of toxicity. The results of in vitro and in vivo experiments suggest that exposure to nanosilica, as well as mainly crystalline silica, could induce lesions via the activation of NF- κ B signaling pathways, autophagy, and the inflammasome [35,67,80,81,101,120].

Finally, this review shows that the biological effects of amorphous silica nanoparticles and micrometric crystalline silica are relatively similar at the cellular and tissue levels, although we lack solid arguments on the occurrence of silicosis after exposure to amorphous silica nanoparticles. Comparison is much more difficult for crystalline silica nanoparticles and for micrometric amorphous silica particles due to the very low number of studies, knowing that negative studies are seldom published.

6. Conclusions

Despite the accumulated evidence of its toxicity, silica particles—whatever their size or crystallinity—continue to represent an intriguing subject for basic and applied research in a number of scientific and technical fields. This review is particularly timely given the relatively recent emergence of manufactured nanoparticles, but also the new light that has been shed on toxicological determinants at the micrometric scale. The pathogenicity of silica varies depending on the physicochemical characteristics of the particles involved. For 50 years, its crystalline nature and ability to trigger the generation of free radicals have been recognized as relevant and unique characteristics contributing to its toxicity. More recently, the surface chemistry of silica—such as the presence of hydroxyl groups (–OH)—has also been shown to play an important role.

Our understanding of the molecular mechanisms underlying the undesirable effects of silica particles is obviously far from complete. However, the future is more optimistic, thanks to the advent of new characterization methodologies allowing finer analysis and more precise quantification, for example, based on the presence of silanols at the surface of silica particles. Moreover, the presence of impurities within the crystalline structure, or surface coatings on the particles must be better taken into account in experimental studies to avoid drawing erroneous conclusions. Studies on the in vitro and in vivo toxicity of nanosilicas remain in the exploratory stage, and the toxicity mechanisms of nanosilicas are still poorly understood. Better understanding of nanosilicas toxicity is necessary to guarantee an optimal safety level, in particular in biomedical applications, including nanosilica uses in drug delivery systems to diagnose and treat various human diseases. Minimal silica characterization standards are needed for reporting and understanding their biological or environmental behaviors and implications. New experimental studies thus seem necessary to better understand the mechanisms underlying the toxicity of this large family of particles with, in particular, the possible discovery of new molecular targets such as surface-chemistry-specific interactions between certain cellular recognition systems and silica particles.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano12142392/s1>, Tables S1–S7 summarize all the in vivo and in vitro studies according to the type of silica particle (i.e., according to its size and crystallinity).

Author Contributions: Conceptualization, P.A. and S.L.; methodology, P.A. and V.M.D.S.; formal analysis, P.A. and V.M.D.S.; data curation, P.A. and V.M.D.S.; writing—original draft preparation, P.A., S.L., M.B., P.M. and V.M.D.S.; writing—review and editing, P.A., S.L., J.-C.P. and V.M.D.S.; funding acquisition, P.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: V.M.D.S. (PhD) funding was awarded by the National Doctoral Program in Occupational Health coordinated by EHESP (Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique; French School of Public Health) within the “Plan Santé Travail 3”. The PURESNOW project was funded through grant reference EST 2018/1/094 from APR ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail; French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Introduction

Toxicologie in vivo et in vitro de la silice en fonction de la structure et de la taille

Conflicts of Interest: The authors declare that this review was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. IARC. Arsenic, metals, fibres, and dusts. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; World Health Organization: Geneva, Switzerland; World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2012; Volume 100, pp. 11–465.
2. Barnes, H.; Goh, N.S.L.; Leong, T.L.; Hoy, R. Silica-associated lung disease: An old-world exposure in modern industries. *Respirology* **2019**, *24*, 1165–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bröske, I.; Thiering, E.; Heinrich, J.; Huster, K.M.; Nowak, D. Respirable quartz dust exposure and airway obstruction: A systematic review and meta-analysis. *Occup. Environ. Med.* **2014**, *71*, 583–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cavalin, C.; Lescoat, A.; Ballerie, A.; Belhomme, N.; Jégo, P.; Jouneau, S.; Lecureur, V.; Lederlin, M.; Paris, C.; Rosental, P.A. Beyond silicosis, is the world failing on silica hazards? *Lancet Respir. Med.* **2019**, *7*, 649–650. [[CrossRef](#)]
5. Gómez-Puerta, J.A.; Gedmintas, L.; Costenbader, K.H. The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: Systematic review and meta-analysis. *Autoimmun. Rev.* **2013**, *12*, 1129–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Merget, R.; Bauer, T.; Küpper, H.; Philippou, S.; Bauer, H.; Breitstadt, R.; Bruening, T. Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Arch. Toxicol.* **2002**, *75*, 625–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Taeger, D.; McCunney, R.; Bailer, U.; Barthel, K.; Küpper, U.; Brüning, T.; Morfeld, P.; Merget, R. Cross-Sectional Study on Nonmalignant Respiratory Morbidity due to Exposure to Synthetic Amorphous Silica. *J. Occup. Environ. Med.* **2016**, *58*, 376–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Barbieri, P.G.; Somigliana, A.; Carradori, G. Severe silicosis due to diatomaceous earth in dental alginate: A necropsy study. *Med. Del Lav.* **2020**, *111*, 222–231. [[CrossRef](#)]
9. Sharma, N.; Jha, S. Amorphous nanosilica induced toxicity, inflammation and innate immune responses: A critical review. *Toxicology* **2020**, *441*, 152519. [[CrossRef](#)]
10. Napierska, D.; Thomassen, L.C.; Lison, D.; Martens, J.A.; Hoet, P.H. The nanosilica hazard: Another variable entity. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, 39. [[CrossRef](#)]
11. Murugadoss, S.; Lison, D.; Godderis, L.; Van Den Brule, S.; Mast, J.; Brassinne, F.; Sebaihi, N.; Hoet, P.H. Toxicology of silica nanoparticles: An update. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 2967–3010. [[CrossRef](#)]
12. Turci, F.; Pavan, C.; Leinardi, R.; Tomatis, M.; Pastero, L.; Garry, D.; Anguissola, S.; Lison, D.; Fubini, B. Revisiting the paradigm of silica pathogenicity with synthetic quartz crystals: The role of crystallinity and surface disorder. *Part. Fibre Toxicol.* **2016**, *13*, 32. [[CrossRef](#)]
13. Fubini, B.; Hubbard, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free. Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 1507–1516. [[CrossRef](#)]
14. OECD. *Guidance Document on Inhalation Toxicity Studies*; Series on Testing and Assessment; OECD: Paris, France, 2018; Volume 39, pp. 1–106.
15. Heppleston, A.G. Determinants of pulmonary fibrosis and lipidosis in the silica model. *Br. J. Exp. Pathol.* **1986**, *67*, 879–888.
16. Holley, J.A.; Janssen, Y.M.W.; Mossman, B.T.; Taatjes, D.J. Increased manganese superoxide dismutase protein in type II epithelial cells of rat lungs after inhalation of crocidolite asbestos or cristobalite silica. *Am. J. Pathol.* **1992**, *141*, 475–485.
17. Janssen, Y.M.W.; Marsh, J.P.; Absher, M.P.; Hemenway, D.; Vacek, P.M.; Leslie, K.O.; Borm, P.J.A.; Mossman, B.T. Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10625–10630. [[CrossRef](#)]
18. Langley, R.J.; Kalra, R.; Mishra, N.C.; Hahn, F.F.; Razani-Boroujerdi, S.; Singh, S.P.; Benson, J.M.; Peña-Philippides, J.C.; Barr, E.B.; Sopori, M.L. A biphasic response to silica: I. Immunostimulation is restricted to the early stage of silicosis in lewis rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *30*, 823–829. [[CrossRef](#)]
19. Warheit, D.B.; Carakostas, M.C.; Bamberger, J.R.; Hartsky, M.A. Complement facilitates macrophage phagocytosis of inhaled iron particles but has little effect in mediating silica-induced lung inflammatory and clearance responses. *Environ. Res.* **1991**, *56*, 186–203. [[CrossRef](#)]
20. Warheit, D.B.; McHugh, T.A.; Hartsky, M.A. Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scand. J. Work. Environ. Health* **1995**, *21*, 19–21. [[PubMed](#)]
21. Antonini, J.M.; Roberts, J.R.; Yang, H.M.; Barger, M.W.; Ramsey, D.; Castranova, V.; Ma, J.Y.C. Effect of silica inhalation on the pulmonary clearance of a bacterial pathogen in fischer 344 rats. *Lung* **2000**, *178*, 341–350. [[CrossRef](#)]
22. Porter, D.W.; Millecchia, L.L.; Willard, P.; Robinson, V.A.; Ramsey, D.; McLaurin, J.; Khan, A.; Brumbaugh, K.; Beighley, C.M.; Teass, A.; et al. Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after cessation of silica inhalation. *Toxicol. Sci.* **2006**, *90*, 188–197. [[CrossRef](#)]
23. Adamson, I.Y.R.; Bowden, D.H. Role of polymorphonuclear leukocytes in silica-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **1984**, *117*, 37–43.
24. Adamson, I.Y.R.; Letourneau, H.L.; Bowden, D.H. Enhanced macrophage-fibroblast interactions in the pulmonary interstitium increases fibrosis after silica injection to monocyte-depleted mice. *Am. J. Pathol.* **1989**, *134*, 411–418. [[PubMed](#)]
25. Adamson, I.Y.R.; Prieditis, H. Silica deposition in the lung during epithelial injury potentiates fibrosis and increases particle translocation to lymph nodes. *Exp. Lung Res.* **1998**, *24*, 293–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Arras, M.; Huaux, F.; Vink, A.; Delos, M.; Coutelier, J.P.; Many, M.C.; Barbarin, V.; Renauld, J.C.; Lison, D. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2001**, *24*, 368–375. [\[CrossRef\]](#)
27. Barbarin, V.; Nihoul, A.; Misson, P.; Arras, M.; Delos, M.; Leclercq, I.; Lison, D.; Huaux, F. The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis. *Respir. Res.* **2005**, *6*, 112. [\[CrossRef\]](#)
28. Benmerzoug, S.; Rose, S.; Bounab, B.; Gosset, D.; Duneau, L.; Chenuet, P.; Mollet, L.; Le Bert, M.; Lambers, C.; Geleff, S.; et al. STING-dependent sensing of self-DNA drives silica-induced lung inflammation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5226. [\[CrossRef\]](#)
29. Huaux, F.; Lardot, C.; Arras, M.; Delos, M.; Many, M.C.; Coutelier, J.P.; Buchet, J.P.; Renauld, J.C.; Lison, D. Lung fibrosis induced by Silica particles in NMRI Mice is associated with an upregulation of the p40 subunit of interleukin-12 and Th-2 manifestations. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1999**, *20*, 561–572. [\[CrossRef\]](#)
30. Lardot, C.; Delos, M.; Lison, D. Upregulation of urokinase in alveolar macrophages and lung tissue in response to silica particles. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, L1040–L1048. [\[CrossRef\]](#)
31. Migliaccio, C.T.; Hamilton, R.F.; Holian, A. Increase in a distinct pulmonary macrophage subset possessing an antigen-presenting cell phenotype and in vitro APC activity following silica exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *205*, 168–176. [\[CrossRef\]](#)
32. Miles, P.R.; Bowman, L.; Jones, W.G.; Berry, D.S.; Vallyathan, V. Changes in alveolar lavage materials and lung microsomal xenobiotic metabolism following exposures to HCl-washed or unwashed crystalline silica. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1994**, *129*, 235–242. [\[CrossRef\]](#)
33. Nemmar, A.; Nemery, B.; Hoet, P.H.M.; Van Rooijen, N.; Hoylaerts, M.F. Silica particles enhance peripheral thrombosis: Key role of lung macrophage-neutrophil cross-talk. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, *171*, 872–879. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Nagatomo, H.; Morimoto, Y.; Oyabu, T.; Hirohashi, M.; Ogami, A.; Yamato, H.; Kuroda, K.; Higashi, T.; Tanaka, I. Expression of heme oxygenase-1 in the lungs of rats exposed to crystalline silica. *J. Occup. Health* **2006**, *48*, 124–128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Peeters, P.M.; Eurlings, I.M.J.; Perkins, T.N.; Wouters, E.F.; Schins, R.P.F.; Borm, P.J.A.; Drommer, W.; Reynaert, N.L.; Albrecht, C. Silica-induced NLRP3 inflammasome activation in vitro and in rat lungs. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Perkins, T.N.; Peeters, P.M.; Albrecht, C.; Schins, R.P.F.; Dentener, M.A.; Mossman, B.T.; Wouters, E.F.M.; Reynaert, N.L. Crystalline silica alters Sulfatase-1 expression in rat lungs which influences hyper-proliferative and fibrogenic effects in human lung epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *348*, 43–53. [\[CrossRef\]](#)
37. Rabolli, V.; Lo Re, S.; Uwambayinema, F.; Yakoub, Y.; Lison, D.; Huaux, F. Lung fibrosis induced by crystalline silica particles is uncoupled from lung inflammation in NMRI mice. *Toxicol. Lett.* **2011**, *203*, 127–134. [\[CrossRef\]](#)
38. Rabolli, V.; Badissi, A.A.; Devosse, R.; Uwambayinema, F.; Yakoub, Y.; Palmari-Pallag, M.; Lebrun, A.; De Gussem, V.; Couillin, I.; Ryffel, B.; et al. The alarmin IL-1 α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 69. [\[CrossRef\]](#)
39. Lo Re, S.; Yakoub, Y.; Devosse, R.; Uwambayinema, F.; Couillin, I.; Ryffel, B.; Marbaix, E.; Lison, D.; Huaux, F. Uncoupling between inflammatory and fibrotic responses to silica: Evidence from MyD88 knockout mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99383. [\[CrossRef\]](#)
40. Reasor, M.J.; Antonini, J.M. Pulmonary responses to single versus multiple intratracheal instillations of silica in rats. *J. Toxicol. Environ. Health-Part A* **2001**, *62*, 9–21. [\[CrossRef\]](#)
41. Schapira, R.M.; Ghio, A.J.; Effros, R.M.; Morrisey, J.; Almagro, U.A.; Dawson, C.A.; Hacker, A.D. Hydroxyl radical production and lung injury in the rat following silica or titanium dioxide instillation in vivo. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1995**, *12*, 220–226. [\[CrossRef\]](#)
42. Shimizu, Y.; Dobashi, K.; Nagase, H.; Ohta, K.; Sano, T.; Matsuzaki, S.; Ishii, Y.; Satoh, T.; Koka, M.; Yokoyama, A.; et al. Co-localization of iron binding on silica with p62/sequestosome1 (SQSTM1) in lung granulomas of mice with acute silicosis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2015**, *56*, 74–83. [\[CrossRef\]](#)
43. Sutunkova, M.P.; Solovyeva, S.N.; Katsnelson, B.A.; Gurvich, V.B.; Privalova, L.L.; Minigalieva, I.A.; Slyshkina, T.V.; Valamina, I.E.; Makeyev, O.H.; Shur, V.Y.; et al. A paradoxical response of the rat organism to long-term inhalation of silica-containing submicron (predominantly nanoscale) particles of a collected industrial aerosol at realistic exposure levels. *Toxicology* **2017**, *384*, 59–68. [\[CrossRef\]](#)
44. Thakur, S.A.; Beamer, C.A.; Migliaccio, C.T.; Holian, A. Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation. *Toxicol. Sci.* **2009**, *108*, 462–471. [\[CrossRef\]](#)
45. Warheit, D.B.; Webb, T.R.; Reed, K.L. Pulmonary toxicity screening studies in male rats with TiO₂ particulates substantially encapsulated with pyrogenically deposited, amorphous silica. *Part. Fibre Toxicol.* **2006**, *3*, 3. [\[CrossRef\]](#)
46. Warheit, D.B.; Webb, T.R.; Colvin, V.L.; Reed, K.L.; Sayes, C.M. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: Toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol. Sci.* **2007**, *95*, 270–280. [\[CrossRef\]](#)
47. Xu, H.; Verbeken, E.; Vanhooren, H.M.; Nemery, B.; Hoet, P.H.M. Pulmonary toxicity of polyvinyl chloride particles after a single intratracheal instillation in rats. Time course and comparison with silica. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *194*, 111–121. [\[CrossRef\]](#)
48. Yu, Q.; Fu, G.; Lin, H.; Zhao, Q.; Liu, Y.; Zhou, Y.; Shi, Y.; Zhang, L.; Wang, Z.; Zhang, Z.; et al. Influence of silica particles on mucociliary structure and MUC5B expression in airways of C57BL/6 mice. *Exp. Lung Res.* **2020**, *46*, 217–225. [\[CrossRef\]](#)
49. Barbarin, V.; Xing, Z.; Delos, M.; Lison, D.; Huaux, F. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2005**, *288*, L841–L848. [\[CrossRef\]](#)

50. Van den Br ule, S.; Misson, P.; B uhling, F.; Lison, D.; Huaux, F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF- β . *Respir. Res.* **2005**, *6*, 84. [[CrossRef](#)]
51. Jessop, F.; Hamilton, R.F.; Rhoderick, J.F.; Fletcher, P.; Holian, A. Phagolysosome acidification is required for silica and engineered nanoparticle-induced lysosome membrane permeabilization and resultant NLRP3 inflammasome activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2017**, *318*, 58–68. [[CrossRef](#)]
52. Ray, J.L.; Holian, A. Sex differences in the inflammatory immune response to multi-walled carbon nanotubes and crystalline silica. *Inhal. Toxicol.* **2019**, *31*, 285–297. [[CrossRef](#)]
53. Inoue, M.; Sakamoto, K.; Suzuki, A.; Nakai, S.; Ando, A.; Shiraki, Y.; Nakahara, Y.; Omura, M.; Enomoto, A.; Nakase, I.; et al. Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages. *Part Fibre Toxicol.* **2021**, *18*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hadrup, N.; Aimonen, K.; Ilves, M.; Lindberg, H.; Atluri, R.; Sahlgren, N.M.; Jacobsen, N.R.; Barfod, K.K.; Berthing, T.; Lawlor, A.; et al. Pulmonary toxicity of synthetic amorphous silica-effects of porosity and copper oxide doping. *Nanotoxicology* **2021**, *15*, 96–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Brown, D.M.; Kanase, N.; Gaiser, B.; Johnston, H.; Stone, V. Inflammation and gene expression in the rat lung after instillation of silica nanoparticles: Effect of size, dispersion medium and particle surface charge. *Toxicol. Lett.* **2014**, *224*, 147–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kaewamatawong, T.; Shimada, A.; Okajima, M.; Inoue, H.; Morita, T.; Inoue, K.; Takano, H. Acute and Subacute Pulmonary Toxicity of Low Dose of Ultrafine Colloidal Silica Particles in Mice after Intratracheal Instillation. *Toxicol. Pathol.* **2006**, *34*, 958–965. [[CrossRef](#)]
57. Kusaka, T.; Nakayama, M.; Nakamura, K.; Ishimiya, M.; Furusawa, E.; Ogasawara, K. Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92634. [[CrossRef](#)]
58. Yuen, I.S.; Hartsky, M.A.; Snajdr, S.I.; Warheit, D.B. Time course of chemotactic factor generation and neutrophil recruitment in the lungs of dust-exposed rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1996**, *15*, 268–274. [[CrossRef](#)]
59. Sun, B.; Pokhrel, S.; Dunphy, D.R.; Zhang, H.; Ji, Z.; Wang, X.; Wang, M.; Liao, Y.P.; Chang, C.H.; Dong, J.; et al. Reduction of Acute Inflammatory Effects of Fumed Silica Nanoparticles in the Lung by Adjusting Silanol Display through Calcination and Metal Doping. *ACS Nano* **2015**, *9*, 9357–9372. [[CrossRef](#)]
60. Lee, K.P.; Kelly, D.P. Translocation of particle-laden alveolar macrophages and intra-alveolar granuloma formation in rats exposed to Ludox colloidal amorphous silica by inhalation. *Toxicology* **1993**, *77*, 205–222. [[CrossRef](#)]
61. Cho, W.S.; Choi, M.; Han, B.S.; Cho, M.; Oh, J.H.; Park, K.; Kim, S.J.; Kim, S.H.; Jeong, J. Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicol. Lett.* **2007**, *175*, 24–33. [[CrossRef](#)]
62. Han, H.Y.; Cho, J.W.; Seong, E.; Park, E.J.; Lee, G.H.; Kim, D.W.; Yang, Y.S.; Oh, J.H.; Yoon, S.; Lee, T.G.; et al. Amorphous silica nanoparticle-induced pulmonary inflammatory response depends on particle size and is sex-specific in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2020**, *390*, 114890. [[CrossRef](#)]
63. Kaewamatawong, T.; Kawamura, N.; Okajima, M.; Sawada, M.; Morita, T.; Shimada, A. Acute Pulmonary Toxicity Caused by Exposure to Colloidal Silica: Particle Size Dependent Pathological Changes in Mice. *Toxicol. Pathol.* **2005**, *33*, 745–751. [[CrossRef](#)]
64. Wang, Z.; Wang, C.; Liu, S.; He, W.; Wang, L.; Gan, J.; Huang, Z.; Wang, Z.; Wei, H.; Zhang, J.; et al. Specifically Formed Corona on Silica Nanoparticles Enhances Transforming Growth Factor β 1 Activity in Triggering Lung Fibrosis. *ACS Nano* **2017**, *11*, 1659–1672. [[CrossRef](#)]
65. Coccini, T.; Roda, E.; Barni, S.; Signorini, C.; Manzo, L. Long-lasting oxidative pulmonary insult in rat after intratracheal instillation of silica nanoparticles doped with cadmium. *Toxicology* **2012**, *302*, 203–211. [[CrossRef](#)]
66. Yang, M.; Jing, L.; Wang, J.; Yu, Y.; Cao, L.; Zhang, L.; Zhou, X.; Sun, Z. Macrophages participate in local and systemic inflammation induced by amorphous silica nanoparticles through intratracheal instillation. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 6217–6228. [[CrossRef](#)]
67. Marzaioli, V.; Gross, C.J.; Weichenmeier, I.; Schmidt-Weber, C.B.; Gutmuth, J.; Gross, O.; Alessandrini, F. Specific Surface Modifications of Silica Nanoparticles Diminish Inflammasome Activation and In Vivo Expression of Selected Inflammatory Genes. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 355. [[CrossRef](#)]
68. Wang, M.; Li, J.; Dong, S.; Cai, X.; Simaiti, A.; Yang, X.; Zhu, X.; Luo, J.; Jiang, L.H.; Du, B.; et al. Silica nanoparticles induce lung inflammation in mice via ROS/PARP/TRPM2 signaling-mediated lysosome impairment and autophagy dysfunction. *Part. Fibre Toxicol.* **2020**, *17*, 23. [[CrossRef](#)]
69. Chauhan, P.S.; Wagner, J.G.; Benninghoff, A.D.; Lewandowski, R.P.; Favor, O.K.; Wierenga, K.A.; Gilley, K.N.; Ross, E.A.; Harkema, J.R.; Pestka, J.J. Rapid Induction of Pulmonary Inflammation, Autoimmune Gene Expression, and Ectopic Lymphoid Neogenesis Following Acute Silica Exposure in Lupus-Prone Mice. *Front Immunol.* **2021**, *12*, 635138. [[CrossRef](#)]
70. Zeidler, P.C.; Hubbs, A.; Battelli, L.; Castranova, V. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J. Toxicol. Environ. Health-Part A* **2004**, *67*, 1001–1026. [[CrossRef](#)]
71. Castranova, V.; Porter, D.; Millecchia, L.; Ma, J.Y.C.; Hubbs, A.F.; Teass, A. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: Time course of pulmonary reactions. In *Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2002; pp. 177–184.
72. Bodo, M.; Baroni, T.; Bellocchio, S.; Calvitti, M.; Lilli, C.; D'Alessandro, A.; Muzi, G.; Lumare, A.; Abbritti, G. Bronchial Epithelial Cell Matrix Production in Response to Silica and Basic Fibroblast Growth Factor. *Mol. Med.* **2001**, *7*, 83–92. [[CrossRef](#)]

73. Hetland, R.B. Silica-induced cytokine release from A549 cells: Importance of surface area versus size. *Hum. Exp. Toxicol.* **2001**, *20*, 46–55. [[CrossRef](#)]
74. Øvrevik, J.; Låg, M.; Schwarze, P.; Refsnes, M. p38 and Src-ERK1/2 pathways regulate crystalline silica-induced chemokine release in pulmonary epithelial cells. *Toxicol. Sci.* **2004**, *81*, 480–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Øvrevik, J.; Refsnes, M.; Namork, E.; Becher, R.; Sandnes, D.; Schwarze, P.E.; Låg, M. Mechanisms of silica-induced IL-8 release from A549 cells: Initial kinase-activation does not require EGFR activation or particle uptake. *Toxicology* **2006**, *227*, 105–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Herseth, J.I.; Volden, V.; Schwarze, P.E.; Låg, M.; Refsnes, M. IL-1beta differently involved in IL-8 and FGF-2 release in crystalline silica-treated lung cell co-cultures. *Part. Fibre Toxicol.* **2008**, *5*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Barrett, E.G.; Johnston, C.; Oberdörster, G.; Finkelstein, J.N. Silica binds serum proteins resulting in a shift of the dose-response for silica-induced chemokine expression in an alveolar type II cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *161*, 111–122. [[CrossRef](#)]
78. Chan, J.Y.W.; Tsui, J.C.C.; Law, P.T.W.; So, W.K.W.; Leung, D.Y.P.; Sham, M.M.K.; Tsui, S.K.W.; Chan, C.W.H. RNA-Seq revealed ATF3-regulated inflammation induced by silica. *Toxicology* **2018**, *393*, 34–41. [[CrossRef](#)]
79. Mischler, S.E.; Cauda, E.G.; Di Giuseppe, M.; McWilliams, L.J.; St. Croix, C.; Sun, M.; Franks, J.; Ortiz, L.A. Differential activation of RAW 264.7 macrophages by size-segregated crystalline silica. *J. Occup. Med. Toxicol.* **2016**, *11*, 1–14. [[CrossRef](#)]
80. Magnone, M.; Sturla, L.; Jacchetti, E.; Scarfi, S.; Bruzzzone, S.; Usai, C.; Guida, L.; Salis, A.; Damonte, G.; De Flora, A.; et al. Autocrine abscisic acid plays a key role in quartz-induced macrophage activation. *FASEB J.* **2012**, *26*, 1261–1271. [[CrossRef](#)]
81. O'Reilly, K.M.A.; Phipps, R.P.; Thatcher, T.H.; Graf, B.A.; Van Kirk, J.; Sime, P.J. Crystalline and amorphous silica differentially regulate the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in pulmonary fibroblasts: Implications for pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2005**, *288*, 1010–1016. [[CrossRef](#)]
82. Choi, J.K.; Lee, S.G.; Lee, J.Y.; Nam, H.Y.; Lee, W.K.; Lee, K.H.; Kim, H.J.; Lim, Y. Silica induces human cyclooxygenase-2 gene expression through the NF- κ B signaling pathway. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2005**, *24*, 163–174. [[CrossRef](#)]
83. Koren, H.S.; Joyce, M.; Devlin, R.B.; Becker, S.; Driscoll, K.; Madden, M.C. Modulation of eicosanoid production by human alveolar macrophages exposed to silica in vitro. *Environ. Health Perspect.* **1992**, *97*, 77–83. [[CrossRef](#)]
84. Kuhn, D.C.; Demers, L.M. Effect of surfactant on basal and silica-induced eicosanoid production by the alveolar macrophage. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **1995**, *269*, L165–L170. [[CrossRef](#)]
85. Scarfi, S.; Benatti, U.; Pozzolini, M.; Clavarino, E.; Ferraris, C.; Magnone, M.; Valisano, L.; Giovine, M. Ascorbic acid-pretreated quartz enhances cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 murine macrophages. *FEBS J.* **2007**, *274*, 60–73. [[CrossRef](#)]
86. Sandberg, W.J.; Låg, M.; Holme, J.A.; Friede, B.; Gualtieri, M.; Kruszewski, M.; Schwarze, P.E.; Skuland, T.; Refsnes, M. Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 β release from macrophages. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*. [[CrossRef](#)]
87. Skuland, T.; Øvrevik, J.; Låg, M.; Refsnes, M. Role of size and surface area for pro-inflammatory responses to silica nanoparticles in epithelial lung cells: Importance of exposure conditions. *Toxicology In Vitro* **2014**, *28*, 146–155. [[CrossRef](#)]
88. Napierska, D.; Thomassen, L.C.J.; Vanaudenaerde, B.; Luyts, K.; Lison, D.; Martens, J.A.; Nemery, B.; Hoet, P.H.M. Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles: The role of size and surface area. *Toxicol. Lett.* **2012**, *211*, 98–104. [[CrossRef](#)]
89. Kasper, J.; Hermanns, M.I.; Bantz, C.; Maskos, M.; Stauber, R.; Pohl, C.; Unger, R.E.; Kirkpatrick, J.C. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: Comparison with conventional monocultures. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, 6. [[CrossRef](#)]
90. Singal, M.; Finkelstein, J.N. Amorphous silica particles promote inflammatory gene expression through the redox sensitive transcription factor, AP-1, in alveolar epithelial cells. *Exp. Lung Res.* **2005**, *31*, 581–597. [[CrossRef](#)]
91. Refsnes, M.; Skuland, T.; Lilleaas, E.; Øvrevik, J.; Låg, M. Concentration-dependent cytokine responses of silica nanoparticles and role of ROS in human lung epithelial cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *125*, 304–314. [[CrossRef](#)]
92. Låg, M.; Skuland, T.; Godymchuk, A.; Nguyen, T.H.T.; Pham, H.L.T.; Refsnes, M. Silica Nanoparticle-induced Cytokine Responses in BEAS-2B and HBEC3-KT Cells: Significance of Particle Size and Signalling Pathways in Different Lung Cell Cultures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *122*, 620–632. [[CrossRef](#)]
93. Cui, X.; Xu, R.; Zhang, H.; Peng, Z.; Feng, M.; Yu, B.; Wang, Y.; Shi, T.; Zhou, Y.; Liu, Y. Exogenous Clara cell protein 16 attenuates silica particles-induced inflammation in THP-1 macrophages by down-regulating NF-kappaB and caspase-1 activation. *J. Toxicol. Sci.* **2020**, *45*, 651–660. [[CrossRef](#)]
94. Refsnes, M.; Skuland, T.; Øvrevik, J.; Låg, M. Role of scavenger receptors in silica nanoparticle-induced cytokine responses in bronchial epithelial cells. *Toxicol. Lett.* **2021**, *353*, 100–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Peeters, P.M.; Perkins, T.N.; Wouters, E.F.M.; Mossman, B.T.; Reynaert, N.L. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Wu, R.; Högberg, J.; Adner, M.; Ramos-Ramirez, P.; Stenius, U.; Zheng, H. Crystalline silica particles cause rapid NLRP3-dependent mitochondrial depolarization and DNA damage in airway epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2020**, *17*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Cassel, S.L.; Eisenbarth, S.C.; Iyer, S.S.; Sadler, J.J.; Colegio, O.R.; Tephly, L.A.; Carter, A.B.; Rothman, P.B.; Flavell, R.A.; Sutterwala, F.S. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9035–9040. [[CrossRef](#)]

98. Porter, D.W.; Ye, J.; Barger, M.; Robinson, V.A.; Ramsey, D.; McLaurin, J.; Khan, A.; Landsittel, D.; Teass, A.; Castranova, V. Time course of pulmonary response of rats to inhalation of crystalline silica: NF- κ B activation, inflammation, cytokine production, and damage. *Inhal. Toxicol.* **2002**, *14*, 349–367. [[CrossRef](#)]
99. Tsugita, M.; Morimoto, N.; Tashiro, M.; Kinoshita, K.; Nakayama, M. SR-B1 Is a Silica Receptor that Mediates Canonical Inflammasome Activation. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1298–1311. [[CrossRef](#)]
100. Ko, J.W.; Shin, N.R.; Je-Oh, L.; Jung, T.Y.; Moon, C.; Kim, T.W.; Choi, J.; Shin, I.S.; Heo, J.D.; Kim, J.C. Silica dioxide nanoparticles aggravate airway inflammation in an asthmatic mouse model via NLRP3 inflammasome activation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2020**, *112*, 104618. [[CrossRef](#)]
101. Li, N.; Shi, F.; Wang, X.; Yang, P.; Sun, K.; Zhang, L.; Hao, X.; Li, X.; Li, J.; Jin, Y. Silica dust exposure induces pulmonary fibrosis through autophagy signaling. *Environ. Toxicol.* **2021**, *36*, 1269–1277. [[CrossRef](#)]
102. Sai, L.; Qi, X.; Yu, G.; Zhang, J.; Zheng, Y.; Jia, Q.; Peng, C. Dynamic assessing silica particle-induced pulmonary fibrosis and associated regulation of long non-coding RNA expression in Wistar rats. *Genes Environ.* **2021**, *43*, 23. [[CrossRef](#)]
103. Hindman, B.; Ma, Q. Carbon nanotubes and crystalline silica induce matrix remodeling and contraction by stimulating myofibroblast transformation in a three-dimensional culture of human pulmonary fibroblasts: Role of dimension and rigidity. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 3291–3305. [[CrossRef](#)]
104. Li, N.; Wang, L.; Shi, F.; Yang, P.; Sun, K.; Zhang, J.; Yang, X.; Li, X.; Shen, F.; Liu, H.; et al. Silica nanoparticle induces pulmonary fibroblast transdifferentiation via macrophage route: Potential mechanism revealed by proteomic analysis. *Toxicol. In Vitro* **2021**, *76*, 105220. [[CrossRef](#)]
105. Wu, Q.; Gui, W.; Jiao, B.; Han, L.; Wang, F. miR-138 inhibits epithelial-mesenchymal transition in silica-induced pulmonary fibrosis by regulating ZEB2. *Toxicology* **2021**, *461*, 152925. [[CrossRef](#)]
106. Merchant, R.K.; Peterson, M.W.; Hunninghake, G.W. Silica directly increases permeability of alveolar epithelial cells. *J. Appl. Physiol.* **1990**, *68*, 1354–1359. [[CrossRef](#)]
107. Fubini, B.; Zanetti, G.; Altiglia, S.; Tiozzo, R.; Lison, D.; Saffiotti, U. Relationship between surface properties and cellular responses to crystalline silica: Studies with heat-treated cristobalite. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 737–745. [[CrossRef](#)]
108. Emerson, R.J.; Davis, G.S. Effect of alveolar lining material-coated silica on rat alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect.* **1983**, *51*, 81–84. [[CrossRef](#)]
109. Arts, J.H.; Schijf, M.A.; Kuper, C.F. Preexposure to amorphous silica particles attenuates but also enhances allergic reactions in trimellitic anhydride-sensitized brown Norway rats. *Inhal. Toxicol.* **2008**, *20*, 935–948. [[CrossRef](#)]
110. Akhtar, M.J.; Ahamed, M.; Kumar, S.; Siddiqui, H.; Patil, G.; Ashquin, M.; Ahmad, I. Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells. *Toxicology* **2010**, *276*, 95–102. [[CrossRef](#)]
111. Fritsch-Decker, S.; Marquardt, C.; Stoeger, T.; Diabaté, S.; Weiss, C. Revisiting the stress paradigm for silica nanoparticles: Decoupling of the anti-oxidative defense, pro-inflammatory response and cytotoxicity. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 2163–2174. [[CrossRef](#)]
112. Guichard, Y.; Fontana, C.; Chavinier, E.; Terzetti, F.; Gaté, L.; Binet, S.; Darne, C. Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line. *Toxicol. Ind. Health* **2016**, *32*, 1639–1650. [[CrossRef](#)]
113. Costantini, L.M.; Gilberti, R.M.; Knecht, D.A. The phagocytosis and toxicity of amorphous silica. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e14647. [[CrossRef](#)]
114. Albrecht, C.; Borm, P.J.A.; Adolf, B.; Timblin, C.R.; Mossman, B.T. In Vitro and in Vivo Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases by Coal Dusts and Quartz Silica. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2002**, *184*, 37–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Gilberti, R.M.; Joshi, G.N.; Knecht, D.A. The phagocytosis of crystalline silica particles by macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2008**, *39*, 619–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Joshi, G.N.; Knecht, D.A. Silica phagocytosis causes apoptosis and necrosis by different temporal and molecular pathways in alveolar macrophages. *Apoptosis* **2013**, *18*, 271–285. [[CrossRef](#)]
117. Du, S.; Li, C.; Lu, Y.; Lei, X.; Zhang, Y.; Li, S.; Liu, F.; Chen, Y.; Weng, D.; Chen, J. Dioscin Alleviates Crystalline Silica-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis through Promoting Alveolar Macrophage Autophagy. *Theranostics* **2019**, *9*, 1878–1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Wu, Q.; Xu, T.; Liu, Y.; Li, Y.; Yuan, J.; Yao, W.; Xu, Q.; Yan, W.; Ni, C. miR-1224-5p Mediates Mitochondrial Damage to Affect Silica-Induced Pulmonary Fibrosis by Targeting BECN1. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2357. [[CrossRef](#)]
119. Li, W.; Xie, L.; Ma, J.; Cheng, M.; Fan, L.; Xu, Y.; Wang, B.; Chen, W. Gas6 or Mer deficiency ameliorates silica-induced autophagosomes accumulation in mice lung. *Toxicol. Lett.* **2021**, *337*, 28–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Almasi, S.; Kennedy, B.E.; El-Aghil, M.; Sterea, A.M.; Gujar, S.; Partida-Sanchez, S.; El Hiani, Y. TRPM2 channel-mediated regulation of autophagy maintains mitochondrial function and promotes gastric cancer cell survival via the JNK-signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 3637–3650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Obata, Y.; Morimoto, Y.; Hirohashi, M.; Ogami, A.; Oyabu, T.; Myojo, T.; Kawanami, S.; Horie, S.; Nagatomo, H.; Murakami, M.; et al. Expression of heme oxygenase-1 in the lungs of rats exposed to potassium octatitanate whiskers. *J. Occup. Health* **2011**, *53*, 267–273. [[CrossRef](#)]
122. Deshpande, A.; Narayanan, P.K.; Lehnert, B.E. Silica-induced generation of extracellular factor(s) increases reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Sci.* **2002**, *67*, 275–283. [[CrossRef](#)]

123. Decan, N.; Wu, D.; Williams, A.; Bernatchez, S.; Johnston, M.; Hill, M.; Halappanavar, S. Characterization of in vitro genotoxic, cytotoxic and transcriptomic responses following exposures to amorphous silica of different sizes. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagenes.* **2016**, *796*, 8–22. [[CrossRef](#)]
124. Joshi, G.N.; Goetjen, A.M.; Knecht, D.A. Silica particles cause NADPH oxidase-independent ROS generation and transient phagolysosomal leakage. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 3150–3164. [[CrossRef](#)]
125. Eom, H.J.; Choi, J. Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol In Vitro* **2009**, *23*, 1326–1332. [[CrossRef](#)]
126. Zhao, X.; Abulikemu, A.; Lv, S.; Qi, Y.; Duan, J.; Zhang, J.; Chen, R.; Guo, C.; Li, Y.; Sun, Z. Oxidative stress- and mitochondrial dysfunction-mediated cytotoxicity by silica nanoparticle in lung epithelial cells from metabolomic perspective. *Chemosphere* **2021**, *275*, 129969. [[CrossRef](#)]
127. Lu, C.F.; Yuan, X.Y.; Li, L.Z.; Zhou, W.; Zhao, J.; Wang, Y.M.; Peng, S.Q. Combined exposure to nano-silica and lead induced potentiation of oxidative stress and DNA damage in human lung epithelial cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *122*, 537–544. [[CrossRef](#)]
128. Zhao, Y.; Hao, C.; Bao, L.; Wang, D.; Li, Y.; Qu, Y.; Ding, M.; Zhao, A.; Yao, W. Silica particles disorganize the polarization of pulmonary macrophages in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *193*. [[CrossRef](#)]
129. Tamok, A.; Schluter, T.; Berg, I.; Gercken, G. Silica induces changes in cytosolic free calcium, cytosolic pH, and plasma membrane potential in bovine alveolar macrophages. *Anal Cell Pathol* **1997**, *15*, 61–72. [[CrossRef](#)]
130. Hoppstadter, J.; Seif, M.; Dembek, A.; Cavelius, C.; Huwer, H.; Kraegeloh, A.; Kiemer, A.K. M2 polarization enhances silica nanoparticle uptake by macrophages. *Front Pharm.* **2015**, *6*, 55. [[CrossRef](#)]
131. Sanchez, A.; Alvarez, J.L.; Demydenko, K.; Jung, C.; Alpizar, Y.A.; Alvarez-Collazo, J.; Cokic, S.M.; Valverde, M.A.; Hoet, P.H.; Talavera, K. Silica nanoparticles inhibit the cation channel TRPV4 in airway epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 43. [[CrossRef](#)]
132. Ma, J.; Xu, Y.; Li, W.; Zhou, Y.; Wang, D.; Yang, M.; Wang, B.; Chen, W. High-mobility group box 1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in crystalline silica induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Toxicol. Lett.* **2020**, *330*, 134–143. [[CrossRef](#)]
133. Rong, Y.; Shen, Y.; Zhang, Z.; Cui, X.; Xiao, L.; Liu, Y.; Luo, X.; Chen, W. Blocking TGF- β expression inhibits silica particle-induced epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *40*, 861–869. [[CrossRef](#)]
134. Hu, Y.B.; Li, F.F.; Deng, Z.H.; Pan, P.H. Transcriptional factor snail mediates epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells induced by silica. *Biomed. Environ. Sci.* **2015**, *28*, 544–548. [[CrossRef](#)]
135. Zhao, Q.; Li, Y.; Chai, X.; Geng, Y.; Cao, Y.; Xu, L.; Zhang, L.; Huang, J.; Ning, P.; Tian, S. Interaction of pulmonary surfactant with silica and polycyclic aromatic hydrocarbons: Implications for respiratory health. *Chemosphere* **2019**, *222*, 603–610. [[CrossRef](#)]
136. Presume, M.; Simon-Deckers, A.; Tomkiewicz-Raulet, C.; Le Grand, B.; Tran Van Nhieu, J.; Beaune, G.; Duruphty, O.; Doucet, J.; Coumoul, X.; Pairon, J.C.; et al. Exposure to metal oxide nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary effects in mice. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 1535–1544. [[CrossRef](#)]
137. Di Cristo, L.; Bocconi, F.; Iavicoli, S.; Sabella, S. A Human-Relevant 3D In Vitro Platform for an Effective and Rapid Simulation of Workplace Exposure to Nanoparticles: Silica Nanoparticles as Case Study. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1761. [[CrossRef](#)]
138. Murugadoss, S.; van den Brule, S.; Brassinne, F.; Sebaihi, N.; Mejia, J.; Lucas, S.; Petry, J.; Godderis, L.; Mast, J.; Lison, D.; et al. Is aggregated synthetic amorphous silica toxicologically relevant? *Part. Fibre Toxicol.* **2020**, *17*, 1. [[CrossRef](#)]
139. Asgharian, B.; Owen, T.P.; Kuempel, E.D.; Jarabek, A.M. Dosimetry of inhaled elongate mineral particles in the respiratory tract: The impact of shape factor. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2018**, *361*, 27–35. [[CrossRef](#)]
140. Kankala, R.K.; Han, Y.H.; Xia, H.Y.; Wang, S.B.; Chen, A.Z. Nanoarchitected prototypes of mesoporous silica nanoparticles for innovative biomedical applications. *J. Nanobiotechnol.* **2022**, *20*, 126. [[CrossRef](#)]
141. Bavestrello, G.; Benatti, U.; Cattaneo-Vietti, R.; Cerrano, C.; Giovine, M. Sponge cell reactivity to various forms of silica. *Microsc. Res. Tech.* **2003**, *62*, 327–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Pavan, C.; Delle Piane, M.; Gullo, M.; Filippi, F.; Fubini, B.; Hoet, P.; Horwell, C.J.; Huaux, F.; Lison, D.; Lo Giudice, C.; et al. The puzzling issue of silica toxicity: Are silanols bridging the gaps between surface states and pathogenicity? *Part. Fibre Toxicol.* **2019**, *16*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Chen, S.; Yuan, J.; Yao, S.; Jin, Y.; Chen, G.; Tian, W.; Xi, J.; Xu, Z.; Weng, D.; Chen, J. Lipopolysaccharides may aggravate apoptosis through accumulation of autophagosomes in alveolar macrophages of human silicosis. *Autophagy* **2015**, *11*, 2346–2357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Debia, M.; Bakhiyi, B.; Ostiguy, C.; Verbeek, J.H.; Brouwer, D.H.; Murashov, V. A Systematic Review of Reported Exposure to Engineered Nanomaterials. *Ann. Occup. Hyg.* **2016**, *60*, 916–935. [[CrossRef](#)]
145. Ding, Y.; Kuhlbusch, T.A.J.; Van Tongeren, M.; Jimenez, A.S.; Tuinman, I.; Chen, R.; Alvarez, I.L.; Mikolajczyk, U.; Nickel, C.; Meyer, J.; et al. Airborne engineered nanomaterials in the workplace—a review of release and worker exposure during nanomaterial production and handling processes. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *322*, 17–28. [[CrossRef](#)]
146. Elihn, K.; Berg, P. Ultrafine particle characteristics in seven industrial plants. *Ann. Occup. Hyg.* **2009**, *53*, 475–484. [[CrossRef](#)]
147. Fruijtier-Polloth, C. The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-a nanostructured material. *Toxicology* **2012**, *294*, 61–79. [[CrossRef](#)]

Introduction

Toxicologie in vivo et in vitro de la silice en fonction de la structure et de la taille

148. Porter, D.W.; Barger, M.; Robinson, V.A.; Leonard, S.S.; Landsittel, D.; Castranova, V. Comparison of low doses of aged and freshly fractured silica on pulmonary inflammation and damage in the rat. *Toxicology* **2002**, *175*, 63–71. [[CrossRef](#)]
149. Schulte, P.A.; Leso, V.; Niang, M.; Iavicoli, I. Current state of knowledge on the health effects of engineered nanomaterials in workers: A systematic review of human studies and epidemiological investigations. *Scand. J. Work Environ. Health* **2019**, *45*, 217–238. [[CrossRef](#)]
150. Fede, C.; Selvestrel, F.; Compagnin, C.; Mognato, M.; Mancin, F.; Reddi, E.; Celotti, L. The toxicity outcome of silica nanoparticles (Ludox(R)) is influenced by testing techniques and treatment modalities. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 1789–1802. [[CrossRef](#)]

I.5 Métrologie

Au vu des effets retrouvés chez l'Homme et dans les études toxicologiques, il apparaît essentiel d'effectuer une métrologie afin de bien caractériser et mesurer les aérosols particuliers composés de SiO₂ auxquels sont potentiellement exposés les travailleurs, ceci afin de mieux comprendre et prévenir les risques liés aux situations d'exposition dans de nombreux secteurs d'activités.

I.5.1 Généralités

Il a en effet été vu précédemment que lors de l'inhalation, ces particules pouvaient pénétrer au sein des fosses nasales et se déposer jusqu'aux bronchioles voire alvéoles pour une fraction plus ou moins importante en fonction notamment du D_{ae} (23,24). Par ailleurs, l'Homme ayant un mode de ventilation mixte (nasale et/ou orale), ce paramètre peut également influencer la déposition des particules. Afin de caractériser les fractions potentiellement inhalées, trois fractions conventionnelles (issues d'un consensus international établi dans la norme NF EN 481:1993) ont été décrites en hygiène du travail (**Figure 12**) : les fractions alvéolaire, thoracique et inhalable (65).

- La fraction alvéolaire correspond à la fraction massique des particules contenues dans l'air inférieures à 10 µm et pouvant atteindre pour certaines les voies respiratoires non ciliées, c'est-à-dire les bronchioles terminales et alvéoles.
- La fraction thoracique est utilisée pour décrire la fraction massique de particules contenues dans l'air inférieures à 30 µm pouvant aller au-delà du larynx et inclut ainsi la fraction alvéolaire.
- Enfin, la fraction inhalable correspond à la fraction massique de particules contenues dans l'air inférieur à 100 µm pouvant être inhalées par le nez et la bouche, incluant ainsi les deux fractions précédentes.

Introduction Métrologie

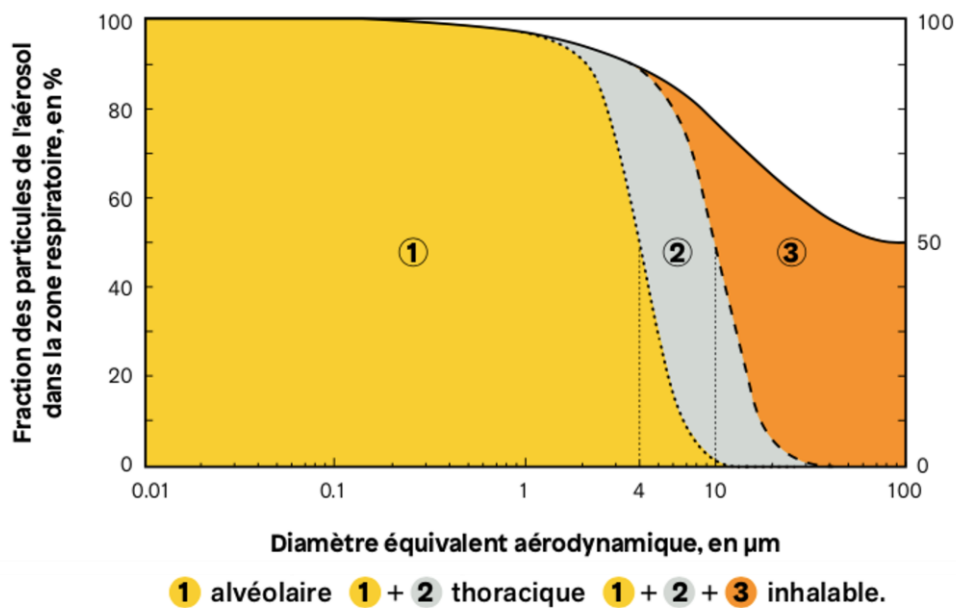


Figure 12 : Représentation des fractions conventionnelles utilisées en hygiène du travail, d'après (65).

La fraction à considérer dépend intrinsèquement des caractéristiques de l'aérosol et de sa déposition dans les voies respiratoires. Ainsi, au vu de la déposition importante et des effets localisés des particules de SiO₂ dans la région alvéolaire, la fraction alvéolaire est celle la plus souvent retenue pour l'analyse des aérosols contenant de la silice.

Néanmoins, les différentes fractions ne représentent pas la totalité de l'aérosol déposé dans les voies respiratoires, car, pour rappel, le D_{ae} des particules et le mode de ventilation du sujet exposé (nasale et/ou buccale) influent la probabilité de déposition. Il est donc important de faire la distinction entre un aérosol émis et un aérosol déposé. Pour cela, un modèle de prédiction (**Figure 13**) a été proposé afin d'estimer le pourcentage de dépôt au sein des 3 différentes régions de l'appareil respiratoire (régions extra-thoracique, trachéo-bronchique et alvéolaire). Par exemple, pour un aérosol émis dont les particules ont un D_{ae} de 100 nm, l'aérosol déposé dans les voies respiratoires représentera 25% de l'aérosol émis avec une majorité des particules déposées dans la région alvéolaire. On pourrait donc penser que plus la taille des particules diminue, et plus leur déposition totale est représentée majoritairement par la région alvéolaire. Pourtant, cette tendance ne s'applique en revanche plus pour les particules de très petite taille ($D_{ae} < 10$ nm environ) qui sont déposées à hauteur de 30% dans les 3 régions suivant donc une autre modalité de dépôt en raison de leur important mouvement Brownien.

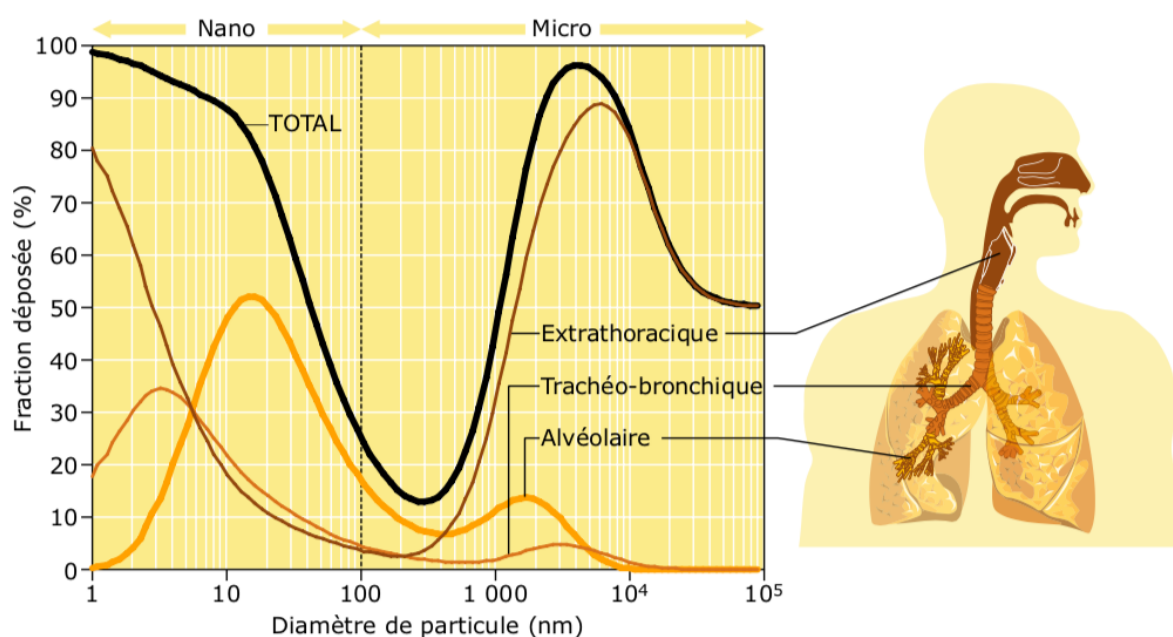


Figure 13 : Prédiction de la déposition totale et régionale des particules en fonction leur taille (micrométrique ou nanométrique) et du mode de respiration (nasale et/ou orale) dans les différentes régions de l'appareil respiratoire chez l'Homme, d'après (65).

1.5.2 Dispositifs de caractérisation

Les dispositifs de caractérisation des aérosols permettent d'obtenir des informations en temps réel (quantitatives), c'est-à-dire au moment de la collecte et en temps différé (quantitatives et qualitatives). Le principe de détection des particules est basé sur leurs propriétés physiques.

Bien que tous les dispositifs ci-après soient complémentaires et permettent une caractérisation quantitative et qualitative des aérosols, il existe une difficulté d'analyse en raison des potentielles variations des aérosols dans le temps et dans l'espace. En effet, la nature de l'aérosol peut varier en fonction des conditions météorologiques telles que la température, l'hygrométrie, la présence de vent et de précipitations.

1.5.2.1 Dispositifs de caractérisation en temps réel

En temps réel, les dispositifs de caractérisation permettent une estimation de la concentration particulaire d'un aérosol (en masse ou en nombre) au moment de la collecte en direct. Il est à noter que ces dispositifs n'ont aucune spécificité sur la nature chimique des

Introduction Métrologie

particules comptées. A titre d'exemple, les photomètres laser sont des appareils permettant une estimation de la concentration en masse de particules en mg/m^3 . Le principe de détection consiste en une diffusion de la lumière sur les particules au sein de l'aérosol. Les compteurs de noyaux de condensation (CNC) sont des appareils permettant une estimation de la concentration en nombre (#) de particules/ cm^3 , soit en $\#/\text{cm}^3$. Le principe de détection consiste en une condensation de vapeur à la surface des particules en vue d'une identification optique (66). Par ailleurs, il existe également des appareils donnant une indication à la fois sur la concentration en nombre ($\#/\text{cm}^3$) et sur la taille moyenne des particules contenues dans un aérosol. C'est le cas par exemple du DisCMini® dont le principe consiste en une mesure de courants issus de la collecte de particules de taille inférieure à 700 nm préalablement chargées. Cet appareil permet en effet de mesurer des concentrations d'aérosols contenant entre 10^3 et 10^6 $\#/\text{cm}^3$ mais aussi de donner une indication sur la taille moyenne pour des particules ayant un diamètre entre 20 et 300 nm, rang de taille des particules présentes dans la fraction alvéolaire. Cette détection simultanée permet alors de déterminer une grandeur en lien avec la surface des particules que l'on appelle LDSA (Lung Deposited Surface Area) ou surface spécifique des particules pouvant se déposer dans le poumon humain. Cette grandeur donne une indication sur le diamètre moyen d'une particule multiplié par la probabilité de dépôt dans la région alvéolaire (67).

1.5.2.2 Dispositifs d'échantillonnage pour une caractérisation en temps différé

Pour les analyses en temps différé, l'échantillon prélevé sur un support doit être représentatif de l'aérosol d'intérêt, en vue de réaliser une caractérisation ultérieure en laboratoire. Cette caractérisation physico-chimique permet de déterminer essentiellement la taille, la morphologie et la nature chimique élémentaire, ainsi qu'une quantification ou semi-quantification des particules contenues dans l'aérosol. Les dispositifs d'échantillonnage sont choisis selon la fraction à prélever puis à analyser (68–70).

Pour prélever la fraction inhalable de l'aérosol, la cassette fermée est un des dispositifs les plus couramment utilisés. Cette cassette contient, en fonction du type d'analyse prévue un filtre, une membrane ou une capsule et est couplée à une pompe de prélèvement réglée sur

Introduction Métrologie

un débit de 2L/min selon la norme NF EN ISO 13137. Il est à noter que si l'aérosol est trop chargé en particules, la pompe peut alors être réglée à 1L/min afin de ne pas saturer le prélèvement (71).

Quant aux prélèvements des fractions thoraciques et alvéolaires, il est possible d'utiliser un dispositif séparant les particules d'un aérosol en fonction de leur D_{ae} : comme un cyclone. Au sein du cyclone, les fines particules sont collectées à l'aide d'un vortex ascendant sur une cassette placée sur la partie supérieure tandis que les plus grosses particules sont entraînées vers la partie inférieure par une force centrifuge. A l'inverse du couplage cassette-pompe de prélèvement où le débit est établi selon la norme NF EN ISO 13137, les pompes de prélèvement couplées aux cyclones n'ont pas de débit exigé. En effet, lorsque le but est de cibler la fraction alvéolaire, les débits d'aspiration peuvent être réglés de manière entre 1,7 et 8,5L/min selon les dispositifs afin de collecter le maximum d'échantillon (72).

Une des principales contraintes des dispositifs précédents est leur taille rendant leur mise en place compliquée pour des prélèvements individuels. Plus récemment, un dispositif de prélèvement de taille ciblant uniquement la fraction alvéolaire de l'aérosol a été créé : le Particlever®. Ce dispositif de petit format (250g) particulièrement adapté aux prélèvements individuels intègre une cassette contenant un filtre Nucléopore® et une pompe avec un débit autorégulé (1L/min) (73).

I.5.3 Techniques d'analyse des aérosols

Une fois prélevé, la taille et la morphologie d'un aérosol peuvent être observées en ME (microscopie électronique) à transmission (MET) ou à balayage (MEB). Tandis que le MET permet d'avoir une résolution plus fine des particules à l'échelle nanométrique, le MEB permet quant à lui d'avoir une représentation plus réaliste de la morphologie des particules. Ces analyses peuvent s'effectuer selon deux méthodes :

- Directe, lorsque l'observation est effectuée à même le filtre de prélèvement.
- Indirecte, lorsque le prélèvement requiert un traitement préalable, cela peut nécessiter une destruction du filtre de prélèvement pour un transfert vers un autre filtre ou une pastille.

Afin d'obtenir des informations sur la nature chimique, ces observations peuvent être couplées à une analyse, soit par DRX (diffraction des rayons X), soit par spectrométrie IRTF (infrarouge à transformée de Fourier). La DRX est particulièrement utilisée pour la détection du SiO₂, car la diffraction des rayons sur les particules permet d'en confirmer la structure cristalline.

I.6 Réglementation

Les données obtenues en métrologie sont à mettre en parallèle avec les normes établies. Ces normes sont le plus souvent déterminées grâce aux données toxicologiques d'une substance afin d'établir une dose toxicologique acceptable pour l'Homme.

I.6.1 Généralités

I.6.1.1 Code du travail

D'après la définition Code du travail (article R4412-4) « *on entend par valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP), sauf indication contraire, la limite de la moyenne pondérée en fonction du temps de la concentration d'un agent chimique dangereux dans l'air de la zone de respiration d'un travailleur au cours d'une période de référence déterminée* » (74). Dans cette définition, il est à noter deux éléments importants pour le calcul de la VLEP.

D'une part, « *la concentration d'un agent chimique dangereux dans l'air de la zone de respiration d'un travailleur* » qui correspond à la fraction de déposition pulmonaire. Pour un aérosol particulaire, celle-ci peut donc représenter la fraction inhalable, thoracique ou alvéolaire. Cette concentration peut être exprimée en masse (mg/m^3), en volume (ppm ou parties par million) ou en fibres par centimètres cubes d'air (f/cm^3).

D'autre part, la période de référence déterminée qui correspond soit à une durée de 15 minutes pour une VLEP à court terme, soit à une durée de 8 heures pour une VLEP journalière. Alors que les VLEP à court terme sont destinées à protéger le travailleur vis-à-vis d'un potentiel pic d'exposition, les VLEP journalières sont quant à elles destinées à le protéger vis-à-vis d'une exposition prolongée à moyen et long terme.

Par ailleurs, le Code du travail introduit également une distinction entre une VLEP contraignante (article R4412-149) et une VLEP indicative (article R4412-150). Une VLEP contraignante est fixée par décret désigne une VLEP obligatoire pour laquelle l'employeur peut être sanctionné en cas de non-respect (75). A l'inverse une VLEP indicative est fixée par arrêté désigne une VLEP donnée à titre préventif (76).

I.6.1.2 Fixation et modification des VLEP

Lorsqu'une VLEP est fixée par le Ministère du Travail, celle-ci n'est pas définitive, mais évolutive. En effet, une démarche en 3 phases, impliquant différents acteurs, peut venir conforter ou réviser ces VLEP. Tout d'abord, l'ANSES se charge d'établir une expertise basée sur les données scientifiques disponibles. Un projet réglementaire est alors établi par le Ministère du Travail qui consulte enfin le Conseil d'Orientation sur les Conditions de Travail (COCT) sur la faisabilité de la mise en œuvre d'une éventuelle VLEP nouvelle sur le terrain (65,77).

I.6.1.3 Mesures de protection

Au minimum une fois par an, un organisme accrédité par le COFRAC (COmité FRançais d'ACcréditation) contrôle le respect des VLEP contraignantes et indicatives. Ces résultats sont ensuite saisis dans une base de données publique SCOLA (Système de COLlecte des informations des organismes Accrédités) (78,79).

Bien que ces valeurs soient respectées, le but est de réduire l'exposition du travailleur au plus bas niveau possible. Cela s'accompagne donc de la mise en place par l'employeur de mesures de protection collectives en premier lieu, et/ou individuelles en second lieu si les mesures collectives sont insuffisantes (47). Concernant les mesures de protection collectives, il peut s'agir par exemple pour le risque d'exposition aux poussières, d'installations de captage à la source, de ventilation et de travail à l'humide. Au niveau individuel, il s'agit par exemple de vêtements et de masques respiratoires de protection adaptés vis-à-vis du risque d'exposition.

I.6.2 Cas des VLEP appliquées aux silices cristalline et amorphe

Conformément à ses effets cancérigènes connus de la silice cristalline et son classement par le CIRC et l'UE, il existe une VLEP contraignante et spécifique pour chaque type de silice cristalline. Ainsi, la VLEP journalière pour les poussières alvéolaires de quartz est fixée à $0,1\text{mg}/\text{m}^3$ et celle pour les poussières alvéolaires de tridymite et de cristobalite à $0,05\text{mg}/\text{m}^3$ (80). A l'échelle internationale, la plupart des pays ont également une VLEP spécifique pour la silice cristalline (**Figure 14**).

Concernant les silices amorphes, les effets spécifiques encore peu documentés incluent cette structure pour l'instant dans la VLEP des poussières alvéolaires dites sans effet spécifique (PSES), mais sans inclure les formes nanoparticulaires. Il s'agit d'une VLEP contraignante mais qui regroupe toutes les substances classées par défaut, les données actuelles ne mettant en évidence aucun effet connu excepté une surcharge pulmonaire. Il est néanmoins à noter que ce classement est susceptible d'être revu si des effets spécifiques sont démontrés. En France, la VLEP journalière pour les PSES était de $5\text{mg}/\text{m}^3$ pour la fraction alvéolaire (81). Néanmoins, cette valeur non révisée depuis presque 30 ans et correspondant à des niveaux d'empoussièrement excessifs selon de nombreux professionnels en hygiène du travail a conduit l'ANSES à réviser cette VLEP en 2019 (82). Brièvement, cette révision a consisté en une revue des expertises faites par les commissions dans d'autres pays (MAK en Allemagne, HSE au Royaume-Uni ou encore NIOSH aux États-Unis) et a *in fine* abouti au choix d'abaisser la VLEP journalière pour les PSES à $0,9\text{mg}/\text{m}^3$ pour la fraction alvéolaire (83). Cette VLEP devra entrer en vigueur dès le 1^{er} juillet 2023. D'ici là, l'abaissement de la VLEP s'effectue sur une période transitoire depuis le 1^{er} janvier 2022 avec une VLEP journalière pour les PSES à $3,5\text{mg}/\text{m}^3$. A l'échelle internationale et à titre indicatif, la VLEP journalière des PSES, VLEP applicable pour les silices amorphes, sont également données dans la **Figure 14**.

Introduction Réglementation

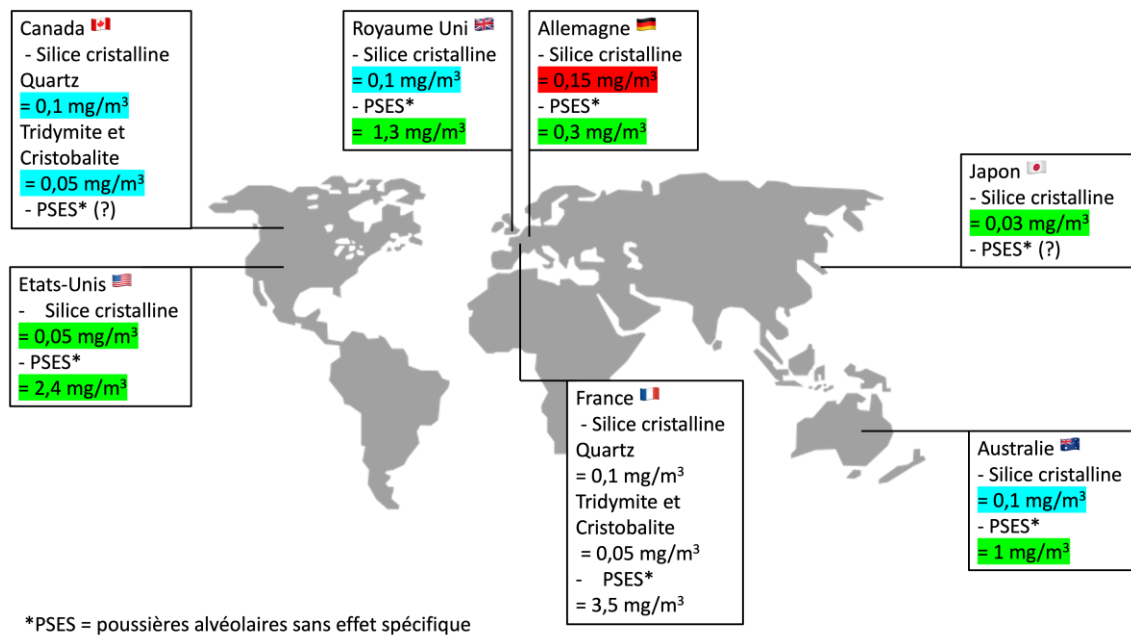


Figure 14 : Représentation des VLEP journalières pour la silice cristalline et les poussières dites sans effet spécifiques dans certains pays (Royaume Uni, Allemagne, Canada, États-Unis, Japon et Australie) en comparaison avec les VLEP françaises d'après (10,82). Le code couleur **vert**, **bleu** ou **rouge** désigne les pays pour lesquelles les VLEP sont respectivement inférieures, égales ou supérieures aux VLEP françaises actuelles. Pour rappel, les VLEP françaises actuelles (2022) sont fixées à 0,1mg/m³ pour le quartz, à 0,05mg/m³ pour la tridymite et la cristobalite et à 3,5mg/m³ pour les PSES.

I.6.3 Limites

Bien que de nombreuses entités nationales et internationales à l'origine de textes réglementaires visent à protéger les travailleurs des risques d'exposition aux poussières, notamment alvéolaires dans le cas des particules de silices cristalline et amorphe, il existe néanmoins de nombreuses limites rendant la protection des travailleurs encore insuffisante. D'une part, il est à noter que la plupart des VLEP sont établies à la suite des études toxicologiques réalisées chez l'animal et donc que ces données ne sont pas parfaitement transposables à l'Homme. D'autre part, la réglementation européenne REACH (qui régit l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des produits chimiques) s'applique uniquement aux NP manufacturées et n'intègre ni les PUF ni les agrégats ou agglomérats de particules nanométriques. Néanmoins, des recommandations émanent des experts de l'ANSES et de l'Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS) pour établir des VLEP spécifiques

Introduction

Réglementation

à certaines NP, notamment pour les NP de dioxyde de titane (TiO₂) (84,85) et les NP de noir de carbone (86) sans encore à l'heure actuelle de positionnement concernant une éventuelle VLEP spécifique aux NP de silice amorphe.

I.7 Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice

I.7.1 Généralités

D'après le sous-chapitre I.2 - Caractéristiques physico-chimiques de la silice et ses principales sources d'exposition, le secteur du Bâtiment et Travaux Publics (BTP) est manifestement le secteur professionnel le plus important de production, d'exploitation ou d'émission de la silice sous toutes ses formes : cristalline et amorphe, d'origine naturelle ou synthétique. En France, les données les plus récentes évaluent à 1 402 456 emplois dont 941 642 ouvriers (soit 67,1%) dans ce secteur en 2021. Dans les autres catégories socioprofessionnelles, sont retrouvés 22,9% de techniciens et agents de maîtrise et 10% d'ingénieurs assimilés cadres. La catégorie d'âge la plus largement représentée se situe parmi les 35-39 ans avec 167 442 hommes et 23 653 femmes. Il est donc à noter une surreprésentation de la population masculine chez les travailleurs de ce secteur en France (environ 88% des salariés). En terme démographique, l'Ile-de-France est la région comptant le plus de salariés avec 305 360 salariés soit 22,7% des travailleurs du BTP (87).

Ce secteur professionnel est non délocalisable, excepté sur deux points. Tout d'abord, la main d'œuvre peut être issue d'autres pays notamment de l'Union Européenne (UE), c'est le cas pour les travailleurs détachés. Par ailleurs, il est possible d'importer des matériaux fabriqués dans d'autres pays de l'UE ou hors UE. Le secteur du BTP se divise en deux parties : une partie regroupant les métiers du Bâtiment et une autre regroupant les métiers des Travaux Publics.

Les métiers du Bâtiment sont reliés à toutes les activités de construction d'un édifice, son aménagement intérieur, son entretien, sa restauration ou sa démolition. Ces activités peuvent se diviser en deux grandes catégories : le gros œuvre et le second œuvre. Le gros œuvre correspond à la mise en place des bases d'un édifice : fondations, murs porteurs et charpentes. Vient ensuite la catégorie du second œuvre comprenant les activités d'aménagement et de finitions ainsi que celles sur l'enveloppe extérieure (toitures) (88).

Les métiers des Travaux Publics sont quant à eux reliés à toutes les activités participant à la construction et l'entretien d'infrastructures. Ces infrastructures peuvent représenter les aménagements urbains, les routes, les voies ferrées, les souterrains, les éclairages publics et

Introduction

Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice

canalisations, ainsi que les ouvrages d'art et de génie civil (ponts, barrages, centrales nucléaires, réservoirs, pistes d'aéroport par exemple) (89).

1.7.2 Silice cristalline ou amorphe dans les matériaux de construction

Comme vu précédemment, les silices cristallines et amorphes sont omniprésentes dans le secteur de la construction, notamment au sein des matériaux de construction. Les parties ci-après détailleront les caractéristiques plus précises (lorsque les données sont disponibles) de la silice contenue dans ces matériaux, avec une distinction entre les matériaux de construction nanostructurés ou non.

1.7.2.1 Matériaux de construction non nanostructurés contenant de la silice

1.7.2.1.1 Silice cristalline

Dans le secteur de la construction, les carrières permettent l'extraction des sables, des roches siliceuses (grès, silex) ou encore granit en vue de leur exploitation pour des matériaux de construction. Par exemple, l'extraction de l'argile ($\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$) sera ensuite exploitée comme matière première dans les cimenteries. Au sein même des activités du BTP, le quartz est le composant de nombreux matériaux utilisés tels que les bétons, les ciments et les céramiques (carrelage, brique ou tuiles). Si les matériaux directement extraits dans les carrières (sable, grès, silex, granit) contiennent plus de 50% de silice libre, la teneur dans un matériau transformé varie de 10 à 50% par exemple dans l'ardoise, le béton, la brique et le mortier, à moins de 10% dans le ciment. Par ailleurs, le quartz et la cristobalite sont aussi utilisés comme agent de charge dans les peintures.

Parmi les SAS, on retrouve les diatomites calcinées (par flux ou non), très utilisées dans le secteur de la construction comme isolants.

1.7.2.1.2 Silice amorphe

Les diatomites peuvent être utilisées comme agent de charge dans les peintures mais aussi comme isolants.

Introduction

Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice

Sous-produit de la métallurgie, les fumées de silice, rejetées dans l'atmosphère jusque dans les années 1980, sont de nos jours exploitées dans le secteur du BTP. Celles-ci sont incorporées dans les bétons à haute performance, car elles possèdent des propriétés de fluidité, de résistance à la compression et de diminution de la perméabilité.

I.7.2.2 Matériaux de construction nanostructurés contenant de la silice

I.7.2.2.1 Silice cristalline

A ce jour et à notre connaissance, il n'existe pas de matériaux de construction incorporants de la silice cristalline à l'échelle nanométrique.

I.7.2.2.2 Silice amorphe

Dans le secteur de la construction, les SAS obtenues par voie humide sont largement utilisées comme agent de charge. Les NP de silices colloïdales par exemple sont retrouvées dans les vernis et peintures et les silices précipitées dans les bétons projetés. Par ailleurs, en raison de leurs propriétés antisalissantes et antistatiques, les silices colloïdales sont ajoutées à de nombreux revêtements de sols. Enfin, les gels de silice peuvent avoir une application dans l'isolation thermique et phonique. Concernant les SAS obtenues par voie thermique, les NP de silices pyrogénées sont largement utilisées comme agent de charge dans les peintures, mais aussi comme charge de renforcement dans les élastomères et matériaux siliconés.

Introduction
Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice

Tableau 3 : Tableau résumant les applications et matériaux dans le secteur de la construction à base de silices cristallines et amorphes (9–11,13)

Structure		Cristalline		Amorphe				
Origine	Naturelle	Synthétique	Naturelle	SAS (voie humide)			SAS (voie thermique)	
Type	Quartz	Diatomites (calcinées ± flux)	Diatomites	Colloïdales	Précipitées	Gels de silice	Pyrogénées	Fumées de silice
Taille	µm	µm - nm	µm	µm - nm	nm	nm	nm	µm - nm
Construction	Extraction des sables et roches siliceuses (carrières) Préparation matières premières (cimenteries) Mise en œuvre des matériaux (bétons, ciments, céramiques) Agents de charge (peintures)	Isolants	Agents de charge (peintures) Isolants	Agents de charge (vernis, peintures) Revêtements des sols (propriétés antialissantes et antistatiques)	Agents de charge (bétons projetés)	Isolants thermiques et phoniques	Agents de charge (peintures) Charges de renforcement (élastomères, silicones)	Incorporé dans les bétons à haute performance (propriétés de fluidité, résistance à la compression et diminution de la perméabilité)

Introduction

Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice

I.7.3 Situations à risque d'exposition

Concernant la silice cristalline, une grande partie du rapport d'expertise collective de l'ANSES a porté sur l'évaluation des situations d'expositions professionnelles en France (10).

Une étude de filière a notamment permis de faire une synthèse des secteurs d'activité potentiellement concernés par les expositions à la silice cristalline. Il a ainsi été mis en évidence que dans les cimenteries, les tâches telles que la préparation de matières premières (par exemple l'argile, le sable, le calcaire, les diatomites calcinées) et du ciment, mais aussi le chargement et déchargement du ciment représentent des tâches à risque d'émission de silice cristalline. Dans le secteur du BTP, l'émission de silice cristalline implique ici de nombreuses tâches telles que le décapage abrasif au jet de sable, les opérations mécaniques sur le béton, l'excavation, la construction de tunnel et autoroutes, la fabrication de béton et de macadam, la maçonnerie ou encore la démolition. Les sources de silice cristalline sont nombreuses dans les tâches citées, car la silice provenant de multiples matériaux tels que le béton, le macadam, le sable, la pierre, la brique, le parpaing, le mortier, la roche et le sol.

Par ailleurs, un travail méthodique a consisté en une identification des sources d'exposition à partir des données d'exposition recensées entre 2007 et 2016 issues des bases SCOLA et COLCHIC (base de données d'exposition professionnelle aux agents chimiques et biologiques) et des données de population issues des enquêtes SUMER (Surveillance Médicale des Expositions des salariés aux Risques professionnels). Une caractérisation des expositions professionnelles a ensuite été réalisée en croisant les données d'exposition avec les données de population et a conclu qu'au total, 23 000 à 30 000 travailleurs ont été exposés à des seuils supérieurs à la VLEP du quartz ($0,1\text{mg}/\text{m}^3$). De plus, environ 2/3 de ces travailleurs étaient issus du secteur du BTP confirmant que ce secteur figure bien parmi ceux les plus à risque. De cette caractérisation méthodique a abouti plusieurs recommandations des experts. D'une part, en matière de prévention et de maîtrise des expositions, une recommandation a été faite pour la révision des VLEP de la silice cristalline. D'autre part, il a été souligné une nécessité d'améliorer les connaissances en documentant davantage les secteurs peu investigués (par exemple la mise en œuvre de pierre reconstituée), mais aussi en mettant au point des méthodes pour prélever les particules en fonction de leur granulométrie.

Introduction

Bâtiment et Travaux Publics, un secteur professionnel à risque d'exposition à la silice

Concernant les silices amorphes, il n'existe pas à ce jour de données de terrain, mais il apparaît vraisemblable qu'il y a une exposition non négligeable, voire importante, aux silices amorphes compte tenu de leur emploi croissant dans de nombreux matériaux nanostructurés ou non du BTP. A ce propos, le Plan National de Santé au Travail (PST), mis en place tous les cinq ans depuis 2004 par le Ministère du Travail, du Plein Emploi et de l'Insertion, a ces dernières années axé les enjeux sur les matériaux nanostructurés ou non du BTP. En effet, dans le cadre du PST3 (2016-2020), l'action 1.12 ayant pour but de mieux connaître et mieux prévenir les risques émergents visait de « *Réaliser une campagne de mesurage sur les nanomatériaux en vue d'identifier les filières les plus exposées, comportant un ciblage spécifique dans le secteur du bâtiment et des travaux publics (BTP)* » (90).

En mettant en place ce type de campagne, l'enjeu est d'améliorer durablement la santé de travail de chacun et de prévenir des risques professionnels en fédérant tous les acteurs concernés dans le monde du travail.

Globalement, l'exposition professionnelle aux différentes silices dans le secteur du BTP, est d'origine anthropique volontaire et involontaire. L'émission de silice peut effectivement survenir de façon involontaire lors de travaux employant des outils mécaniques rotatifs à haute énergie (ponceuse, perceuse, tronçonneuse, carotteuse...). De plus, des opérations de sablage et dans une moindre mesure, lors d'une utilisation d'outils manuels (masse, scie...) peuvent aussi potentiellement aboutir à une émission d'aérosols de particules contenant de la silice cristalline ou amorphe de taille micrométrique pour les deux structures de silice et nanométrique pour la silice amorphe, même si l'existence de nanoquartz ou de NP de silice cristalline reste à ce stade à démontrer dans le secteur après fragmentation des matériaux non nanostructurés.

I.8 Synthèse de l'introduction

Le secteur du BTP est le principal secteur professionnel exposant des travailleurs à des aérosols particuliers contenant de la silice cristalline ou amorphe. La silice étant en effet incorporée dans la grande majorité des matériaux utilisés dans ce secteur, des aérosols peuvent être générés directement lors de la fabrication ou de l'emploi de certains matériaux pulvérulents (ciment, béton, sable, etc...) ou indirectement lors d'interventions avec des outils rotatifs à haute énergie sur des chantiers neufs ou de rénovation voire lors d'opérations de démolition. Chez l'Homme, l'impact respiratoire des expositions aux aérosols contenant de la silice cristalline est documenté depuis presque un siècle mais reste tout de même d'actualité avec l'émergence de silicozes aiguës liées à la mise en œuvre de pierre reconstituée et l'avènement de nanomatériaux contenant de la silice amorphe dont la toxicité respiratoire demeure peu connue due au faible nombre d'études épidémiologiques sur le sujet. Pourtant, de nombreuses études toxicologiques expérimentales montrent qu'il existe une toxicité pulmonaire commune aux différentes formes de silice cristalline ou amorphe quelles que soient leurs tailles, avec notamment une inflammation et un remodelage pulmonaire. Il est tout de même à noter que ces données sont issues bien souvent d'études employant des doses particulièrement élevées et difficilement extrapolables à l'Homme compte tenu des niveaux d'exposition en vie réelle. Ainsi, il apparaît important de mieux comprendre l'implication des micro- et nanoparticules de silice cristalline ou amorphe dans l'inflammation et le remodelage pulmonaires lors d'expositions répétées à des doses de silice réalistes et représentatives des aérosols présents dans le secteur du BTP.

II Hypothèse et objectifs

L'hypothèse de mon travail de thèse est que les particules de silice cristalline ou amorphe présentes dans des aérosols représentatifs du BTP pourraient être impliquées dans le remodelage et l'inflammation pulmonaires après des expositions pulmonaires répétées à des doses réalistes tenant compte des niveaux d'exposition réels observés chez l'Homme en milieu professionnel.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du programme de recherche PURESNOW « PULmonary REmodeling after exposure to Silica Nanoparticles in cOnstruction Workers », financé par l'ANSES (APR EST 2018/1/094) qui vise à répondre à trois objectifs principaux définis en trois volets distincts :

- 1) **Volet PURESNOW-METRO**, visant à améliorer les connaissances portant sur la métrologie des nanomatériaux à base de silice dans le secteur du BTP, en réalisant des mesures et analyses en temps réel sur le terrain en vie réelle, et en temps différé après collecte d'échantillons pour avoir une meilleure caractérisation physico-chimique des aérosols contenant de la silice, notamment sur la fraction nanométrique ;
- 2) **Volet PURESNOW-RETRO**, permettant d'étudier de façon rétrospective le remodelage et l'inflammation pulmonaire après une exposition chronique à la silice cristalline chez des travailleurs du BTP comparés à des sujets témoins non exposés appariés à partir d'une tissuthèque constituée antérieurement, et d'explorer une éventuelle co-localisation des éléments Silicium et des lésions pulmonaires ;
- 3) **Volet PURESNOW-BIO**, visant à étudier le remodelage et l'inflammation pulmonaire chez des souris exposées à des micro- ou nanoparticules de silice (cristalline ou amorphe) à des doses répétées et réalistes.

Cette thèse devrait ainsi permettre de répondre à l'action 1.12 du Plan Santé Travail 3 « Réaliser une campagne de mesurage sur les nanomatériaux en vue d'identifier les filières les plus exposées, comportant un ciblage spécifique dans le secteur du BTP » et de mieux comprendre les effets pulmonaires de la silice cristalline et amorphe à des doses réalistes et répétées

III Volet PURESNOW-METRO

Ce chapitre détaille la méthodologie et les résultats de l'étude de métrologie du volet PURESNOW-METRO du programme PURESNOW dont l'objectif est d'améliorer les connaissances, dans le secteur du BTP, sur la métrologie des aérosols particuliers comportant des particules de silice émanant des matériaux non nanostructurés ou nanostructurés, en particulier sa fraction potentiellement nanoparticulaire de silice très peu explorée à ce jour dans ce secteur d'activité professionnelle. Cette étude de métrologie a été rendue possible par l'implication de plusieurs partenaires : Madame Léna Tison et le Pr Jean-Claude Pairon du Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil (CHIC), Madame Jamila Boudjema et le Dr Stéphanie Pinte et de l'Action Santé Travail (AST), Madame Axelle Treiber et le Dr Christian Morel et du Pôle Santé Travail (PST), Monsieur Laurent Martinon, Madame Clémence Mathieu et Madame Karine Beugnon du laboratoire Amiante, Fibre et Particules du Service Parisien de Santé Environnement (SPSE-LAPF), Madame Martine Chouvet et Monsieur Ronan Tartivel de l'Institut Technique Gaz et Air (ITGA) et Madame Catherine Hédouin-Langlet du Laboratoire de Toxicologie Industrielle de la Caisse Régionale d'Assurance Maladie (CRAMIF). Chacun de ces partenaires est intervenu dans une ou plusieurs des étapes de la stratégie de prélèvements sur le terrain et/ou d'analyse.

Il est important de noter qu'actuellement, l'existence même d'une fraction nanoparticulaire de silice cristalline, émise à partir de matériaux non structurés en employant des outils rotatifs à haute énergie, est très décriée.

III.1 Matériel et méthodes

Face à la complexité et à la diversité des aérosols particuliers émis sur le terrain dans des chantiers du BTP, une stratégie multi-étapes raisonnée, permettant de cibler les situations d'exposition théoriquement les plus émissives potentiellement en NP de silice, a été mise en place. Cette stratégie a commencé par une étape de pré-repérage « hors site » pour évaluer les tâches les plus exposantes à la silice cristalline ou amorphe, suivie d'une étape dite de « screening » ou repérage « sur site » (dans les Hauts-de-France), afin de repérer notamment la présence ou non de NP de silice cristalline ou amorphe aboutissant enfin à une étape de mise en place de campagnes ciblées (en Ile-de-France).

III.1.1 Pré-repérage « hors-site » des matériaux et tâches susceptibles d'être les plus émissives de particules de silice cristalline et amorphe

III.1.1.1 Approche par matériaux

Cette approche a été réalisée par mes soins avec l'aide de Madame Léna Tison, hygiéniste industrielle, par une analyse approfondie de la littérature, ayant permis d'identifier les matériaux nanostructurés ou non comportant de la silice cristalline ou amorphe qui ont été présentés dans le chapitre introductif **I.2.2**, **I.2.3** et **I.7.2**. De plus, une analyse et compréhension des normes des ciments (norme NF EN 197-1) et du béton (NF EN 206.1) a été également pratiquée afin de mieux comprendre la composition complexe de ces 2 familles de matériaux.

III.1.1.2 Approche par tâche

En plus de l'analyse approfondie de la littérature détaillée en chapitre introductif **I.7.3**, ayant permis d'identifier les situations à risque d'exposition, une enquête a aussi été conduite auprès des partenaires et d'autres professionnels experts du secteur du BTP sur le terrain.

III.1.2 Repérage « sur site » dans les Hauts-de-France

A cette étape de « screening », l'objectif est de mesurer 20 à 30 situations d'exposition. Cette étape a été réalisée en partenariat avec Madame Jamila Boudjema et le Dr Stéphanie Pinte et de l'AST et Madame Axelle Treiber et le Dr Christian Morel et du PST. L'AST et le PST sont tous deux des services de prévention et de santé au travail qui interviennent sur les chantiers dans les Hauts-de-France.

III.1.2.1 Méthodes de mesures en temps réel

Pour rappel, les mesures en temps réel d'un aérosol particulaire emploient des dispositifs de caractérisation permettant une estimation de la concentration particulaire d'un aérosol (en masse, en nombre ou en surface) au moment du prélèvement sur le terrain. En revanche, il s'agit de dispositifs qui ne donnent aucune information sur la nature chimique des particules comptées.

A cette étape, deux instruments de mesure en temps réel ont été utilisés afin d'obtenir des informations complémentaires en matière de :

- Concentration particulaire en masse (en mg/m^3) : avec l'utilisation de l'AM510® (TSI, Minnesota, États-Unis). Il s'agit d'un photomètre laser permettant une estimation de la concentration en masse de particules (en mg) par m^3 d'air.
- Concentration particulaire en surface $\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$: avec l'utilisation d'un dispositif utilisant un principe de mesure similaire au DisCMini® (présenté en I.5.2.1) : le Partector® (Naneos, Windisch, Suisse).

III.1.2.2 Méthodes de mesures en temps différé

Les mesures en temps différé d'un aérosol particulaire sont effectuées à partir de prélèvements d'air effectués sur le terrain consistant à recueillir un échantillon représentatif de l'aérosol particulaire d'intérêt sur un support, en vue de réaliser une caractérisation ultérieure en laboratoire. Ici, le dispositif d'échantillonnage Particlever® (ITGA : Institut Technique Gaz et Air, Meudon, France) a été choisi, car il cible uniquement la fraction alvéolaire de l'aérosol.

Volet PURESNOW-METRO

Matériel et méthodes

Une fois le prélèvement effectué à hauteur des voies aériennes entre un et deux mètres de la source d'émission, la cassette contenant un filtre Nucléopore® a été envoyée au laboratoire ITGA. L'objectif de leurs analyses de caractérisation physico-chimique a été de confirmer la présence ou non de microparticules et/ou de NP contenant notamment du silicium (Si) lors de l'observation par microscopie électronique à balayage analytique (MEB) équipée d'un analyseur en spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X (MEB-EDX). Cette caractérisation permet ainsi une identification qualitative en 2 temps à savoir :

- Une exploration globale du filtre Nucléopore® à la recherche des particules les plus fréquemment retrouvées (en matière de taille, de forme et de nature chimique contenant ou non l'élément chimique Si).
- Une sélection de 10 clichés représentatifs pour l'opérateur de l'exploration globale à analyser.

Afin de compléter la caractérisation de certains échantillons, une collaboration a été établie avec Monsieur François Saint-Antonin de la plateforme Nano-Sécurité du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Grenoble. Cette équipe est spécialisée en analyses nanoparticulaires en milieu complexe, notamment à l'aide d'un STEM-EDX (scanning transmission electron microscope and energy dispersive X-ray spectroscopy). Le STEM-EDX utilise un microscope électronique à transmission couplé à une analyse par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie. Ces analyses complémentaires ont ainsi permis d'avoir une résolution plus fine des particules à l'échelle nanométrique grâce au MET (jusqu'à 1 Angström (10^{-10} m) contre 50 nm au MEB) ainsi qu'une analyse à très haute résolution par DRX de la cristallinité des particules comportant du Si.

III.1.3 Campagnes de métrologie ciblées en Ile-de-France

Une fois les données préliminaires recueillies en étapes 1 et 2, des campagnes ciblées de mesures sur le terrain avec une méthodologie comportant des prélèvements systématiques individuels et d'ambiance. En effet, trois points de prélèvements et de mesures en temps réel ont été définis afin d'obtenir des données :

- Prélèvement et mesurage individuels placés à la hauteur des voies respiratoires de l'opérateur effectuant la tâche d'intérêt ;
- Prélèvement et mesurage d'ambiance en champ proche placé à environ 1,5m de la source d'émission pour mesurer l'exposition indirecte des salariés effectuant d'autres tâches à proximité avec des dispositifs de mesures ;
- Prélèvement et mesurage d'ambiance en champ lointain placé entre 3 et 4m de la source d'émission pour mesurer la pollution de fond et l'exposition indirecte des salariés effectuant d'autres tâches plus à distance mais sur le même chantier (champ lointain).

A cette étape de campagnes de métrologie ciblées, l'objectif est d'obtenir des résultats de mesures sur au moins 10 situations avec au minimum 2 prélèvements (individuel, à la hauteur des voies respiratoires du salarié et en ambiance de travail). Cette étape a été réalisée en partenariat avec Monsieur Laurent Martinon, Madame Clémence Mathieu et Madame Karine Beugnon du SPSE-LAPF et Madame Catherine Hédouin-Langlet du Laboratoire de Toxicologie Industrielle de la CRAMIF sur des chantiers en Ile-de-France.

III.1.3.1 Méthodes de mesures en temps réel

Dans cette étape, des mesures en temps réel ont nécessité plusieurs dispositifs de mesures permettant d'obtenir des informations complémentaires en matière de :

- Concentration particulaire en masse (mg/m^3) avec l'utilisation du MicroDust PRO®. (ATC Qualité de l'air, Nanterre, France). Il s'agit d'un photomètre permettant une estimation de la concentration en masse de particules (en mg) par m^3 d'air.

Volet PURESNOW-METRO

Matériel et méthodes

- Concentration particulaire en nombre (nombre/cm³) avec l'utilisation d'un CNC. Pour rappel, cet appareil permet une estimation de la concentration en nombre (#) de particules par cm³ d'air (pour des particules ayant une granulométrie de 10 nm à 1 µm)
- Concentration particulaire en surface µm²/cm³ : avec l'utilisation du DisCMini®. Pour rappel, cet appareil permet de mesurer des concentrations d'aérosols contenant entre 10³ et 10⁶ #/cm³ mais aussi de donner une indication sur la taille moyenne (pour des particules ayant un diamètre entre 20 et 300 nm). Cette détection simultanée permet alors de déterminer une grandeur en lien avec la surface des particules que l'on appelle LDSA (Lung Deposited Surface Area) ou surface spécifique des particules pouvant se déposer dans le poumon humain, donnant une indication sur le diamètre moyen d'une particule multiplié par la probabilité de dépôt dans la région alvéolaire

III.1.3.2 Méthodes de mesures en temps différé

Les mesures en temps différé ont été possible grâce à l'emploi de plusieurs dispositifs d'échantillonnage permettant des prélèvements individuels au niveau des voies aériennes des opérateurs et des prélèvements d'ambiance sur supports fixes au niveau des sources d'émission (durée de recueil selon la durée de la tâche).

La distribution granulométrique en masse de l'aérosol est évaluée avec un dispositif de prélèvement constitué d'un impacteur en cascade (impacteur SIOUTAS). Cet appareil est relié à une pompe régulée assurant un débit d'environ 9 litres d'air par minute. Il contient 5 filtres en PVC permettant de collecter les fractions particulières suivantes :

- étage A : supérieure à 2,5 µm
- étage B : de 1 à 2,5 µm
- étage C : de 0,5 à 1 µm
- étage D : de 0,25 à 0,5 µm
- étage résiduel : inférieur à 0,25 µm

Volet PURESNOW-METRO

Matériel et méthodes

Le dispositif de prélèvement utilisé pour prélever la fraction inhalable est issu d'un couplage entre le MicroDust PRO et une cassette en configuration fermée. En effet, cet appareil est équipé d'un sélecteur spécifique associé à une cassette porte-filtre de 37 mm de diamètre en configuration fermée, avec un orifice d'entrée de 4 mm, équipée d'un filtre taré en fibres de quartz. Le système de collecte obtenu est relié à une pompe régulée assurant un débit de 2 litres d'air par minute environ. La moyenne relative calculée par l'appareil est corrigée et remplacée *a posteriori* par la moyenne réelle donnée par le prélèvement actif sur filtre.

Afin de prélever la fraction alvéolaire des échantillons (c'est-à-dire inférieure à 10 μm), une cassette porte-filtre de 25 mm de diamètre en configuration fermée, avec un orifice d'entrée de 4 mm, équipée d'un filtre taré en PVC a été utilisée et placée en aval d'un cyclone de 10 mm, reliée à une pompe régulée assurant un débit de 1,7 litre d'air par minute environ.

Par ailleurs, le dispositif d'échantillonnage Particlever® (ITGA, Meudon, France) a été également choisi dans l'objectif d'une caractérisation en MEB-EDX par l'ITGA telle que décrit dans l'étape de repérage « sur site ».

Un autre dispositif permettant de prélever des fractions très fines de l'aérosol a été utilisé : le Mini Particle Sampler ou MPS (Ecomesure, Saclay, France) qui est un échantillonneur pouvant prélever des aérosols contenant des particules entre 5 nm et 100 à 200 nm (91,92). Lors du prélèvement, ce dispositif peut être couplé à un compteur de type CNC par exemple avec un débit d'aspiration pouvant être réglé entre 0,3 et 1,5L/min. Au sein du MPS, une grille est placée qui pourra directement être exploitée pour une analyse en STEM-EDS (Jeol 2100-F) ou en MET-EDS (Hitachi HT 7700). Ces analyses ont été réalisées par l'Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS) dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Toxicologie Industrielle de la CRAMIF et l'INRS.

III.2 Résultats

III.2.1 Pré-repérage « hors-site »

III.2.1.1 Approche par matériaux

III.2.1.1.1 Les ciments

Dans le BTP, les ciments figurent parmi une des matières premières les plus utilisées. Il s'agit de liants hydrauliques aux propriétés variées. En effet, les ciments peuvent être utilisés seuls pour lier des dalles ou du carrelage par exemple ou bien rentrer dans la composition d'autres matériaux comme le béton ou le mortier (voir **III.2.1.1.2**).

De nombreux types de ciments existent et sont classés en 5 types (dénomination «CEM» suivie d'une numérotation allant de I à V) selon la norme NF EN 197-1. Cette classification se base sur la composition des ciments : plus un ciment aura une teneur en clinker (constituant principal fait de 80% de calcaire et de 20% d'aluminosilicates) élevée et plus il sera au début de la classification. Par exemple, le Ciment Portland (CEM I) contient une majorité de clinker (minimum 95%) et une minorité d'autres constituants (5%). L'ajout de constituants secondaires, en plus (CEM V) ou en moins (CEM II) grande proportion, permet une modification des propriétés du ciment afin de lui conférer par exemple une résistance à la compression (au minimum 32,5 et au maximum 52,5 mégapa).

Si le clinker contient déjà potentiellement une quantité importante de silicium (Si), notamment par le taux d'aluminosilicates, certains des autres constituants secondaires sont eux aussi composés de silice sous forme de SiO₂ (fumées de silice) ou de silicates (laitier granulé de haut fourneau, pouzzolanes ou encore cendres volantes siliceuses). Lors de la mise en œuvre d'un ciment, les aérosols potentiellement émis, contenant silice et silicates produits, sont ainsi d'une composition chimique complexe. Les caractéristiques des ciments et les constituants qu'ils peuvent contenir sont résumés dans le **Tableau 4**.

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

Tableau 4 : Tableau résumé de la composition du ciment à travers la nomenclature utilisée dans la norme NF EN 197-1. Les composants en rouge désignent ceux contenant de la silice sous forme de SiO₂ ou des silicates.

Type de ciment		Constituants secondaires autres que le clinker	Résistance à la compression (28 jours)	Résistance à court terme (2 ou 7 jours)	Caractéristiques complémentaires
CEM I à V / A, B ou C		D, L, LL, P, Q S, T, V ou W	32,5 - 42,5 ou 52,5	L, N ou R	CE CP NF
I : Ciment Portland II : Ciment Portland composé III : Ciment de haut fourneau (S) IV : Ciment pouzzolanique (D, P, Q, V, W) V : Ciment au laitier et aux cendres (P, S, V)	A, B ou C : teneur en clinker (= 80% calcaire et 20% aluminosilicates)	D : fumée de silice L : calcaire (TOC<0,50%) LL : calcaire (TOC<0,20%) S : laitier granulé de haut fourneau P : pouzzolane naturelle Q : pouzzolane naturelle calcinée T : schiste calciné V : cendre volante siliceuse W : cendre volante calcique	en Mégapascal (MPa)	L : faible N : ordinaire R : élevée	CE : marquage CE NF : certification NF

III.2.1.1.2 Le béton

Comme les ciments, le béton possède lui aussi une composition chimique complexe. Il contient principalement 4 constituants qui sont définis dans la norme NF EN 206-1, à savoir (en allant du constituant principal du mélange aux adjuvants) :

- Un ou des granulats. Il s'agit de grains minéraux provenant de roches naturelles ou artificielles broyées, certaines contenant des quantités importantes de SiO₂ cristalline. Ces grains sont classés dans différentes familles en fonction de la granulométrie obtenue après broyage, soit du plus fin au plus grossier : fillers, sablons, sables, graves, gravillons et ballasts (normes NF P 18-545 et NF EN 12620).
- Du ciment dont la composition complexe et variée en SiO₂ cristalline et amorphe et silicates a elle-même été détaillée dans le paragraphe précédent (norme NF EN 197-1).
- De l'eau de gâchage permettant d'hydrater le ciment et ainsi de libérer ses capacités de liant (norme NF EN 1008).
- Des adjuvants, représentant moins de 5% du mélange total. Les adjuvants sont définis dans la norme NF EN 934-2 et sont regroupés dans 3 catégories en fonction des propriétés recherchées : modification de l'ouvrabilité du béton, modification de la

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

prise et du durcissement ou modification d'autres propriétés. Il est à noter qu'en France, il est interdit d'en ajouter *a posteriori* sur le chantier.

Similaire au béton, le mortier est un mélange constitué le plus souvent de sable, de ciment ou de chaux, d'eau de gâchage et d'adjuvants éventuels.

III.2.1.2 Approche par tâche

L'enquête conduite que j'ai conduite avec l'aide de Madame Léna Tison, hygiéniste industrielle, auprès des partenaires et d'autres professionnels experts du secteur du BTP sur le terrain a permis de cibler des tâches pouvant émettre d'importantes quantités d'aérosols particuliers contenant de la silice cristalline ou amorphe aux tailles micro- et nanométriques. Ainsi, la fabrication ou l'emploi de certains matériaux pulvérulents (ciment, béton, sable, etc...), les interventions avec des outils rotatifs à haute énergie sur des chantiers neufs ou de rénovation voire lors d'opérations de démolition ont fait partie des tâches majoritairement citées suite à notre enquête. Il est à noter que ces tâches sont cohérentes avec celles retrouvées dans la fiche actualisée de nuisance (FAN) sur la silice et résumée dans le **Tableau 5** ci-dessous (93).

Tableau 5 : Tableau résumé de la fiche actualisée de nuisance (FAN) sur la silice selon les tâches et les métiers concernés dans le secteur du bâtiment et des travaux publics, d'après (93)

Tâches	Métiers concernés
Démolition manuelle d'éléments contenant de la silice	Maçons
Nettoyage et balayage du chantier	Maçons, terrassiers
Travail du béton et du mortier : tronçonnage, concassage, sciage, projection à sec, perçage répétés, ponçage à sec	Maçons, électriciens, conducteur d'engins
Travail de pierre contenant de la silice : tronçonnage, concassage, sciage, décapage et sablage à sec	Tailleur de pierre, peintres, ravaleurs, manœuvre
Travail de la pierre reconstituée riche en quartz	Maçons, carreleurs, cuisinistes
Découpe de brique réfractaire	Maçons, fumistes
Travaux en toiture : découpe de tuiles et ardoises	Couvreurs
Travaux publics : travaux en galerie, souterrain Rabotage de chaussées, découpe d'enrobés Tronçonnage de bordures	Maçons, terrassiers
Reprise en sous-œuvre, sondage, forage, abattage	Maçons, conducteur d'engins, terrassiers
Usage de bois siliceux	Charpentiers
Travaux ferrés : ballastage de voies	Maçons, terrassiers

III.2.1.3 Synthèse de l'étape de pré-repérage « hors-site »

In fine, l'analyse de la littérature et les informations recueillies après enquêtes auprès des professionnels du BTP nous ont permis de sélectionner 9 principales situations d'exposition très émissives dans chaque secteur du BTP à savoir :

- Dans le secteur du « structure et gros œuvre », les 4 tâches ci-après et réalisées en majorité par des maçons : la découpe de matériaux contenant de la silice, la préparation du béton ou du mortier, la pulvérisation de béton ou de mortier et le ponçage du béton.
- Dans le secteur du « second œuvre », la découpe de tuiles ou de carrelage effectuées respectivement par les couvreurs ou les carreleurs et la découpe ou finition de plans en pierre reconstituée (plan de travail, notamment pour les cuisines) réalisées par les tailleurs de pierre, marbriers, granitiers ou cuisinistes.
- Dans les Travaux Publics, la découpe de bordures de trottoir effectuée par les corps de métiers de terrassiers, canalisateurs ou ouvriers des Travaux Publics.

Un formulaire de recueil de données a été élaboré pour étayer le contexte de chaque prélèvement métrologique réalisé sur le terrain. Il comporte plusieurs rubriques afin de faciliter la récolte d'informations importantes par les partenaires lors des mesures, les rubriques recueillies sont les suivantes (**Annexe 1**) :

- Une **compréhension de la nature du matériau** et pour cela, il a été prévu de collecter un échantillon du matériau et de l'étiqueter afin de mentionner la date, le lieu et la tâche analysée.
- Une **collecte des informations météorologiques** car la nature d'un aérosol ainsi que les niveaux d'exposition peuvent varier en fonction de la température, l'hygrométrie, la présence de vent et de précipitations.
- Une **caractérisation du mode opératoire associé**, notamment si un outil rotatif à haute énergie a été employé. Auquel cas, des informations pourront être recueillies sur les performances de l'outil (énergie, vitesse) mais aussi sur la nature du disque ou de la lame.
- Un **recueil de données sur les éventuelles mesures de protection utilisées** à l'échelle individuelle et/ou collective.

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

Un modèle de lettre a également été rédigé afin d'informer préalablement l'employeur et les salariés de la visée des prélèvements effectués (**Annexe 2**).

III.2.2 Repérage « sur site » dans les Hauts-de-France

III.2.2.1 Synthèse des tâches analysées

Au total, des mesures ont été réalisées pour 21 tâches (dont 13 à sec et 8 à l'humide) et sont résumées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Synthèse du nombre de prélèvements métrologiques par tâche et de leur condition de réalisation lors de l'étape 2 « screening » dans les Hauts-de-France (n=21).

Secteur	Métier concerné	Tâches	Condition de réalisation	Nombre de mesures
Structure et gros œuvre	Maçons	Découpe de béton spécial, parpaing creux et plein à la scie circulaire	à l'humide	n=3
		Pulvérisation de mortier projeté	à l'humide	n=1
		Ponçage de dalles et murs en béton	à sec	n=2
Second œuvre	Couvreurs	Découpe de tuiles à la meuleuse	à sec	n=3
		Découpe de tuiles ardoise	à sec	n=2
		Découpe de tuiles rouge	à sec	n=2
	Carreleurs	Découpe de carrelage à la disqueuse	à sec	n=3
Travaux Publics	Terrassiers/canaliseurs	Découpe de bordures à la scie circulaire	à sec	n=1
	Ouvriers des TP		à l'humide	n=4

III.2.2.2 Exemple de tâches analysées dans le secteur « structure et gros œuvre »

III.2.2.2.1 Pulvérisation de mortier projeté à l'humide

Une caractérisation physico-chimique des aérosols particulaires émis lors d'une pulvérisation de mortier projeté a été réalisée sur un chantier de réfection d'un pont. La pulvérisation est réalisée par voie humide. En temps réel, les données du Partector indiquent que lors des pics d'émission, la surface de particules qui peuvent atteindre le poumon se situe entre 2000 et 5000 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$ (**Figure 15**).

Volet PURESNOW-METRO Résultats

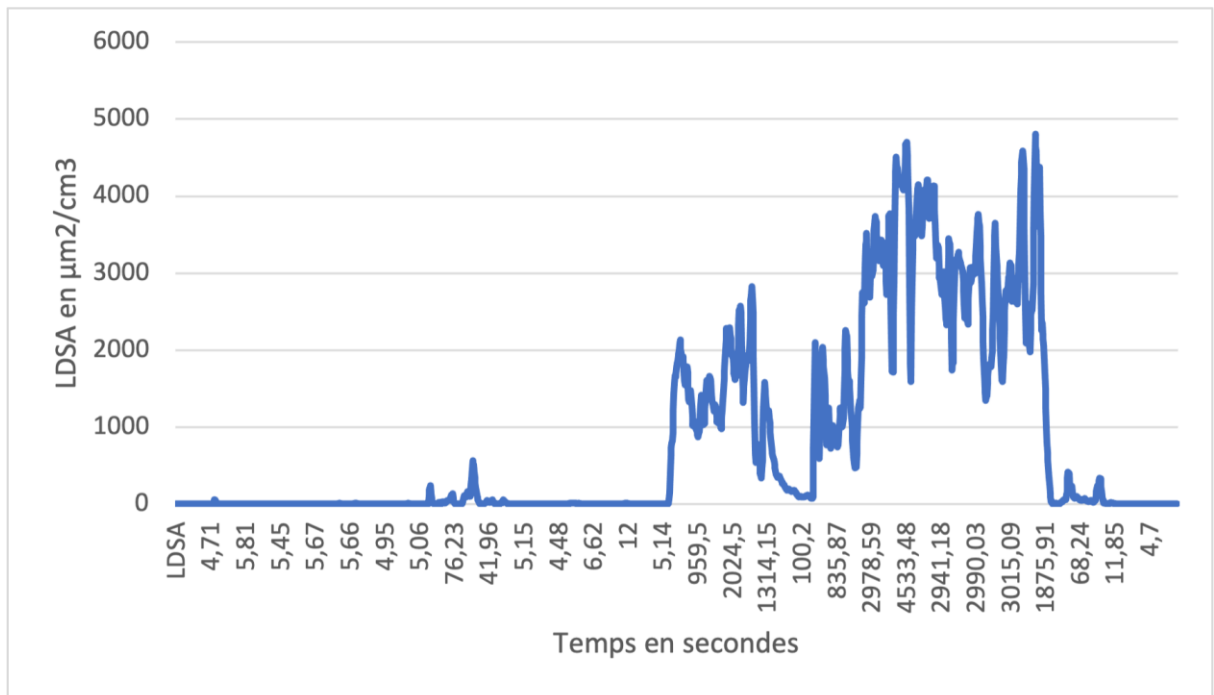


Figure 15 : Évolution temporelle (en secondes) de la surface spécifique des particules susceptibles de se déposer dans la région alvéolaire chez l'Homme (LDSA) lors d'une pulvérisation de mortier projeté à l'humide. *LDSA : Lung Deposited Surface Area*

En temps différé, les données de caractérisation de la fraction alvéolaire de l'échantillon par MEB-EDX ont fait ressortir que les particules de l'aérosol prélevé sont sphériques avec un diamètre compris entre 30 et 250 nm pouvant être isolées ou sous forme d'agglomérats/agrégats. D'autres particules d'aspect rugueux sont agglomérées/agrégées aux particules sphériques (**Figure 16**). A propos de la composition chimique, les éléments majoritaires composant cet aérosol sont le Si et le Ca. Des traces d'autres éléments chimiques métalliques sont retrouvées comme l'aluminium (Al) ou encore le sodium (Na).

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

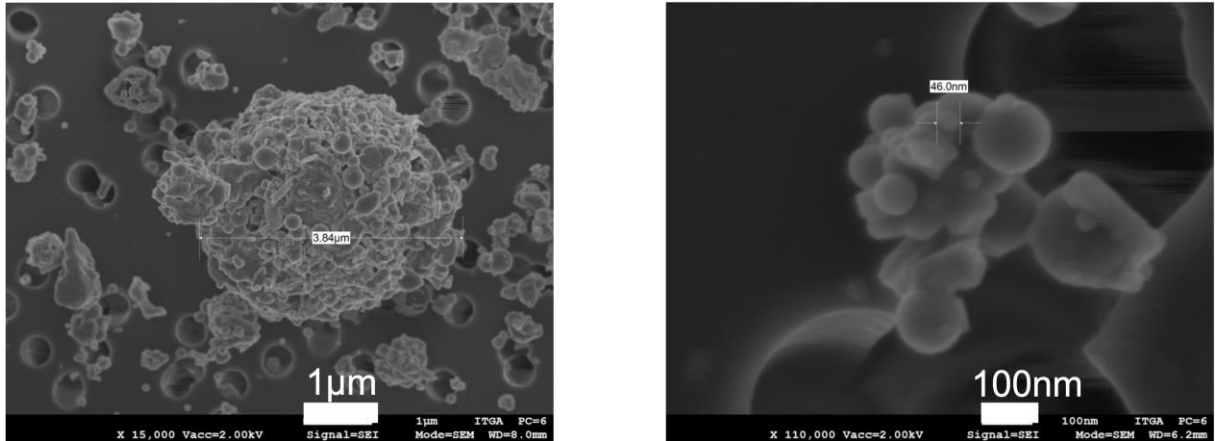


Figure 16 : Particules représentatives présentes dans la fraction alvéolaire provenant d'un aérosol particulaire émis lors d'une pulvérisation de mortier projeté à l'humide en microscopie électronique à balayage (MEB).

III.2.2.2 Ponçage de mur en béton à sec

Une caractérisation physico-chimique des aérosols particulaires émis lors de ponçage de murs en béton a été réalisée sur un chantier de construction de logements. L'outil rotatif employé ici est une ponceuse thermique possédant un disque en carbure de tungstène. Le ponçage est réalisé à sec avec un dispositif de captage à la source. En temps réel, les données du Partector® indiquent que lors des pics d'émission, la surface de particules qui peuvent atteindre le poumon se situe entre 2000 et 2500 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$ (**Figure 17**).

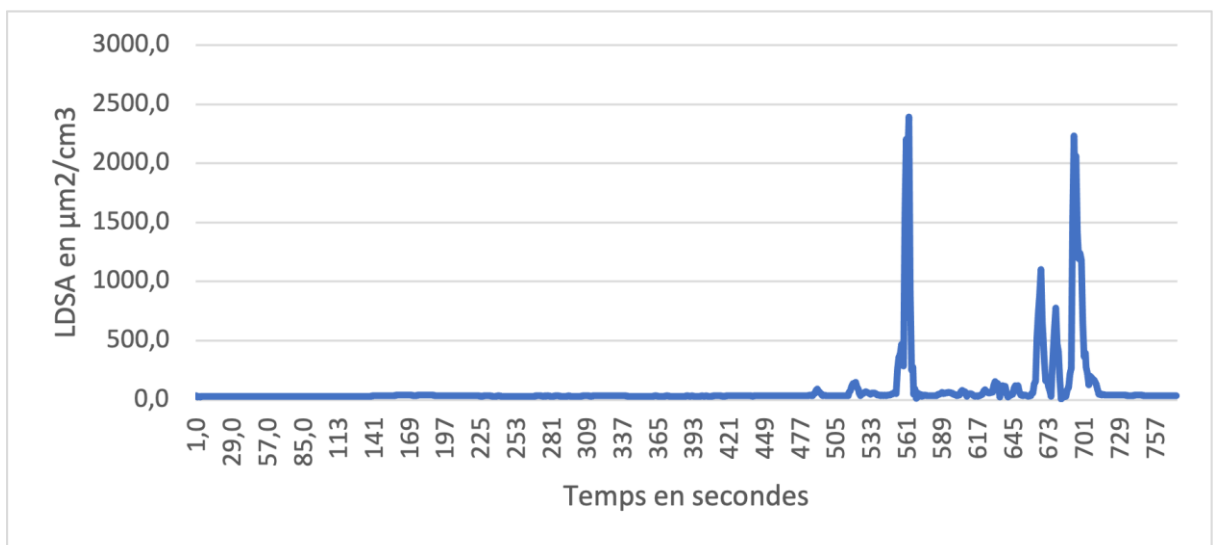


Figure 17 : Évolution temporelle (en secondes) de la surface spécifique des particules susceptibles de se déposer dans la région alvéolaire l'Homme (LDSA) lors d'un ponçage de murs en béton à sec à l'aide d'une ponceuse électrique. *LDSA : Lung Deposited Surface Area*

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

En temps différé, les données de caractérisation de la fraction alvéolaire de l'échantillon prélevé ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments chimiques. Tout d'abord, l'analyse par MEB-EDX montre qu'en matière de taille et de morphologie, les particules de l'aérosol prélevé ont un diamètre compris entre 50 et 100 nm et sont sous forme d'agglomérats/agrégats. De plus, des particules plus grosses d'aspect lisses ou rugueux agglomérées/agrégées sont retrouvées. Ses rugosités peuvent potentiellement correspondre à des agglomérats/agrégats de particules potentiellement nanométriques, mais sans certitude de l'important encombrement particulaire et de la résolution (**Figure 18A**). Concernant la composition chimique, les éléments majoritaires composant cet aérosol sont le Si et le Ca. Des traces d'autres éléments chimiques ont été retrouvées (Na, Mg, Al, S et K).

Afin de mieux caractériser ces échantillons particulaires et de vérifier la possible présence de nanoparticules de silice cristalline, une collaboration a été établie avec la plateforme nanosécurité du CEA de Grenoble pour analyser ce milieu complexe avec des appareils d'analyse de très haute résolution. Cette analyse complémentaire par STEM-EDX. Cette analyse a mis en évidence la présence d'authentiques NP isolées (**Figure 18B1**), contenant majoritairement du Si (**Figure 18B2**). Ainsi, nous avons mis en évidence la présence de NP de silice cristalline dans ces échantillons, mais à de faibles niveaux de présence (**Figure 18B3**).

Volet PURESNOW-METRO Résultats

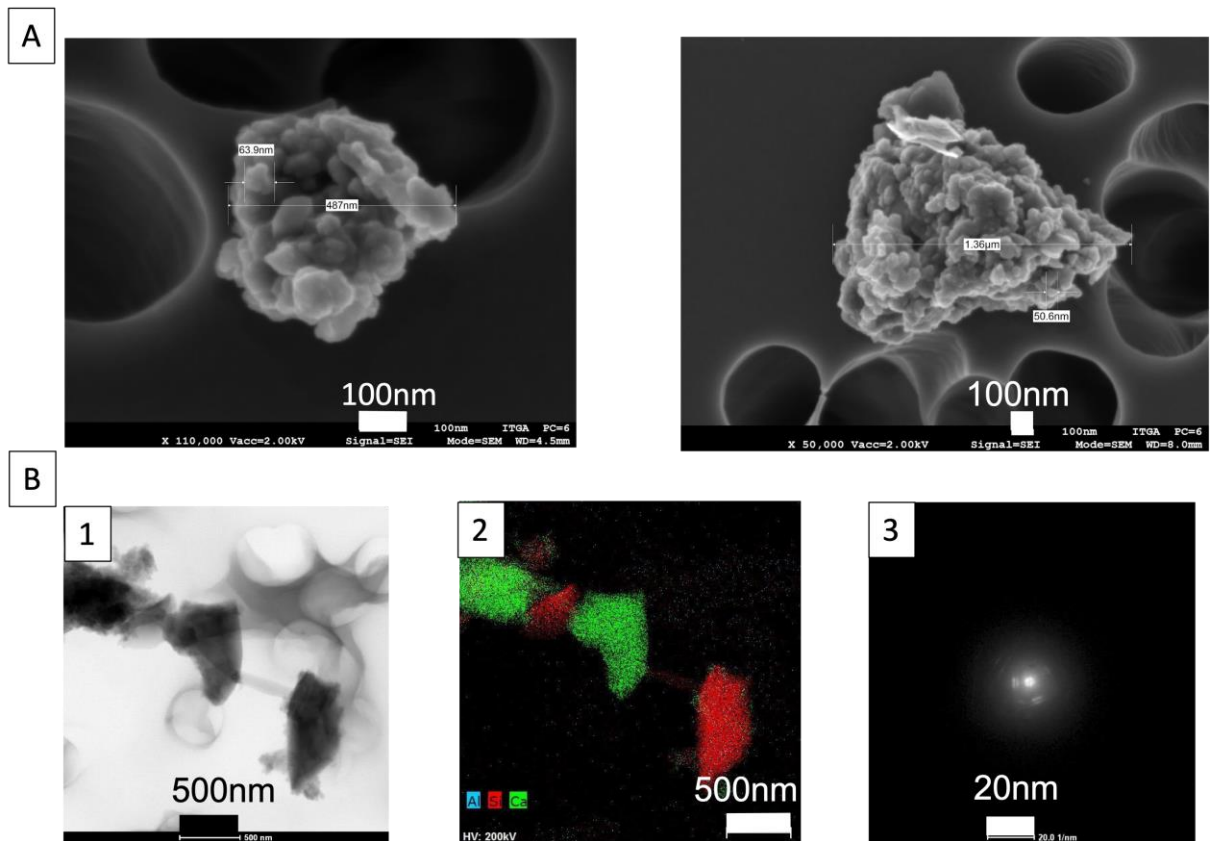


Figure 18 : Particules représentatives présentes dans la fraction alvéolaire provenant d'un aérosol particulaire émis lors d'un ponçage de murs en béton à sec en microscopie électronique à balayage (MEB) (A) et à transmission (ET) (B1). Cartographie des éléments chimiques majoritaires par spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X (EDX) : Si en rouge, Al en bleu et Ca en vert) (B2). Nature cristalline de la nanoparticule de Si par diffraction électronique (B3).

III.2.2.3 Exemple de tâche analysée dans les Travaux Publics : découpe de bordures en béton à l'humide

Une caractérisation physico-chimique des aérosols particulaires émis lors de découpes de bordures en béton a été également réalisée sur un chantier de réfection de la chaussée. L'outil rotatif employé ici est une scie circulaire. La découpe est réalisée à l'humide.

Concernant la caractérisation de la fraction alvéolaire de cet échantillon par MEB-EDX, l'analyse en matière de taille et de morphologie montre que les particules de l'aérosol prélevé forment des agglomérats partiellement nanostructurés (Figure 19A). En matière de composition chimique, les éléments majoritaires composant cet aérosol sont le Si et le Ca. Des traces d'autres éléments chimiques ont été retrouvées (Al, Mg, K, Na, Fe, S, Cl).

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

De plus, l'analyse complémentaire à la plateforme nanosécurité du CEA en STEM-EDX met en évidence la présence de nanoparticules isolées (**Figure 19B1**) contenant majoritairement du Si (**Figure 19B2**), mais de nature uniquement amorphe en diffraction électronique (Figure 19B3).

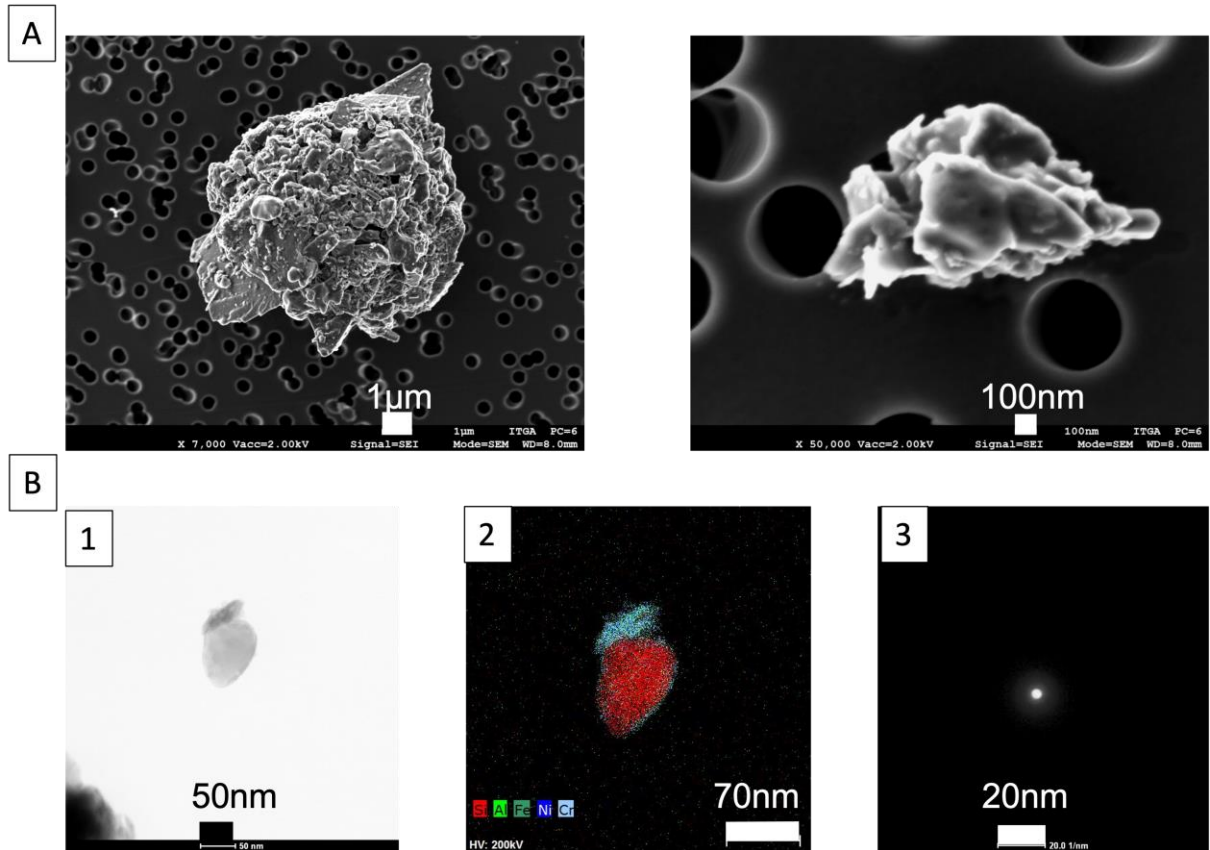


Figure 19 : Particules représentatives présentes dans la fraction alvéolaire provenant d'un aérosol particulaire émis lors d'une découpe de bordures en béton à l'humide en microscopie électronique à balayage (MEB) (**A**) et à transmission (ET) (**B1**). Cartographie des éléments chimiques majoritaires par spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X (EDX) : Si en rouge, Al en vert et Cr en bleu) (**B2**). Absence de diffraction de la nanoparticule de Si par diffraction électronique signant son caractère amorphe (**B3**).

III.2.3 Campagnes métrologiques ciblées en Ile-de-France

III.2.3.1 Synthèse des tâches analysées

Au total, 12 tâches (8 à sec et 4 à l'humide) ont bénéficié de prélèvements métrologiques et sont résumées dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Synthèse du nombre de prélèvements métrologiques par tâche et de leur condition de réalisation lors de l'étape 3 « campagnes métrologiques ciblées » en Ile-de-France (n=12).

Secteur	Métier concerné	Tâches	Condition de réalisation	Nombre de mesures
Structure et gros œuvre	Maçons	Découpe de briques à la scie crocodile	à sec	n=2
		Découpe de dalles en granit	à l'humide	n=1
		Pulvérisation de béton projeté	à sec	n=1
		Ponçage de béton	à sec	n=1
		Percements de béton	à sec	n=1
Second œuvre	Couvreurs	Découpe de tuiles en terre cuite	à sec	n=2
Travaux Publics	Terrassiers/canaliseurs Ouvriers des TP	Découpe de bordures à la scie circulaire	à sec	n=1
			à l'humide	n=3

III.2.3.2 Exemple de tâches analysées dans le secteur structure et gros œuvre : percement de béton à sec

Une caractérisation-physico-chimique des aérosols particuliers émis lors de percements de piliers en béton a été réalisée dans le cadre de travaux de réhabilitation d'un immeuble à usage de bureaux. L'outil à haute énergie employé est un perforateur burineur. Le percement est réalisé à sec et l'outil est soit directement équipé d'un récupérateur de poussières, soit relié soit à un aspirateur.

La distribution granulométrique déterminée à l'aide des impacteurs SIOUTAS permet de mettre en évidence que la concentration massique en particules totales et en silice cristalline contenue dans l'aérosol est majoritairement représentée par les PM10 mais aussi par les PM2.5 pour la silice cristalline mesurée au niveau des voies respiratoires. Ici, la fraction alvéolaire de l'aérosol représente 6% et 4% à hauteur des voies respiratoires du salarié et en champ proche, respectivement (**Figure 20A**). De manière plus précise, les données des cyclones indiquent que cette fraction alvéolaire est évaluée à 0,94mg/m³ (dont 0,17mg/m³ de

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

quartz) et à $0,31\text{mg}/\text{m}^3$ (dont $0,043\text{mg}/\text{m}^3$ de quartz) à hauteur des voies respiratoires du salarié et en champ proche, respectivement.

Les données de caractérisation de l'échantillon prélevé à l'aide du MPS ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments. L'analyse par MET a spécifiquement recherché les particules isolées les plus fines de silice cristalline (composées uniquement de Si et O et présentant un cliché de diffraction attestant d'une structure cristalline). Il est à noter que les particules dans les prélèvements sont majoritairement des particules microniques qui masquent les plus fines. Ces particules les plus petites sont de taille nanométrique ou submicronique avec un diamètre aérodynamique compris entre 40 et 400 nm et sont, soit isolées, soit sous forme d'agglomérats/agrégats. Par ailleurs, l'analyse complémentaire par EDX a mis en évidence la présence de nanoparticules isolées contenant majoritairement du Si. De plus, l'analyse d'une NP par EDX montre un cliché de diffraction caractéristique d'une structure cristalline (**Figure 20B**), confirmant les données obtenues lors de l'étape 2, là aussi lors d'une émission à haute énergie et à sec.

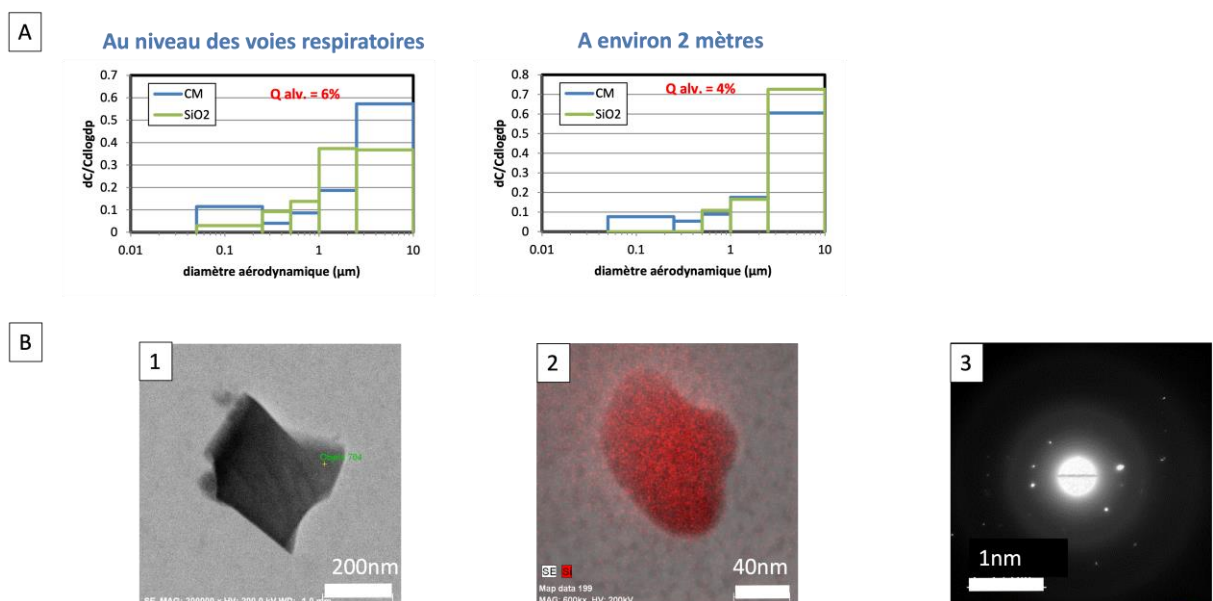


Figure 20 : Profil granulométrique d'un aérosol particulaire émis lors d'un percement de pilier en béton à sec (concentration massique totale (en bleu) et en quartz (en vert) prélevé au niveau des voies respiratoires d'un salarié et en champ proche (2 mètres de la source d'émission) (**A**). Particule submicronique (**B1**) en microscopie électronique à transmission (MET) composée de silicium (Si en rouge) sur la cartographie élémentaire en spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X (EDX) (**B2**) de structure cristalline en diffraction électronique (**B3**).

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

Globalement, l'ensemble des analyses en temps réel et en temps différé permet de mettre en évidence les points suivants :

- A hauteur des voies respiratoires du salarié réalisant le percement de béton, l'aérosol émis provoque une exposition importante aux poussières alvéolaires ($0,94 \text{ mg/m}^3$) et une exposition très importante à la silice cristalline (quartz, $0,17 \text{ mg/m}^3$).
- En champ proche (environ 2 m du salarié), l'impact indirect sur les salariés effectuant d'autres tâches à proximité est celui d'une exposition modérée aux poussières inhalables ($1,8 \text{ mg/m}^3$) et alvéolaires ($0,31 \text{ mg/m}^3$), importante voire très importante aux particules fines ($82\,600 \text{ particules/cm}^3$) et toujours importante à la silice cristalline (quartz, $0,043 \text{ mg/m}^3$).

III.2.3.3 Exemple de tâches analysées dans le second œuvre : découpe de tuiles en terre cuite à sec

Une caractérisation physico-chimique des aérosols particuliers émis lors de découpes de tuiles en terre cuite a été réalisée dans le cadre de travaux de couverture sur un chantier de construction de logements et de commerces. L'outil rotatif employé est une scie circulaire avec une découpe réalisée à sec sans dispositif de captage à la source.

La distribution granulométrique déterminée à l'aide des impacteurs SIOUTAS permet de mettre en évidence que la concentration massique en particules totales et en silice cristalline contenue dans l'aérosol est majoritairement représentée par les PM₁₀. Néanmoins, la fraction alvéolaire de l'aérosol représente tout de même 26% et 21% à hauteur des voies respiratoires du salarié et en champ proche respectivement (**Figure 21A**). De manière plus précise, les données des cyclones indiquent que cette fraction alvéolaire est évaluée à $1,55 \text{ mg/m}^3$ (dont $0,57 \text{ mg/m}^3$ de quartz) et à $0,75 \text{ mg/m}^3$ (dont $0,19 \text{ mg/m}^3$ de quartz) à hauteur des voies respiratoires du salarié et en champ proche respectivement.

En temps différé, l'analyse en MET révèle un prélèvement très chargé avec 3 types de particules observées composées de silice (SiO_2), aluminosilicate (Si-Al) et de l'aluminium seul (Al) pouvant recouvrir certaines particules riches en silice. Comme pour la tâche précédente, l'analyse par MET a spécifiquement recherché les particules isolées les plus fines de silice cristalline (composées uniquement de Si et O et présentant un cliché de diffraction attestant

Volet PURESNOW-METRO

Résultats

d'une structure cristalline). Il est à noter que les particules dans les prélèvements sont majoritairement des grosses particules microniques qui masquent les plus fines. Ces plus fines particules riches en silicium présentent des tailles variables comprises globalement entre 200 nm et 2 µm en diamètre (**Figure 21B**).

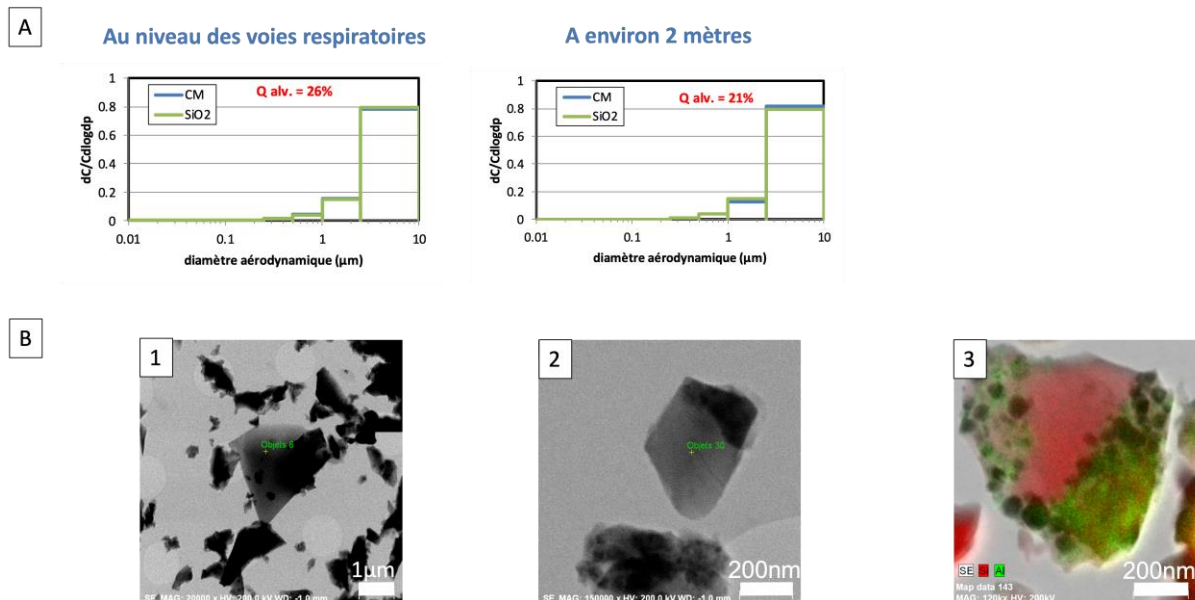


Figure 21 : Profil granulométrique d'un aérosol particulaire émis lors découpe à sec de tuiles en terre cuite (concentration massique totale (en bleu) et en quartz (en vert) prélevé au niveau des voies respiratoires d'un salarié et en champ proche (1,5 mètre de la source d'émission) (**A**). Particules submicroniques (**B1**) et nanométriques (**B2**) en microscopie électronique à transmission (MET) composée de silicium (Si en rouge) et aluminium (Al en vert) sur la cartographie multi-élémentaire en spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X (EDX) (**B3**).

Globalement, l'ensemble des mesures en temps réel et en temps différé permet de mettre en évidence les points suivants :

- A hauteur des voies respiratoires du salarié réalisant la découpe de tuiles, l'aérosol émis provoque une exposition importante aux poussières alvéolaires ($1,55 \text{ mg/m}^3$) et une exposition très importante à la silice cristalline (quartz, $0,57 \text{ mg/m}^3$).
- En champ proche (environ 1,5 m du salarié), l'impact indirect sur les salariés effectuant d'autres tâches à proximité est celui d'une exposition très importante aux poussières inhalables ($11,20 \text{ mg/m}^3$), importante aux poussières alvéolaires ($0,75 \text{ mg/m}^3$) et particules fines (1745 pt/cm^3 avec la présence de pics d'exposition) et toujours très importante à la silice cristalline (quartz, $0,19 \text{ mg/m}^3$).

Volet PURESNOW-METRO

Synthèse des résultats du volet PURESNOW-METRO

- En champ lointain (environ 3 m de la source d'émission), l'aérosol de fond induit tout de même une exposition importante aux poussières inhalables ($2,90 \text{ mg/m}^3$), modérée aux poussières alvéolaires ($0,37 \text{ mg/m}^3$) et aux particules fines ($12\ 697 \text{ pt/cm}^3$) avec une exposition toujours très importante à la silice cristalline (quartz, $0,12 \text{ mg/m}^3$).

III.3 Synthèse des résultats du volet PURESNOW-METRO

Ce volet PURESNOW-METRO permet d'obtenir des données métrologiques venant compléter les connaissances actuelles grâce à une meilleure caractérisation physico-chimique des aérosols particuliers contenant de la silice. En effet, les étapes n°2 (screening) et 3 (campagnes ciblées) ont pu confirmer la présence de silice cristalline nanométrique (présence de NP au microscope électronique à transmission comportant des éléments silicium à l'EDX avec une structure cristalline en diffraction) dans les aérosols générés à sec lors de la mise en œuvre de matériaux avec des outils rotatifs à haute énergie. A l'inverse, la présence de silice amorphe nanométrique (présence de NP au microscope électronique à transmission comportant des éléments silicium à l'EDX sans structure cristalline en diffraction) a été plutôt repérée lors de travaux à l'humide.

IV Volet PURESNOW-RETRO

Ce chapitre détaille la méthodologie et les résultats de l'étude rétrospective chez l'Homme du volet PURESNOW-BIO du programme PURESNOW dont l'objectif est de :

- 1) Localiser *in situ* dans les poumons (localisations cellulaire et subcellulaire) les NP de silice sur les coupes de poumons de ces mêmes travailleurs du BTP exposés et sujets témoins non exposés à des aérosols de silice en milieu de travail (obtenues à partir d'une tissuthèque déjà constituée de patients opérés d'un cancer bronchique ou d'un mésothéliome) ;
- 2) Étudier le remodelage et l'inflammation pulmonaires sur ces coupes de poumons ;
- 3) Comparer le remodelage et l'inflammation pulmonaires retrouvés chez l'Homme et l'animal (volet expérimental PURESNOW-BIO) et étudier leurs mécanismes sous-jacents.

Il sera ainsi détaillé dans une première partie la méthodologie de l'étude avec notamment la constitution des effectifs de cas, travailleurs du BTP exposés à la silice, et de sujets témoins non exposés, et, dans une seconde partie, les résultats.

IV.1 Matériel et méthodes

IV.1.1 Constitution des effectifs de l'étude cas-témoins

Le volet PURESNOW-RETRO se base sur une ancienne cohorte constituée entre 2005 et 2008 dans le cadre de l'étude « Approche moléculaire pour l'évaluation de la relation entre l'exposition à des particules minérales fibreuses et la survenue de lésions pulmonaires et pleurales chez l'homme » par des équipes de pneumologie, d'anatomie pathologie et de chirurgie thoracique exerçant dans plusieurs hôpitaux français. Le but de cette collection était de constituer en population générale, c'est-à-dire sans considérer les expositions professionnelles a priori des patients, une cohorte afin d'étudier les conséquences respiratoires de l'exposition professionnelle à des particules minérales. Cette cohorte ancienne de 671 sujets avec une tissuthèque de tissus pulmonaires non tumoraux de patients ayant été opérés pour un cancer broncho-pulmonaire ou un mésothéliome, et des données

Volet PURESNOW-RETRO

Matériel et méthodes

cliniques, fonctionnelles, histologiques, biométriologiques et professionnelles (*curriculum laboris*). Une estimation de leurs expositions professionnelles tout au long de leur carrière professionnelle à l'aide d'un *curriculum laboris* systématique a été expertisée et validée par un hygiéniste industriel.

Afin de répondre aux objectifs cités plus haut dans le cadre du volet PURESNOW-RETRO, il est prévu de sélectionner dans cette cohorte ancienne, les données de santé des sujets masculins (il est important de noter que le choix du genre a été guidé par la très large surreprésentation masculine chez les travailleurs du BTP exposés à la silice) ayant eu :

- Une activité professionnelle exposant à la silice dans le BTP (maçons, démolisseurs, cimentiers...) pour une durée minimale de 10 ans en carrière professionnelle entière ;
- Une expertise des expositions professionnelles sur l'ensemble de la carrière professionnelle, afin d'écartier les personnes exposées à d'autres sources d'exposition ;
- Un recueil des données cliniques comportant notamment la fonction respiratoire ;
- Une évaluation du statut et de la consommation tabagique ;
- Un bloc de poumon non tumoral inclus en paraffine.

IV.1.2 Autorisations réglementaires

Le projet PURESNOW a obtenu les autorisations réglementaires nécessaires pour la mise en œuvre et le traitement des données. Une dérogation a été obtenue pour l'exploitation des données cliniques et histopathologiques d'une ancienne cohorte sans recourir au consentement des patients auprès du Comité d'expertise pour les recherches, les études et les évaluations dans le domaine de la santé (CEREES) de l'Institut National des Données de Santé (INDS) le 13 février 2020 sous le numéro 338560 bis 2020. En effet, ceci a été permis compte tenu de l'âge avancé des patients à l'époque (plus de 65 ans en moyenne), l'ancienneté de cette étude et du très mauvais pronostic vital de ces patients atteints de cancers : médiane de survie de 9 à 12 mois avec ou sans traitement pour les patients atteints d'un mésothéliome et d'environ 15% de survie à 5 ans à l'époque pour les patients atteints d'un cancer broncho-pulmonaire à grandes cellules, rendant ainsi impossible d'informer ces patients de la nouvelle finalité du traitement de leurs données de santé. Par ailleurs, les sujets

Volet PURESNOW-RETRO

Matériel et méthodes

ayant participé à l'étude initiale « Approche moléculaire pour l'évaluation de la relation entre l'exposition à des particules minérales fibreuses et la survenue de lésions pulmonaires et pleurales chez l'homme », ont signé un consentement de participation à l'étude en question, et cette dernière a reçu un avis favorable du Comité Consultatif de Protection des Personnes participant à une Recherche Biomédicale de Créteil-Henri Mondor, le 8 avril 2005.

De plus, par la suite, la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) a donné son autorisation le 17 novembre 2020 sous le numéro 920094 pour colliger et gérer les données anonymisées dans le cadre de l'étude PURESNOW.

Après obtention l'obtention des autorisations réglementaires, un rapatriement des échantillons (blocs d'inclusion en paraffine de parenchyme pulmonaire prélevé à distance de la tumeur) initialement archivés dans différents hôpitaux a été réalisé, ainsi que l'ensemble des données.

IV.1.3 Analyses histologiques

Chaque bloc d'inclusion en paraffine a fait l'objet de coupes à 3 µm d'épaisseur et de colorations en Hématéine-éosine-safran (HES) et par la technique de Perls pour mise en évidence de la présence d'hémosidérine dans les macrophages, dès lors dénommés sidérophages, et recherche de corps ferrugineux évocateurs de corps asbestosiques.

Une grille d'analyse semi-quantitative de l'inflammation et du remodelage pulmonaire (fibrose notamment), ainsi que de la présence de dépôts particuliers, a été élaborée avec le Dr Jeanne Tran Van Nhieu, pathologiste à l'hôpital universitaire Henri Mondor et enseignante-chercheuse dans l'équipe. Les analyses histologiques ont été faites à l'aveugle et ont porté essentiellement sur 3 zones anatomiques pulmonaires : les structures bronchiques de taille moyenne (1 à 6 mm) correspondant à des bronchioles, les artères pulmonaires associées aux bronchioles analysées et les alvéoles pulmonaires.

IV.1.3.1 Zones bronchiolaires

IV.1.3.1.1 Inflammation bronchiolaire

L'inflammation a été quantifiée par la présence ou non sur la lame lue à l'aveugle d'infiltrats inflammatoires au sein de toutes les bronchioles préalablement dénombrées. Pour chaque bronchiole, l'intensité des infiltrats inflammatoires a été évaluée en établissant un score semi-quantitatif allant de 0 à 3 (0 : absence, 1 : légère, 2 : modérée, 3 : sévère). Une moyenne de ce score est ensuite calculée pour obtenir l'intensité globale de l'inflammation bronchiolaire.

IV.1.3.1.2 Remodelage bronchiolaire

La fibrose a été quantifiée par la présence ou non sur la lame lue à l'aveugle d'épaississements fibreux des parois par des dépôts de collagène pour toutes les bronchioles préalablement dénombrées. Pour chaque bronchiole, l'importance de la fibrose a été évaluée en établissant un score semi-quantitatif allant de 0 à 3 (0 : absence, 1 : légère, 2 : modérée, 3 : sévère). Une moyenne de ce score est ensuite calculée pour obtenir l'intensité globale de la fibrose bronchiolaire.

IV.1.3.1.3 Présence de dépôts particuliers

D'autres paramètres d'intérêt ont été définis pour caractériser la présence de dépôts particuliers.

Les dépôts anthracosiques correspondent à une accumulation de particules de suie ou goudron dans les voies aériennes. Les dépôts anthracosiques sont souvent associés à l'inhalation de fumée de cigarette et peuvent parfois être associés à l'inhalation de silice cristalline donnant chez les travailleurs une pneumoconiose appelée anthraco-silicose. Ici, la présence ou non de ces dépôts anthracosiques au sein de toutes les bronchioles préalablement dénombrées sur la lame a également été rapportée. Pour chaque bronchiole, l'importance de ces dépôts a été caractérisée en établissant un score semi-quantitatif allant de 0 à 3 (0 : absence, 1 : sur moins d'un tiers, 2 : sur plus d'un tiers, 3 : sur plus des deux tiers de la surface bronchiolaire) (**Figure 22**). Une moyenne de ce score est ensuite calculée pour obtenir l'intensité globale de ces dépôts présents sur les zones bronchiolaires de la lame.

Volet PURESNOW-RETRO

Matériel et méthodes

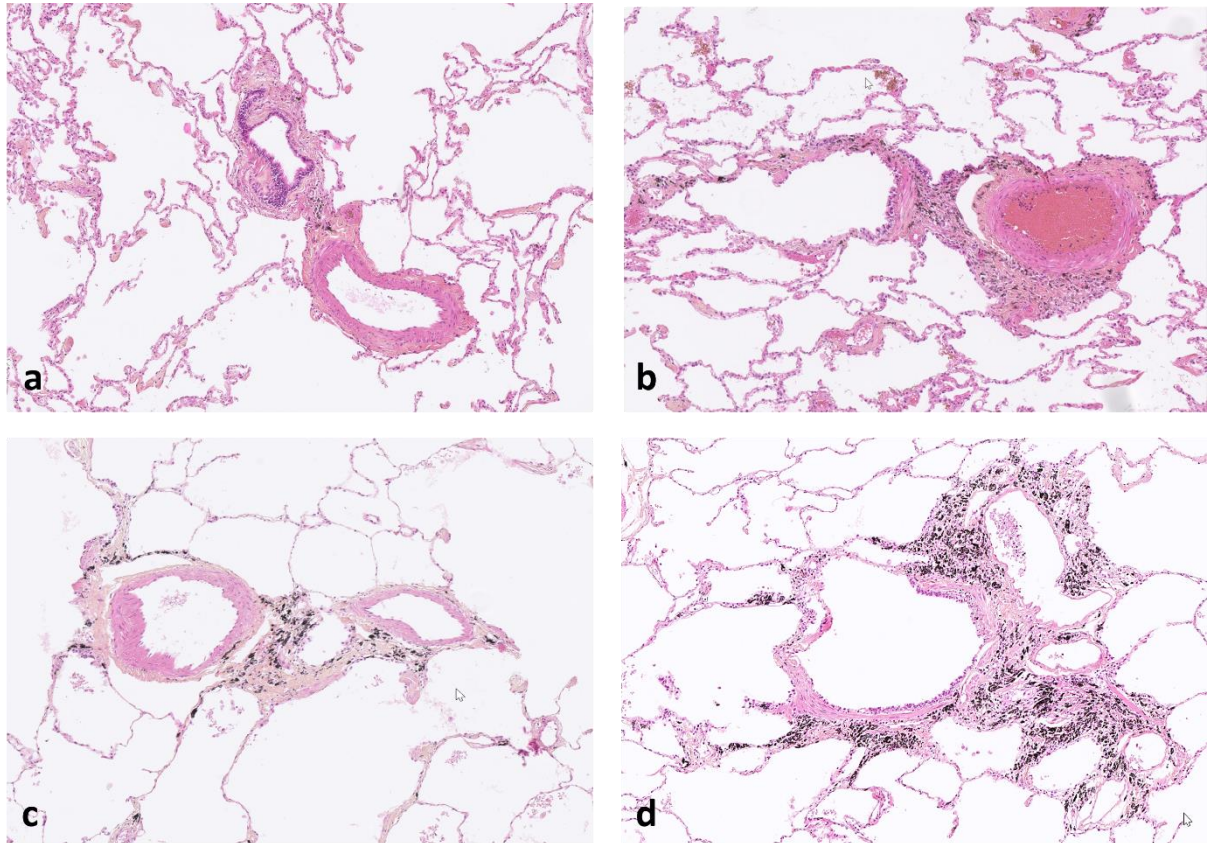


Figure 22 : Présence de dépôts anthracosiques d'intensité variée centrée sur des axes broncho-vasculaires sur des coupes histologiques de poumon colorées par l'hématoxyline-éosine-safran (HES) au grossissement x200 : **a**-score 1 homogène pour la bronchiole à gauche et l'artère à droite) ; **b**- score 2 pour la bronchiole à gauche et score 3 pour l'artère à droite ; **c**- score 3 pour la bronchiole centrée par 2 artères de score 2 pour à droite ; et **d**- score 3 homogène pour la bronchiole à gauche et les différentes sections d'artère à droite.

Par ailleurs, des particules minérales réfringentes (PMR) peuvent être observées en microscopie optique en lumière polarisée dans certaines zones du poumon (mais préférentiellement au niveau des dépôts anthracosiques et des macrophages alvéolaires). Cette réfringence est une propriété physique des particules de structure cristalline mais non spécifique de la silice cristalline. Des indices liés à la morphologie peuvent notamment permettre de faire la distinction, les particules de silice cristalline notamment ont un aspect en fuseau fin ou aiguille (**Figure 23**). Ici, le nombre total de PMR par lame a été dénombré en additionnant le nombre de PMR compté pour chaque bronchiole. Ce nombre de PMR a alors été rapporté au nombre moyen de bronchioles afin d'obtenir un nombre moyen de PMR.

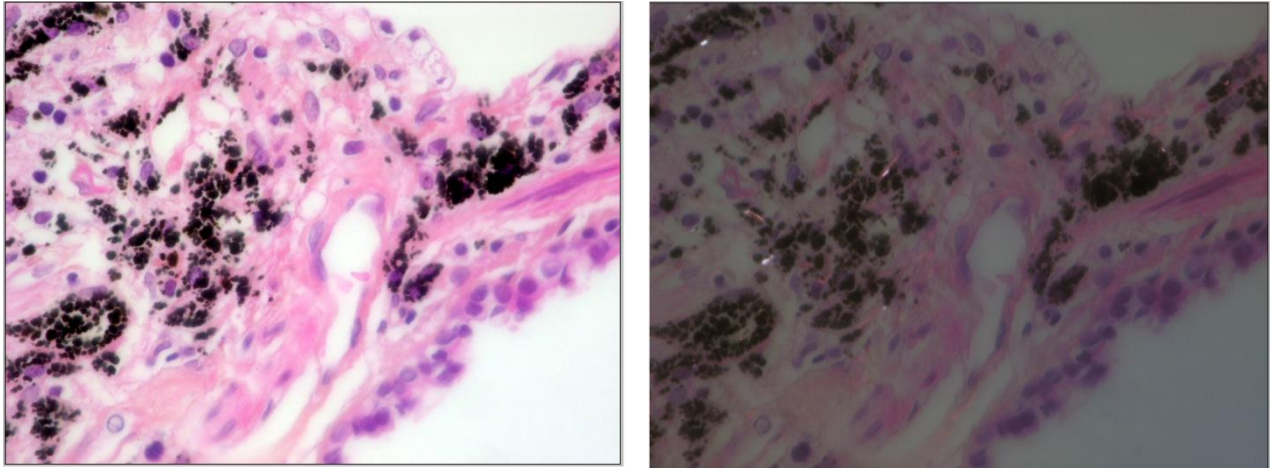


Figure 23 : Présence de particules minérales réfringentes (PMR) au sein de dépôts anthracosiques péribronchiolaires sur une coupe histologique de poumon colorée par l'hématoxyline-éosine-safran (HES) et observée en lumière blanche à gauche, puis polarisée à droite au grossissement X600.

IV.1.3.2 Zones vasculaires

IV.1.3.2.1 Remodelage vasculaire

Le remodelage a été quantifié par la présence ou non sur la lame lue à l'aveugle d'épaississements des parois par des dépôts de collagène pour toutes les artérioles pulmonaires associées aux bronchioles analysées. Pour chaque artériole, l'importance de la fibrose a été évaluée en établissant un score semi-quantitatif allant de 0 à 3 (0 : absence, 1 : légère, 2 : modérée, 3 : sévère). Une moyenne de ce score est ensuite réalisée pour obtenir l'intensité globale de la fibrose vasculaire.

IV.1.3.2.2 Présence de dépôts particuliers

La présence ou non de dépôts anthracosiques au sein de toutes les artérioles appartenant à un axe broncho-vasculaire de la lame a également été rapportée. Pour chaque artériole l'importance de ces dépôts a été caractérisée en établissant un score semi-quantitatif allant de 0 à 3 (0 : absence, 1 : sur moins d'un tiers, 2 : sur plus d'un tiers, 3 : sur plus des deux tiers de la surface bronchiolaire). Une moyenne de ce score est ensuite calculée pour obtenir l'intensité globale de ces dépôts présents sur les artérioles appartenant à un axe broncho-vasculaire de la lame.

Volet PURESNOW-RETRO

Matériel et méthodes

Par ailleurs, le nombre total de PMR par lame a été dénombré en additionnant le nombre de PMR compté pour chaque artériole. Ce nombre de PMR a alors été rapporté au nombre moyen d'artérioles afin d'obtenir un nombre moyen de PMR.

IV.1.3.3 Zones alvéolaires

IV.1.3.3.1 Inflammation alvéolaire

Dans la lumière alvéolaire, 5 champs aléatoires ont été sélectionnés pour déterminer un nombre moyen de macrophages alvéolaires.

IV.1.3.3.2 Remodelage alvéolaire

Le remodelage alvéolaire a été évalué en examinant à l'aveugle sur l'ensemble de la lame la présence ou non de fibrose interalvéolaire et d'emphysème centro-lobulaire. Pour rappel, l'emphysème correspond à une distension anormale et permanente des espaces aériens associée à une destruction des cloisons interalvéolaires. Dans le cas de l'emphysème centro-lobulaire, celui-ci possède une étiologie en lien avec des expositions chroniques telles que la silice cristalline. Sur l'ensemble de la lame, l'importance du remodelage a été évaluée en établissant un score semi-quantitatif allant de 0 à 3 (0 : absence, 1 : légère, 2 : modérée, 3 : sévère). Une moyenne de ces scores est ensuite calculée pour obtenir l'intensité globale de la fibrose interalvéolaire et de l'emphysème centro-lobulaire.

IV.1.3.3.3 Présence de dépôts particuliers

Sur les 5 mêmes champs aléatoires que ceux sélectionnés pour déterminer le nombre moyen de macrophages dans la lumière alvéolaire, les macrophages empoussiérés ont été dénombrés. Le nombre moyen de macrophages empoussiérés a ensuite été rapporté au nombre moyen de macrophages alvéolaires afin d'obtenir un pourcentage de macrophages empoussiérés sur ces 5 champs.

Volet PURESNOW-RETRO

Matériel et méthodes

De plus, les macrophages contenant des PMR ont été dénombrés. Le nombre moyen de macrophages avec PMR a alors été rapporté au nombre moyen de macrophages alvéolaires afin d'obtenir un pourcentage de macrophages avec PMR sur ces 5 champs (**Figure 24**).

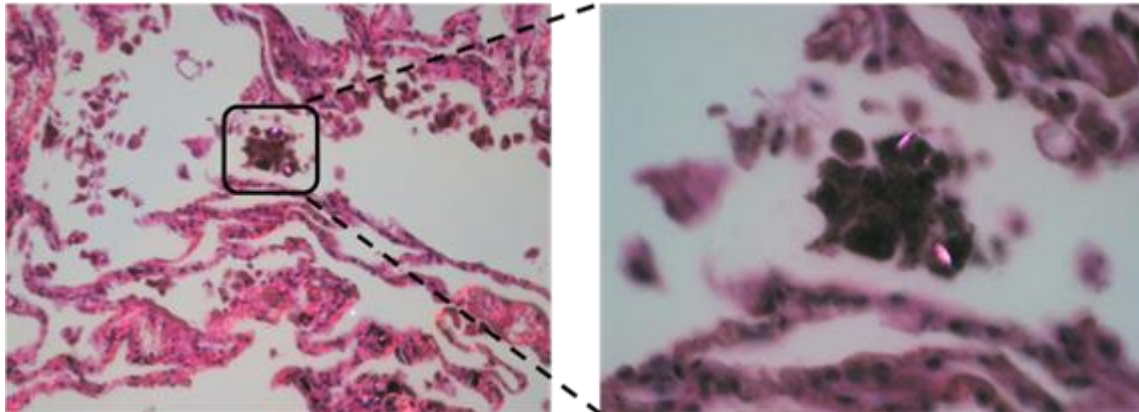


Figure 24 : Présence de particules minérales réfringentes (PMR) évocatrices de particules de silice cristalline dans le cytoplasme de macrophages alvéolaires pigmentés, empoussiérés sur une coupe histologique de poumon colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) et observée en lumière polarisée aux grossissements X200 (à gauche) et X600 (à droite).

IV.1.3.4 Autres zones d'intérêt

IV.1.3.4.1 Formations lymphoïdes

Lors de la lecture des lames, d'autres lésions pulmonaires ont été identifiées avec notamment la présence de tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT). La quantité de BALT a alors été relevée pour chaque lame. Afin d'assurer la comparabilité entre les lames où de nombreuses bronchioles ont été dénombrées avec à l'inverse celles où très peu de bronchioles ont été identifiées, le nombre de nodules lymphoïdes du BALT a été rapporté au nombre de bronchioles (ratio BALT / bronchioles).

IV.1.3.4.2 Plèvre et septa inter-lobulaires

Si les structures anatomiques du poumon (bronchioles, artérioles, alvéoles) ont été au cœur de l'analyse histologique, une attention a aussi été portée aux éléments en périphérie de la lame, soit au niveau de la plèvre et des septa inter-lobulaires lorsque présents sur la coupe. Dans ces zones, la présence ou non de PMR a également été recherchée.

IV.1.4 Analyses élémentaires chimiques *in situ*

Une caractérisation chimique élémentaire *in situ* a été réalisée par microfluorescence X (μ XRF) sur la ligne de faisceau LUCIA (Ligne Utilisée pour la Caractérisation par Imagerie et Absorption) du centre français de rayonnement synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du Laboratoire d'utilisation du rayonnement électromagnétique, Saint-Aubin, France). Le projet PURESNOW a en effet été l'un des lauréats de l'appel d'offres 2020 pour bénéficier de 120 heures de temps de faisceaux 24 heures sur 24.

La μ XRF est une technique combinant la fluorescence de rayonnements X avec une énergie entre 0,6 et 8 keV pour identifier les éléments chimiques présents dans un échantillon à l'aide d'un faisceau monochromatique de $1 \times 3 \mu\text{m}^2$ très fin pour analyser une surface très petite. Cette combinaison permet alors de réaliser une cartographie chimique élémentaire résolutive d'un échantillon (94).

Au préalable, des coupes sériées de parenchyme pulmonaire inclus en paraffine ont été réalisées au microtome (Finesse 325, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis), de $3 \mu\text{m}$ d'épaisseur pour être colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) et par la technique de Perls (recherche d'hémosidérine), et d'une coupe de $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur pour la μ XRF pour y être déposées sur une feuille d'Ultralene[®] (film transparent de $4 \mu\text{m}$ d'épaisseur). Les coupes histologiques en série permettent un pré-repérage des zones d'intérêt (fibrose notamment) en microscopie optique sur la coupe colorée en HES. Ceci permet également secondairement le repérage et la comparaison avec la cartographie acquise par μ XRF.

Ces coupes histologiques de tissus pulmonaires déposées sur l'Ultralene[®] ont été analysées à 2 seuils d'énergie différents : 1,9 keV et 2,55 keV, correspondant respectivement aux seuils des éléments chimiques du silicium (Si) et du soufre (S).

Premièrement, le seuil de 1,9 keV correspondant au seuil d'excitation de l'élément Silicium (Si) permet de localiser de manière précise cet élément chimique dans les coupes de tissus pulmonaires. Deuxièmement, le seuil de 2,55 keV correspondant au seuil d'excitation de l'élément chimique Soufre (S) permet quant à lui de mieux comprendre la représentativité du

Volet PURESNOW-RETRO

Matériel et méthodes

tissu pulmonaire (il s'agit d'un élément important présent notamment au niveau des acides aminés soufrés) au sein des zones analysées préalablement pour chaque échantillon au seuil du Si. L'obtention du signal du S permet en effet d'avoir une idée de la quantité d'éléments du tissu pulmonaire par une approche semi-quantitative, et donc de l'importance relative du signal du Si par rapport au signal S au seuil du S. Le phosphore (P) au seuil du S a également été pris comme autre élément chimique représentant le compartiment tissulaire. Par ailleurs, d'autres éléments tels que l'aluminium (Al) au seuil du S a été choisi car retrouvé dans des matériaux du BTP à base d'alumino-silicates (micas dans le granit et feldspath dans le carrelage par exemple). Des cartographies globales (taille 2000 μm X 2000 μm avec un pas de 50 μm) et des zones comportant un signal plus important en Si (500 μm X 500 μm en moyenne avec un pas de 3 μm) ont été acquises à chacun de ces seuils.

Les cartographies ont ensuite été traitées avec le logiciel PyMca version 5.1.3 (ESRF, Grenoble, France). Afin d'analyser par une approche semi-quantitative la quantité d'éléments chimiques (S) et la quantité de Si du tissu pulmonaire, les cartographies acquises au seuil du S ont été transférées sur le logiciel d'analyse d'image ImageJ (version 1.53). Brièvement, la cartographie comportant le signal d'un élément chimique (soit Si, soit S) a été transformée en image en nuances de gris (16bits). Un seuil de valeur de niveau de gris a été attribué puis appliqué à chaque image pour définir la valeur moyenne correspondant au bruit de fond. Sur chaque image, les valeurs de niveau de gris ainsi définies délimitent les zones correspondantes, soit à du tissu pulmonaire (utilisant la valeur du signal du S) soit à la présence du signal du Si. La quantification des valeurs de niveaux de gris *via* le nombre de pixels a permis de déterminer la surface de présence de ces éléments. Un ratio signal S/signal du Si a été calculé pour avoir une quantification relative de la présence de silicium dans le tissu.

IV.1.5 Effectifs nécessaires et analyses statistiques

Prenant l'hypothèse d'un quadruplement de la valeur du paramètre biologique ou histologique mesuré entre les sujets du BTP exposés (cas) et les témoins non exposés et pour un risque α de 5% et une puissance de 80%, l'effectif minimal de sujets nécessaire est de 30 sujets par groupe. La cohorte comporte 82 sujets ayant occupé au moins un emploi exposant

Volet PURESNOW-RETRO

Matériel et méthodes

à la silice dans le BTP (maçon, cimentier, briqueteur...). Parmi eux, 36 sujets l'ont occupé au moins 10 ans.

Admettant que la population ne suit pas une loi de distribution normale, puisque le nombre de sujets est inférieur à 30, les analyses statistiques choisies ont employé des tests non paramétriques, soit le test de contingence de Fisher, soit le test de comparaison des moyennes de Wilcoxon-Mann-Whitney selon la situation. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs si la valeur de p était strictement inférieure à 0,05 et exprimés en matière de moyenne \pm l'écart-type de la moyenne (SEM) sous forme de diagrammes de dispersion univariés (95). Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9 (La Jolla, Californie, Etats-Unis).

IV.2 Résultats

IV.2.1 Caractéristiques cliniques des populations incluses

L'appariement sur l'âge, la consommation tabagique et l'exposition ou non à l'amiante a permis d'inclure 18 travailleurs exposés professionnellement à la silice cristalline et 18 sujets témoins. Les caractéristiques cliniques des populations de sujets témoins non exposés et des sujets exposés antérieurement à la silice cristalline figurent dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Caractéristiques des populations de sujets témoins non exposés et exposés à la silice.

	Sujets témoins (n=18)	Sujets exposés à la silice (n=18)	<i>p</i>
Age moyen (années ± EC)	64,6 ± 7,1	64,3 ± 7,5	ns
Sexe masculin, n (%)	18 (100%)	18 (100%)	ns
<u>Statut tabagique</u>			
Non-fumeurs, n (%)	0 (0%)	2 (11,2%)	ns
Ex-fumeurs, n (%)	10 (55,6%)	8 (44,4%)	ns
Fumeurs, n (%)	8 (44,4%)	8 (44,4%)	ns
Tabagisme cumulé moyen (PA ± EC)	47,3 ± 21,2	44,9 ± 25,0	ns
Age moyen au début (ans ± EC)	16,8 ± 2,9	17,4 ± 2,0	ns
Age moyen à l'arrêt (ans ± EC)	58,0 ± 11,1	55,5 ± 10,5	ns
Durée totale moyenne (ans ± EC)	41,2 ± 10,3	38,9 ± 9,8	ns
Durée moyenne de sevrage (ans ± EC)	9,8 ± 16,4	7,3 ± 10,0	ns
<u>Exposition à la silice</u>	0	18	
Age moyen au début (ans ± EC)	-	18,1 ± 4,5	-
Age moyen à l'arrêt (ans ± EC)	-	51,5 ± 10,3	-
Durée totale moyenne (ans ± EC)	-	27,7 ± 9,7	-
Durée moyenne depuis l'arrêt (ans ± EC)	-	12,8 ± 10,7	-

IV.2.2 Analyses histologiques

Les analyses histologiques semi-quantitatives du parenchyme pulmonaire des groupes Contrôle et Silice peuvent être regroupées selon les paramètres d'intérêts évalués au niveau de 3 zones anatomiques pulmonaires : les bronchioles, les vaisseaux (artérioles pulmonaires appartenant à l'axe broncho-vasculaire des bronchioles analysées) et les alvéoles ainsi que des autres zones d'intérêt. Les résultats de ces analyses sont détaillés dans le **Tableau 9**.

Volet PURESNOW-RETRO
Résultats

Tableau 9 : Résultats des analyses histologiques semi-quantitatives du parenchyme pulmonaire chez les sujets témoins non exposés et les sujets exposés à la silice.

	Sujets témoins (n=18)	Sujets exposés à la silice (n=18)	<i>p</i>
Zones bronchiolaires			
Présence d'une inflammation, n (%)	9 (50%)	13 (72,2%)	ns
Intensité* de l'inflammation (score moyen ± EC)	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,2	ns
Présence d'une fibrose péribronchiolaire, n (%)	18 (100%)	17 (94,4%)	ns
Intensité* de la fibrose (score moyen ± EC)	0,7 ± 0,5	1,3 ± 0,8	<0,01
Présence de dépôts anthracosiques, n (%)	18 (100%)	18 (100%)	ns
Intensité* des dépôts (score moyen ± EC)	0,9 ± 0,5	1,3 ± 0,7	ns
Présence de PMR (n moyen/bronchiole ± EC)	3,9 ± 5,6	17,3 ± 26,3	<0,01
Zones vasculaires			
Présence d'une fibrose périvasculaire, n (%)	17 (94,4%)	16 (88,9%)	ns
Intensité* de la fibrose (score moyen ± EC)	0,5 ± 0,3	1,0 ± 0,6	<0,01
Présence de dépôts anthracosiques, n (%)	15 (83,3%)	17 (94,4%)	ns
Intensité* des dépôts (score moyen ± EC)	0,6 ± 0,4	1,2 ± 0,7	<0,05
Présence de PMR (n moyen/artériole ± EC)	1,2 ± 1,4	13,6 ± 21,3	<0,0001
Zones alvéolaires			
Présence d'une fibrose interalvéolaire, n (%)	10 (55,6%)	12 (66,7%)	ns
Intensité* de la fibrose (score moyen ± EC)	0,7 ± 0,8	1,1 ± 1,1	ns
Emphysème centro-lobulaire, n (%)	14 (77,8%)	14 (77,8%)	ns
Intensité* de l'emphysème (score moyen ± EC)	0,9 ± 0,7	1,1 ± 0,7	ns
Macrophages (n moyen/champ sur 5 champs)	24	22	ns
Macrophages empoussiérés (%)	28,9	54,8	<0,01
Macrophages empoussiérés avec PMR (%)	0,1	4,7	<0,0001
Autres zones d'intérêt			
Présence de BALT, n (%)	8 (44,4%)	6 (33,3%)	ns
Ratio BALT/nombre de bronches	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,3	ns
Présence de PMR (plèvre/septa), n (%)	10 (55,6%)	12 (66,7%)	ns

* Score semi-quantitatif de l'intensité pour chaque paramètre (de 0 à 3)

BALT : tissu lymphoïde associé aux bronches, PMR : particules minérales réfringentes,

Il est à noter que l'étude des tissus pulmonaires après une coloration de Perls n'a pas montré de différence statistiquement significative concernant la présence et la quantité de sidérophages entre les deux groupes de patients. La recherche de corps ferrugineux et/ou asbestosiques a été négative sur toutes les lames histologiques, ce qui est habituel compte tenu de la rareté sur de ces éléments sur de simples coupes de poumon.

IV.2.2.1 Zones bronchiolaires

Concernant les paramètres histologiques bronchiques et bronchiolaires évalués, il n'existe pas de différence significative pour l'inflammation en nombre de patients atteints et en intensité. D'autre part, bien qu'il n'y ait pas de différence relative à la présence de fibrose périvascularaire chez les cas ou chez les sujets témoins, un score significativement plus intense a été attribué chez les cas ($p < 0,01$). De même, les dépôts anthracosiques, présents chez tous les sujets (cas ou témoins), sont plus abondants chez les cas que chez les témoins ($p < 0,01$). Enfin, le nombre moyen de PMR au niveau des bronches et des bronchioles est augmenté significativement ($p < 0,01$) chez les cas par rapport aux sujets témoins non exposés à la silice (**Tableau 9; Figure 25A**).

IV.2.2.2 Zones vasculaires

Pour les paramètres histologiques évalués au niveau périvasculaire, il est à noter que la fibrose périvasculaire est présente chez quasiment tous les sujets, qu'ils soient cas ou témoins, mais celle-ci est significativement plus sévère ($p < 0,01$) chez les cas par rapport aux sujets témoins. Concernant les dépôts anthracosiques dans les vaisseaux, ils sont présents chez tous les sujets, cas ou témoins, mais l'abondance périvasculaire de dépôts anthracosiques est plus importante chez les cas que chez les sujets témoins ($p < 0,05$). Enfin, le nombre moyen de PMR en périvasculaire rapporté au nombre d'artérioles sur une même coupe de poumons est augmenté significativement ($p < 0,0001$) chez les cas par rapport aux sujets témoins. Ces principaux résultats sont représentés graphiquement en **Figure 25B**.

IV.2.2.3 Zones alvéolaires

Le remodelage alvéolaire a été évalué, notamment en regardant la fibrose interalvéolaire et l'emphysème centro-lobulaire, mais il n'a aucune différence statistiquement significative en matière de présence ou d'intensité que ce soit chez les cas ou chez les sujets témoins. A nombre moyen de macrophages par champ comparable (en moyenne 22 chez les cas *versus* 24 chez les témoins), les macrophages dans les alvéoles sont significativement davantage empoussiérés chez les cas que chez les sujets témoins non exposés (54,8% *versus* 28,9%, $p < 0,01$). De même, le pourcentage de macrophages contenant des PMR est significativement

Volet PURESNOW-RETRO

Résultats

plus important chez les cas que chez les sujets témoins non exposés (4,7% *versus* 0,1%, $p < 0,0001$). Ces principaux résultats sont représentés graphiquement en **Figure 25C**.

IV.2.2.4 Autres zones d'intérêt

Il n'existe pas de différence significative associée aux autres lésions pulmonaires évaluées telles que la présence de BALT, le ratio BALT/nombre de bronches ou encore le nombre de PMR au sein de la plèvre et des septa inter-lobulaires.

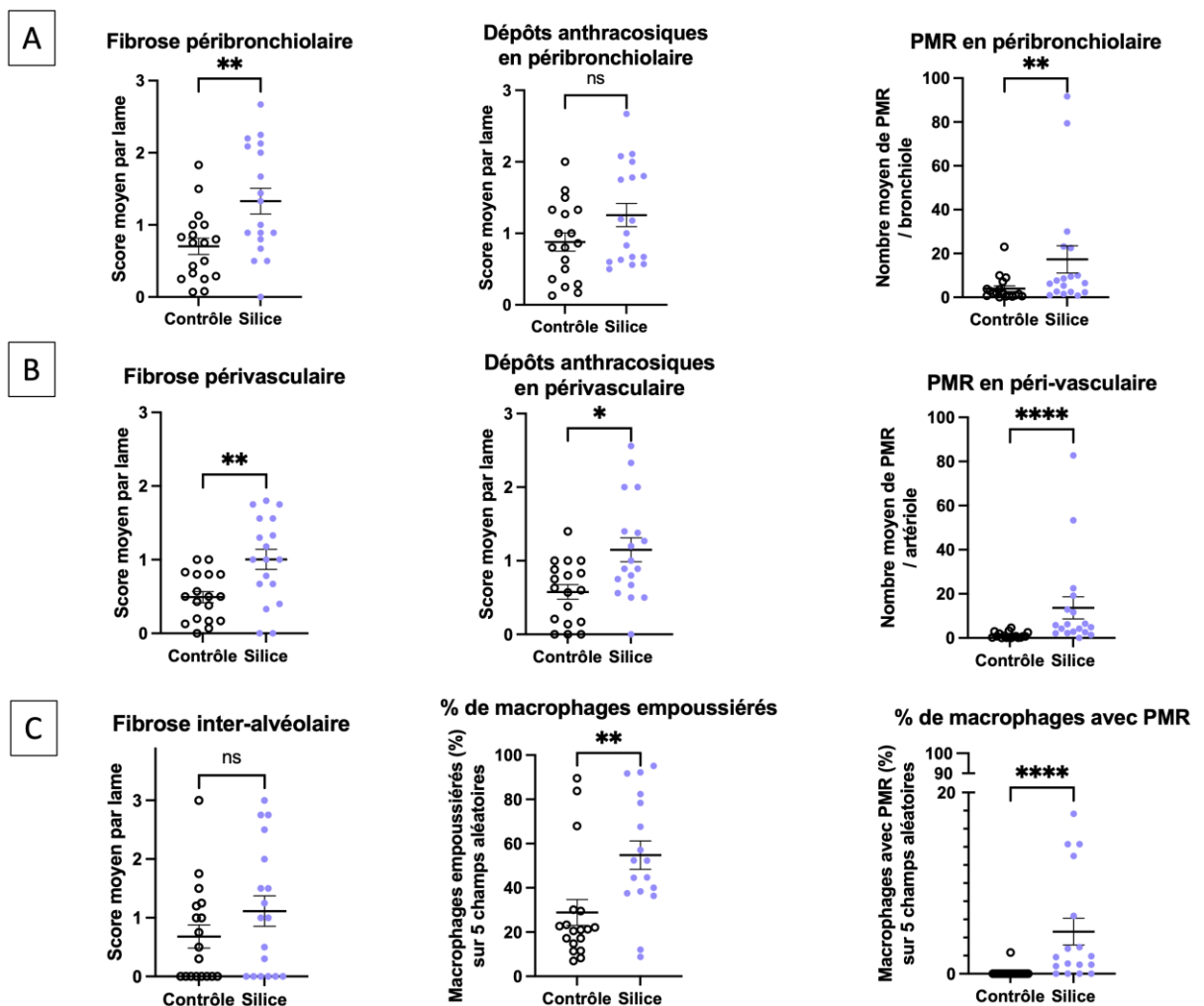


Figure 25 : Semi-quantification de la fibrose bronchiolaire (A), périvasculaire (B) et alvéolaire (C) et des macrophages empoussiérés ou comportant des particules minérales réfringentes sur les coupes de parenchyme pulmonaire de sujets exposés à la silice (groupe Silice) et de sujets témoins non exposés (groupe Contrôle). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, et **** $p < 0,0001$.

IV.2.3 Cartographies élémentaires en μ XRF

Au cours des 5 jours passés sur la ligne de faisceau LUCIA, il a été possible d'analyser 12 échantillons de tissus pulmonaires non tumoraux inclus en paraffine, 7 provenant de sujets exposés professionnellement à la silice cristalline et 5 de sujets témoins non exposés.

Premièrement, pour le temps de faisceau au seuil d'énergie du Si (1,9keV), nous avons pu acquérir 10 cartographies globales (2000 μ m X 2000 μ m ; une par coupe de poumon) et 21 cartographies de zones comportant un signal plus important en Si (500 μ m X 500 μ m en moyenne ; une à plusieurs pour une même coupe de poumon). Ce premier ensemble de données obtenues au seuil du Si confirme la présence ubiquitaire attendue du Silicium tant chez les cas que chez les sujets témoins.

Deuxièmement, pour le temps de faisceau au seuil d'énergie du S (2,55keV), une cartographie de tous les échantillons a été acquise, ce qui représente 12 cartographies globales (2000 μ m X 2000 μ m ; une par coupe de poumon) et 17 cartographies de zones comportant un signal plus important en Si (500 μ m X 500 μ m en moyenne ; une à plusieurs pour une même coupe de poumon). La comparaison de ces cartographies μ XRF avec les coupes histologiques HES nous a permis d'identifier qu'un signal Si élevé était présent dans les zones de remodelage pulmonaire avec fibrose périvasculaire et péribronchiolaire (**Figure 26**), et/ou au niveau des zones de fibrose interalvéolaire (**Figure 27**) tant chez les cas que chez les sujets témoins.

Volet PURESNOW-RETRO

Résultats

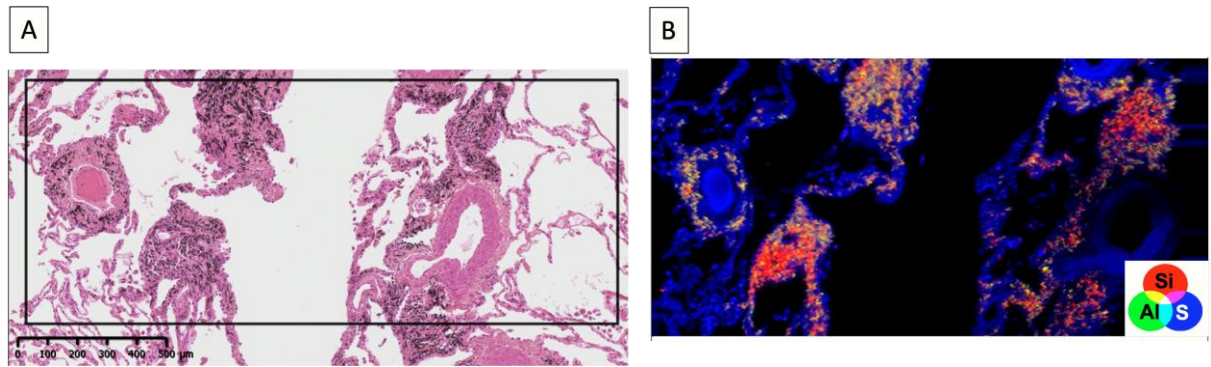


Figure 26 : Fibrose périvasculaire et péribronchiolaire sur une coupe histologique de parenchyme pulmonaire colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) obtenue chez un sujet exposé à la silice cristalline (A). - Cartographie globale (2000 μm X 2000 μm) correspondante acquise par microfluorescence X correspondant à la coupe de tissu A au seuil du S à 2,55 keV après traitement par le logiciel PyMCA (en rouge : Silicium (Si) ; en vert : Aluminium (Al) ; en bleu : soufre (S)) (B).

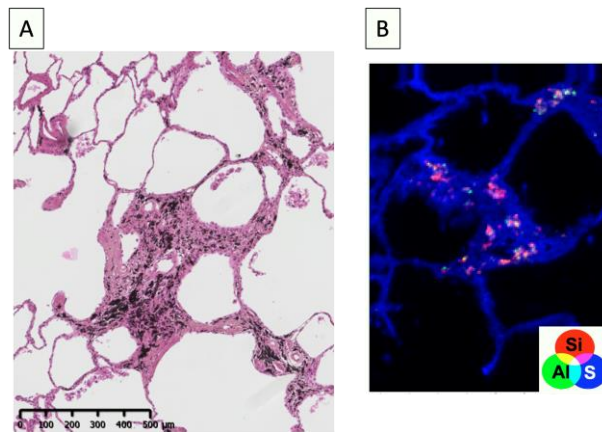


Figure 27 : Fibrose interalvéolaire sur une coupe histologique de parenchyme pulmonaire colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) obtenue chez un sujet exposé professionnellement à la silice cristalline (A) - Cartographie d'une zone comportant un signal plus important en Si (500 μm X 500 μm) correspondante acquise par microfluorescence X correspondant à la coupe de tissu A au seuil du S à 2,55 keV après traitement par le logiciel PyMCA (en rouge : Silicium (Si) ; en vert : Aluminium (Al) ; en bleu : soufre (S)) (B).

Dans ce deuxième lot de cartographies globales acquises au seuil du S, une analyse par une approche semi-quantitative a permis d'estimer la quantité d'éléments chimiques du tissu pulmonaire (S) et la quantité de Si. Tout d'abord, la surface totale recouverte par le signal de l'élément S a été quantifiée. Cet élément représentant indirectement le tissu pulmonaire, la comparaison du signal entre les cas et les témoins a permis de confirmer que les cartographies globales acquises sont comparables en matière de représentativité du tissu pulmonaire (**Figure 28A**). Avant de déterminer l'importance relative du signal Si par rapport au signal du S au seuil du S, la surface recouverte par le signal de l'élément Si a également été évaluée et

Volet PURESNOW-RETRO

Résultats

ajustée sur ImageJ avec 2 seuils de pixels minimum (**Figure 28B**). Un seuil bas a été estimé pour détecter tout signal à partir de 400 pixels au minimum. Un seuil haut a été estimé pour détecter tout signal à partir de 950 pixels minimum. Les analyses semi-quantitatives des rapports de signaux Si/S n'ont pas permis d'observer une différence significative entre les cas et les sujets témoins, ceci quel que soit le seuil de pixel minimum ajusté pour le signal Si (**Figure 28C**).

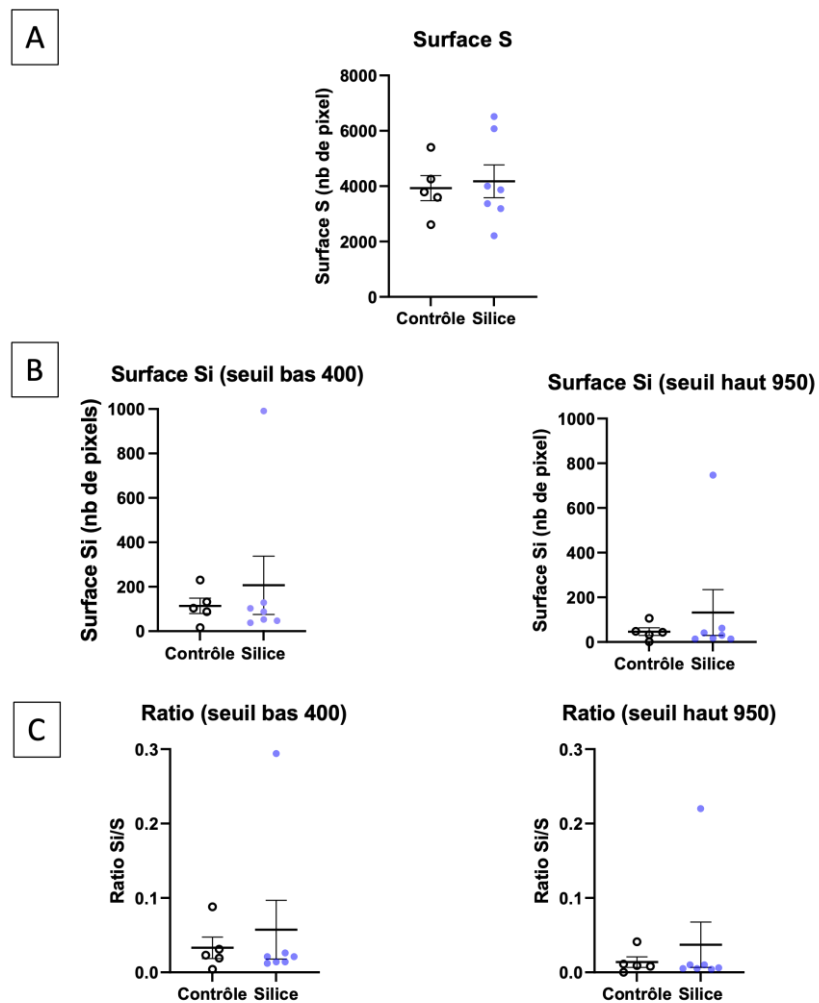


Figure 28 : Semi-quantification des cartographies globales en microfluorescence X chez les sujets exposés à la silice (groupe Silice) et les sujets témoins non exposés (groupe contrôle). Surface totale du signal du soufre (S) sur les cartographies globales représentant indirectement le tissu pulmonaire (A). Quantification de la surface totale du signal du Silicium (Si) ajustée à 2 seuils de pixels minimum (un seuil bas à 400 pixels minimum et un seuil haut à 950 pixels minimum) (B). Ratios de surfaces totales de signaux Si/S (C).

IV.3 Synthèse des résultats du volet PURESNOW-RETRO

Les analyses histologiques réalisées à l'aide de scores semi-quantitatifs ont mis en évidence notamment la présence d'une fibrose péribronchiolaire et d'une fibrose périvasculaire chez tous les patients exposés à la silice (n=18) et chez tous les sujets témoins non exposés professionnellement (n=18). En revanche, de façon intéressante, la sévérité de la fibrose péribronchiolaire et de la fibrose périvasculaire était plus importante chez les travailleurs exposés à la silice cristalline comparativement aux sujets témoins non exposés. Dans ces zones de fibres péribronchiolaires et périvasculaires, le nombre moyen de PMR était également augmenté significativement chez les travailleurs exposés à la silice cristalline par rapport aux sujets témoins non exposés. Par ailleurs, les analyses ayant permis d'obtenir des cartographies en μ XRF ont confirmé que le Si est préférentiellement retrouvé dans les zones de fibrose que ce soit chez les cas et les sujets témoins.

V Volet PURESNOW-BIO

L'objectif du volet expérimental et biologique PURESNOW-BIO est d'étudier s'il existe des phénomènes inflammatoires pulmonaires et/ou un remodelage pulmonaire 1) liés à la structure spatiale (cristalline *versus* amorphe), 2) et/ ou à la taille (micrométrique *versus* nanométrique) de silice et d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

Ce chapitre détaille la méthodologie et les résultats de deux études expérimentales successives, réalisées *in vivo* chez des souris exposées par aspirations oro-pharyngées uniques ou répétées à des doses réalistes de particules de silice (cristalline ou amorphe) contenue dans des aérosols particuliers issus de matériaux non nanostructurés, ou pures néosynthétisées :

- Dans un premier temps, afin de partir de la réalité du terrain, une première étude expérimentale dite « préliminaire » a été mise en place afin d'exposer des souris à des particules natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés contenant une fraction significative de silice cristalline. Cette étude préliminaire a permis de définir les contours de l'étude PURESNOW-BIO proprement dite (ci-dessous), notamment : les modalités pratiques d'administration de particules aux souris, de définir les différents temps d'exposition, en fonction des effets observés à des conditions réalistes (matériaux, doses répétées administrées et réalistes à des niveaux d'exposition extrapolable à l'Homme),
- Dans un second temps, à partir d'échantillons purs de particules silice néosynthétisées de taille nanométrique ou micrométrique et de structure cristalline ou amorphe, l'étude expérimentale « PURESNOW-BIO » permet d'étudier les effets toxicologiques pulmonaires de ces quatre types de silice pure.

V.1 Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

V.1.1 Résumé de l'article « Exposure to building materials dust containing crystalline silica micro- and nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary inflammation and lung remodeling in mice »

Introduction : De nos jours, le secteur du BTP emploie à l'échelle européenne environ 15 millions de travailleurs exposés quotidiennement par inhalation à des aérosols contenant des particules de nature et de taille variées (micrométriques et/ou nanométriques) (96). Le dioxyde de silicium ou plus communément appelé silice (SiO_2), est soit de structure cristalline, soit de structure amorphe. Du fait de son omniprésence dans de très nombreux matériaux de construction, le SiO_2 représente la majorité des particules émises non intentionnellement dans le milieu de la construction. En effet, l'un des plus courants polymorphes de la silice cristalline : le quartz, est naturellement contenu dans de nombreuses matières premières telles que le sable, le grès, le silex et le granit, mais aussi dans des matériaux manufacturés comme l'ardoise synthétique, le béton, la brique, le mortier et le ciment, notamment (10). Dans le passé, la silicose chronique a été l'une des premières pathologies professionnelles pour laquelle un lien épidémiologique a été établi avec la silice cristalline, avec de nombreux cas dans l'industrie minière. Cependant, ces dernières années, une épidémie de silicose aiguë a été observée dans plusieurs pays chez les travailleurs mettant en œuvre la pierre artificielle (32,33). De plus, d'autres études épidémiologiques démontrent que la silice cristalline induit non seulement des pathologies pulmonaires aiguës mais aussi des pathologies pulmonaires chroniques telles que la BPCO, la tuberculose ou la fibrose pulmonaire conduisant irréversiblement au cancer broncho-pulmonaire (37,41,42,44,97). En effet, la silice cristalline a été classée par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) en 1997 comme agent cancérigène certain pour l'Homme, c'est-à-dire dans le groupe 1 (46). Plus récemment, la silice cristalline a été également classée en 2017, comme agent cancérigène certain pour l'Homme par l'Union européenne (98). Suite à ces classifications, de nombreuses agences gouvernementales ont établi de nouvelles VLEP plus restrictives pour mieux protéger les travailleurs, avec pour la France une VLEP de $0,1\text{mg}/\text{m}^3$ pour le quartz.

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Du côté des études expérimentales, nous avons publié une revue de la littérature très récente sur les effets respiratoires non tumoraux de la silice (57). Cette revue basée sur 70 articles *in vivo* met en évidence les principaux effets pulmonaires de la silice, quelles que soient la taille ou la structure cristalline ou amorphe. Parmi ces effets, l'exposition aiguë et subaiguë entraîne une augmentation des polynucléaires neutrophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA), mais aussi une sécrétion de protéines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8. De plus, une augmentation importante de la protéine TGF- β 1, marqueur précoce de la fibrose, est souvent détectée dans le LLBA et le parenchyme pulmonaire des animaux exposés. Néanmoins, ces études expérimentales ont utilisé principalement des doses uniques et/ou élevées, voire très élevées, de silice cristalline micrométrique sans tenir compte des VLEP en milieu professionnel, donc peu réalistes (57).

Par conséquent, l'hypothèse testée dans cette étude expérimentale « préliminaire » est que des aérosols particuliers riches en particules de silice cristalline issus de matériaux non nanostructurés pourraient être à l'origine d'une inflammation et/ou d'un remodelage pulmonaire à des doses répétées et réalistes (en tenant compte de la VLEP).

Matériel et méthodes : Cette étude expérimentale « préliminaire » a été réalisée chez des souris Wild-Type C57BL6 exposées par aspiration oro-pharyngée à des échantillons de NaCl 0,9% ou de particules SRM (Standard Reference Material) 679 (Brick Clay = brique) ou SRM 1887b (Ciment Portland), soit de façon unique avec une observation à 24h des effets aigus potentiels, soit de façon répétée avec une dose cumulée hebdomadaire et avec une observation des effets subchroniques et chroniques à 1 et 3 mois respectivement. Les échantillons SRM correspondent à des particules natives issues de matériaux de construction non nanostructurés broyés mécaniquement contenant une fraction significative de silice cristalline de taille micrométrique (50% et 20% respectivement). Les doses ont été déterminées par extrapolation en cohérence avec une exposition professionnelle humaine réaliste (5 et 50 μg chaque semaine, représentant 10% et 100% de la VLEP aux poussières alvéolaires non spécifiques, c'est-à-dire 0,5 mg/m^3 et 5 mg/m^3), par conséquent très proche de la VLEP du quartz compte tenu des teneurs en quartz dans chacun des échantillons.

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Résultats : Brièvement, les résultats obtenus suggèrent un profil inflammatoire avec une sécrétion de macrophages et de polynucléaires neutrophiles, mais aussi un remodelage pulmonaire partiel chez les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 µg de particules SRM679 pendant 3 mois. En effet, il existe en premier lieu une augmentation significative du nombre de macrophages alvéolaires sur les coupes histologiques de poumon de souris et du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le LLBA chez les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 µg de particules SRM679 pendant 3 mois. Ces résultats sont renforcés par l'analyse de l'expression de protéines de l'inflammation dans le LLBA en Luminex® avec des résultats concordants avec le recrutement des cellules inflammatoires observées à savoir une augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β et TNF- α pour les macrophages alvéolaires, et KC pour les polynucléaires neutrophiles. Par ailleurs, il existe de façon très intéressante en histologie des formations lymphoïdes de type BALT. En revanche, il n'a pas été montré de remodelage pulmonaire bronchiolaire et/ou alvéolaire par les analyses histologiques et morphométriques employées. Par ailleurs, aucun effet inflammatoire ou de remodelage pulmonaire n'a été observé dans le groupe de souris exposées aux particules SRM 1887b (Ciment Portland), à l'exception d'une augmentation de l'expression de la protéine TGF- β 1 dans le surnageant du LLBA pour les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 µg de particules SRM1887b au temps d'exposition J1. Dans cet échantillon particulière, la caractérisation physico-chimique en MET-EDX a montré que les particules de silice cristalline étaient le plus souvent recouvertes par du calcium. Cet enrobage pourrait potentiellement créer une réactivité moindre et/ou une clairance pulmonaire modifiée.

Conclusion : Tout d'abord, les résultats obtenus chez les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 µg de particules SRM679 pendant 3 mois confirment notre hypothèse selon laquelle les échantillons de matériaux contenant une teneur élevée en silice cristalline pourraient être impliqués dans des phénomènes inflammatoires à des doses répétées et réalistes. Cependant, les résultats de cette étude expérimentale « préliminaire » montrent qu'il existe des questions en suspens, notamment sur la possible apparition d'une fibrose au-delà de 3 mois et si les effets inflammatoires et de remodelage pulmonaires observés sont liés ou non à la fraction silice de ces échantillons. C'est pourquoi, il s'est avéré important d'étudier dans une seconde étude expérimentale d'étudier si les effets inflammatoires et de

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

remodelage pulmonaires observés sont confirmés à un temps d'exposition plus long (6 mois) et sont spécifiquement en lien avec une exposition à des micro- et nanoparticules néosynthétisées de silice cristalline et amorphe.

V.1.2 Article original « Exposure to building materials dust containing crystalline silica micro- and nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary inflammation and lung remodeling in mice »

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Exposure to building materials dust containing crystalline silica micro- and nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary inflammation and lung remodeling in mice

Vanessa Marques Da Silva¹, Pierrick Montagne¹, Jeanne Tran Van Nhieu^{1,2}, Marie-Laure Franco-Montoya¹, Laurent Martinon³, Karine Beugnon³, Jean-Claude Pairon^{1,4}, Sophie Lanone¹, Pascal Andujar^{1,4*}.

¹ Université Paris Est Créteil, INSERM U955, IMRB, F-94010 Créteil, France

² APHP Henri Mondor, F-94010 Créteil, France

³ Service Parisien de Santé Environnementale de la Ville de Paris, Laboratoire Amiante Fibres Particules, F-75013 Paris, France

⁴ Hôpital Intercommunal de Créteil, Service de Pathologies Professionnelles et de l'Environnement, F-94010 Créteil, France

*Corresponding author:

Pascal Andujar

Address: Faculté de Santé, 8 rue du Général Sarrail, Créteil, F-94000, France

Email: pascal.andujar@inserm.fr

Phone: +33 1 57 02 20 95

Authors' contributions

JCP, SL and PA designed the study.

VDSM and JTVN performed the histological analysis.

VMDS, PM and MLFM performed all biological experiments.

LM and KB performed all imaging experiments.

VDSM and PA drafted the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Abbreviations

BALF: Broncho-alveolar lavage fluid;
EDX: Energy dispersive X-ray;
G-CSF: Granulocyte colony stimulating factor;
HE: Hematoxylin-eosin;
IFN- γ : Interferon gamma;
IHCh: Immunohistochemical;
IP-10: Interferon-inducible Protein 10;
KC: Keratinocyte chemoattractant;
LDH: Lactate dehydrogenase;
LIF: Leukemia inhibitory factor;
MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1;
MIG: Monokine induced gamma interferon;
MIP: Macrophage inflammatory protein;
MLI: Mean linear intercept;
OEL: Occupational exposure limit;
TEM: Transmission electron microscopy;
TGF: Transforming growth factor;
TNF: Tumor necrosis factor;
SEM: Standard error of mean;
SiO₂: Silica;
SRM: Standard reference material.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to address a special thanks to members of Institut Mondor pour la Recherche Biomédicale [IMRB] – Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale [Inserm] U955, Créteil, France: Adrien Lalot, Alice Da Silva and Florine Weber (EP3 Animal facility); Xavier Decrouy, Christelle Micheli and Wilfried Verbecq-Morlot (Imaging facility); Mathieu Surenaud (Immunomonitoring facility).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Abstract (253 word)

Background: Numerous epidemiological studies have shown that crystalline silica can induce acute and chronic lung diseases, such as silicosis or chronic obstructive pulmonary disease. Moreover, previous experimental studies have shown that crystalline silica (quartz) can induce severe lung inflammation and fibrosis, but only at very high administered doses far from realistic levels of exposure observed during work situations of construction workers, considering the occupational exposure limit value. We therefore designed an in vivo experimental study aimed to investigate the pulmonary effects, in mice, of repeated exposure to building dust containing crystalline silica administrated at occupationally-relevant doses.

Methods: To achieve our aim, we chose two building materials with a high rate of crystalline silica, SRM 1887b (Portland cement) and SRM679 (Brick Clay) dusts. These samples were administrated weekly up to 3 months by pharyngeal aspiration at two different realistic doses: 5 and 50 µg chosen as occupationally-relevant corresponding to 0.1-1 mg/m³ of quartz after extrapolation, respectively.

Results: 3 month-repeated exposures to 50 µg of SRM679 induced pulmonary effects characterized by macrophagic and neutrophilic inflammatory profiles and initial pro-fibrotic events. In contrast, SRM1887b particles did not induce any adverse effect, whatever administrated dose and exposure duration. Transmission Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray analyses showed that silica particles of SRM 1887b are coated by calcium, which could explain the absence of pro-inflammatory effects.

Conclusions: These findings based on repeated and realistic low doses of crystallin silica confirm the necessity to reconsider the occupational exposure limit values and study the effects of crystalline and amorphous silica micro- and nanoparticles.

Keywords: Lung remodeling – inflammation – fibrosis – particles – silica – quartz – occupational exposure limit value – building construction.

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Introduction

In Europe, about 15 million workers are employed in building and roadway construction and are potentially exposed by inhalation to aerosols containing silica micro- and nanoparticles (1). Crystalline and amorphous silica or silicon dioxide (SiO₂) particles are essentially non-intentionally emitted from construction materials (e.g., quartz in sand, sandstone, flint and granite), or manufactured materials incorporated in slate, concrete, brick, mortar and cement (2).

Chronic silicosis is a progressive lung micronodular and fibrotic disease resulting from occupational inhalation of respirable crystalline silica dust, initially known in mining industry. Recently, acute silicosis epidemic occurred in artificial-stone cutter-workers worldwide, such as in Portugal, Italy, Spain or Israel (3–5). Moreover, other epidemiological studies demonstrate that crystalline silica induces also emphysema, chronic bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease, autoimmune diseases (e.g., systemic sclerosis, or rheumatoid arthritis), lung fibrosis or cancer (6–10). Indeed, crystalline silica was classified as certain human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in 1997 and more recently the European Union in 2017 (11). Thus, many countries have established an occupational exposure limit (OEL) of 0.05 or 0.1mg/m³ for quartz. Recently, a systematic review has been published focusing on non-tumoral pulmonary toxicity of silica linked to its micro- or nanometric particle size and crystal structure based on in vivo and in vitro experimental studies (12). The structure and capacity to trigger oxidative stress and inflammation or fibrosis, are recognized as relevant determinants in crystalline silica's toxicity, but at very high doses administrated. Indeed, recent experimental studies appear to point towards significant toxicity of manufactured amorphous silica nanoparticles similar to that of micrometric crystalline silica.

Our underlying hypothesis is that repeated and realistic doses of dust rich in crystalline silica emitted from classical building materials, may induce lung inflammation and/or remodeling at. Therefore, two samples of dusts rich in silica have been chosen (i.e., Brick Clay (SRM679) and Portland cement (SRM1887b)). These dusts were weekly administrated to mice up to 3 consecutive months, at 2 doses each one being relevant to occupational settings: 5 or 50 µg, chosen as occupationally-relevant to the building activity, corresponding to 0.005-0.015 mg/m³ of quartz. Our results demonstrate that 3 month-repeated exposures to 50 µg of

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

SRM679 particles induced lung inflammation and initial fibrotic events. Overall, these data provide new evidence for a potential risk for health of repeated exposure to dust rich in crystalline silica at occupationally-relevant doses.

Methods

Physico-chemical characterization and preparation of SRM particles

Two dust samples Brick Clay (SRM679) and Portland cement (SRM1887b) were purchased from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA), containing, according to the manufacturer's data, 52.0% and 19.6% of Silicium (Si) in mass and 0,1% and 0,3% of quartz, respectively. Both construction materials were previously mechanically grounded to pass through a 75µm sieve. Both SRM particles were suspended in saline at 5mg/mL, vortexed and stored at -20°C. Each SRM sample was free of bacterial endotoxin, using Limulus Amebocyte Lysate endotoxin (LALe) test performed according to supplier's instructions (Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quantification Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). SRM samples were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM)-Energy Dispersive X-Ray (EDX) (TEM-EDX) analysis ((JEOL-JEM-1400 Electron Microscopy; Inca X-sight/Oxford Instruments Camera, Gometz-la-Ville, France).

Animal housing and handling

Male adult C57/Bl6 mice 8-10 weeks of age were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and acclimated during 1 week. Animals were housed in cages, with a maximum of 5 mice per cage to avoid isolation under standard environmental conditions (25°C, air humidity rate 55% and 12h light/dark cycle). All mice were supplied with food (Rat/Mouse VRF1 10mm sterilized S9343-S403, SSNIFF, Soest, Germany) and sterilized tap water *ad libitum* in standard wire-topped cages in a controlled environment, with a 12 h light/dark cycle. All experiments were approved by our local Institutional Animal Care and Use Committee of the French Ministry of Research (accreditation C94-028-028, EU APAFIS 0633, reference n°9407).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Animal exposure to SRM particles

To estimate the amount of SRM particles in our study to administer in order to be relevant for realistic occupational exposure, we utilized the following equation taking into account the French occupational exposure limit (OEL) of unspecific alveolar dusts (5 mg/m³) and quartz (0.1 mg/m³) (12): Daily deposited dose of SRM particles = OEL × inhaled air volume per time unit × exposure duration × SRM particle deposition efficiency with 1/OEL at 5 mg/m³; 2/a mean minute ventilation at 50.000 mL/min (tidal volume of 20000mL and respiratory frequency of 25/min for a worker with moderate to high activity); 3/a daily occupational exposure of 8 h; 4/a mean total lung deposition efficiency of particles at 20% for an average particle aerodynamic diameter of 2,5 µm (13–15). Given the average worker weight (75 kg) and the average weight of the mice (30 g), overall, the daily SRM particle lung burden was estimated at 10 µg per mice per day. The daily deposited dose of SRM particles for a mouse was estimated at 50 µg for 5 mg/m³ OEL. Moreover, both SRM679 and SRM1887b samples contain between 52% and 19,6% mass fraction of quartz respectively. These corresponding to a mass concentration of 0.1-1 mg/m³ of quartz respectively. Importantly, these calculations do not account for particle clearance, but provide an estimate of the plausible exposure concentrations.

For each experiment, both SRM particles were diluted in saline to appropriate concentrations (5 or 50 µg/20 µL of saline), vortexed and then sonicated for 20 min in a 37 kHz bath (Elmasonic S30H, Singen, Germany). Once a week, mice received 20 µL of saline (control group), 5 or 50 µg of SRM particles administered by non-surgical oropharyngeal aspiration performed under intraperitoneally anaesthesia (75mg/kg of ketamine (Virbac, Carros, France) plus 15mg/kg of xylazine (Bayer, Puteaux, France). Sacrifice of anesthetized mice were performed after 24 h, 1 or 3 months after the first exposure. A schematic representation of the experimental protocol is given in Supplemental Figure S1.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Broncho-alveolar lavage fluid and lung tissue and collections

Immediately after sacrifice, right lung was inflated, fixed with 4% of formalin (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) at a constant pressure of 20 cm H₂O and paraffin-embedded for further histological and immunohistochemical (IHCh) analysis. Paraffin-embedded medial frontal lung tissue sections (3 µm) were stained with hematoxylin-eosin (HE) for histological examination. Before being frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C, left lung was lavaged twice with 1mL of physiological saline, removed from the chest cavity. Broncho alveolar lavage fluid (BALF) were immediately frozen at -80°C for use in further experiments.

BALF analysis

Total and differential cellularity quantification in BALF

Free alveolar cells were recovered from BALF by centrifugation at 400 g for 10 min at +4°C. The cellular pellet was suspended in 150 µL of saline in order to obtain 1×10⁶ cells/mL. An aliquot of the cell suspension was then examined using a hemocytometer to evaluate the total white cell number. For differential counts, the cell suspension was cytopsin (Wescor CytoPro 7620, Puteaux, France), fixed in methanol, and stained using Diff Quick solution (Dade Behring, La Défense, France). Double total and differential counting procedure of 100 cells per sample was performed with an optical microscope (Axioplan 2, Oberkochen, Germany).

Alveolar epithelial barrier integrity and cytotoxicity evaluations in BALF

Total protein content and released LDH concentrations in BALF were determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France) and by the Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Basel, Switzerland), respectively, according to supplier's instructions. Absorbance was measured at 595nm and 492nm respectively by spectroscopy (TECAN, Infinite M200PRO, Männedorf, Switzerland).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Early lung fibrosis marker in BALF

In order to evaluate lung fibrosis in BALF, content in Transforming growth factor beta (TGFβ-1) was measured using Mouse kit TGFβ-1 Quantikine ELISA (R&D Systems Minneapolis, USA) according to supplier's instructions.

Lung inflammation in BALF

Lung inflammatory responses in BALF was evaluated thorough 32 pro-inflammatory proteins (eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, RANTES, TNF-α, VEGF) quantification by Luminex® technology (Luminex Corporation, Austin, USA), using a specific kit (MCYTOMAG-70K, Merck Millipore, Saint-Quentin, France), according to manufacturer's instructions. In addition, when the detection of some proteins was below the minimum detection limit, it was arbitrarily chosen to assign half the concentration of this detection limit for each sample in this situation, in order to be able to interpret the statistical data and minimize bias between proteins detected below this limit and those not detected.

Histological and immunohistochemical analysis

Histological analysis

The occurrence, localization and severity of histological lesions were analysed (magnification X200) and assessed using a semi-quantitative score adapted from Ashcroft et al. (12,16).

Alveolar and bronchiolar remodelling

Mean Linear Intercept (MLI) method is a representation of the alveolar density and therefore a lung remodelling index (17). For each mouse, 20 field pictures of stained lung tissue section were randomly selected (x 200 magnification) using an optical microscope (Axioplan 2, Oberkochen, Germany) equipped with a camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany; Zeiss Zen

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

2012 software). The results obtained per mouse are the average of the MLI found for the 20 fields (μm).

Bronchiolar remodelling was estimated using bronchial wall thickness measurements of small bronchioles (diameter $< 200 \mu\text{m}$) in stained lung tissue sections. For each mouse, at least 7 circular bronchiole pictures were selected using an optical microscope (Axioplan 2) equipped with a camera (Carl Zeiss). Then, 10 equidistant thickness measurements were made around the entire circumference of each bronchiole (ImageJ software, version 1.44, National Institute of Health, USA). The average of these 10 equidistant measurements were used to obtain the mean thickness value of a bronchiole. The mean thickness values of each bronchiole were then summed and averaged for each animal to obtain the mean thickness value of all bronchioles of an animal (μm).

Alveolar macrophage recruitment quantification

Deparaffinized tissue sections were immunolabelled with specific antibodies directed against murine MAC-3 protein (mouse rat anti-MAC-3, BD Biosciences, New Jersey, USA) by diaminobenzidine labelling. For each mouse, pictures of 20 fields per immunolabelled medial frontal lung tissue section were randomly selected using an optical microscopy (Axioplan 2) equipped with a camera (Carl Zeiss). Alveolar macrophages recruitment score is the total sum of the number of macrophages in each field for the 20 fields.

Statistical analysis

Twenty animals per experimental group were used for each timepoint and each dose, except for 10 mice weekly exposed to 5 or 50 μg of SRM1887b particles during 1 or 3 months. Taking into account the possibility of non-normal distribution in the hypothetical mice population, and the number of mice (lower than 30 independent mice), nonparametric tests (Kruskal–Wallis statistical test followed by Dunn’s multiple comparison test) were used (GraphPad Prism software, version 9.01, La Jolla, CA, USA). For all statistical tests, p values smaller than 0.05 were considered as significant. Values were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) as a scatter plot (18).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Results

Physical and chemical characterization of SRM particles

Chemical element analysis of SRM 679 and SRM 1887b samples confirmed data provided by the supplier. As expected, Si represented 50% and 20% of chemical elements, respectively (Figure 1A and B). Isolated particles containing Si confirmed that those samples were mainly composed of crystalline silica after diffraction analysis (data not shown). Crystalline silica particles were agglomerates/aggregates with other types of particles : aluminium (Al) in SRM 679 sample and calcium (Ca) in SRM 1887b sample. Mean sizes of SRM 679 and SRM 1887b particles were micrometric, 2.34 μm (± 1.52) and 2.20 μm (± 1.52), respectively. In addition, isolated nanoparticles containing Si chemical elements were also identified (Figure 1C and D).

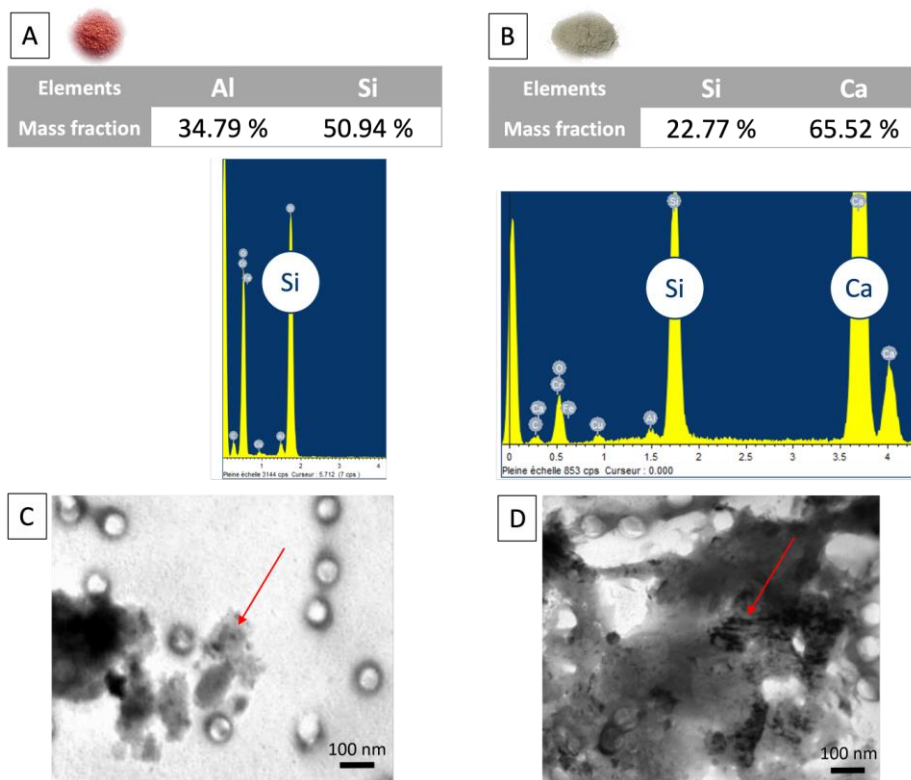


Figure 1: Physico-chemical characterization and chemical element quantification of SRM679 (1A,1C) and SRM1887b (1B,1D) particles by Transmission Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray (TEM-EDX) analyses. Nanoparticles containing Silicium elements (red arrows) in SRM679 (1C) and SRM1887b (1D) particles samples by TEM (scales = 100nm).

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Lung inflammation

As the presence of particles in the lungs has been related to the induction of lung inflammatory responses, we next explored total cellularity in BALF. Total cellularity account trend to increase not significantly in 3 month-repeated exposed mice to 50 µg SRM679 particles (Figure 2A). Differential cellularity account reflecting cellular profiles in BALF (i.e., alveolar macrophages, lymphocytes and neutrophils) was kept unchanged, whatever exposure duration, particle sample and dose. In contrast, neutrophils percentage was significantly increased in BALF in mice weekly exposed to 50 µg SRM679 particles, whatever exposure duration ($p < 0.001$, $p < 0.0001$ and $p < 0.01$, respectively) (Figures 2B and 2C).

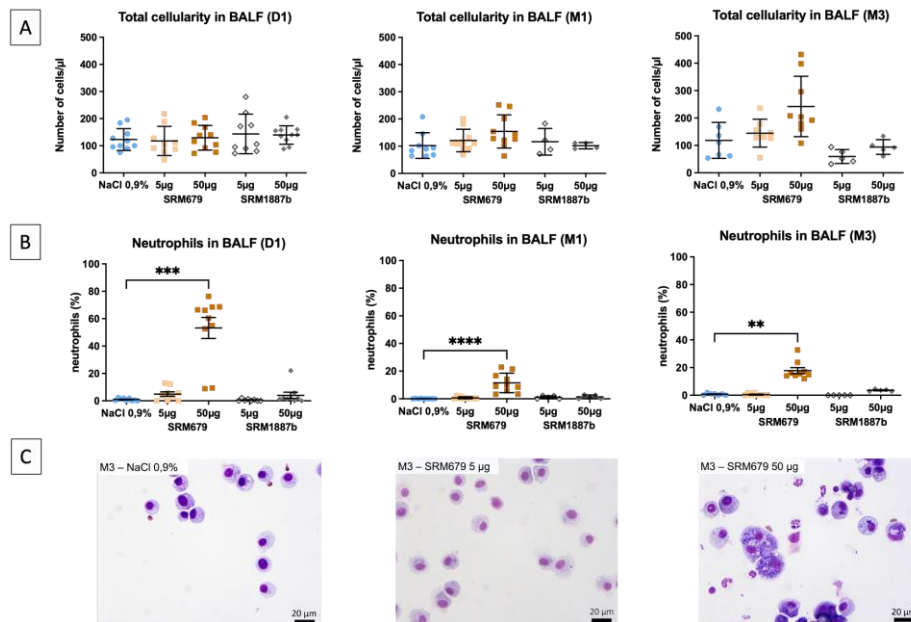


Figure 2: Lung cellularity in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) of mice weekly exposed to 5-50 µg of SRM679 or SRM1887b particles during 1 day (D1), 1 month (M1) and 3 months (M3). 2A: Total cellularity; 2B: neutrophils percentage in BALF; 2C: May-Grünwald-Giemsa stained cells in BALF of 3 month-exposed mice to saline (control group) or to 5 or 50 µg SRM679, respectively (scale = 20 µm). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$, compared to control group (NaCl 0.9%).

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

We next evaluated the release of 32 inflammatory cytokines, which represent important markers of the pulmonary response to particles exposure.

Among these pro-inflammatory protein expression analyses, 3 cytokines secreted by alveolar macrophages (i.e., Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1 or CCL2), Macrophage Inflammatory Protein 1 α and β (MIP-1 α or CCL3 and MIP-1 β or CCL4)) protein expressions were significantly increased only in 24h and 3 month-exposed mice to 50 μ g SRM 679 (Figure 3).

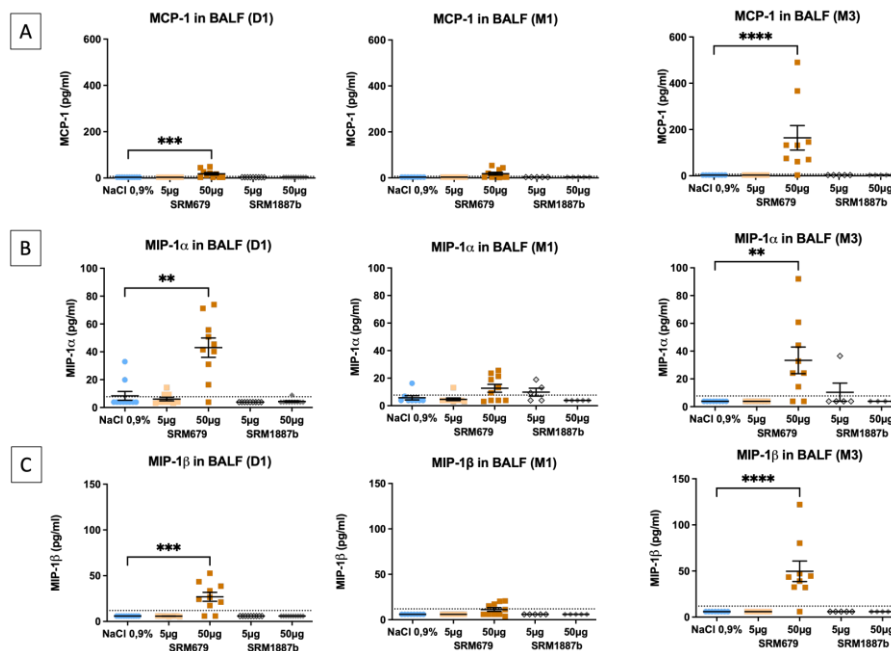


Figure 3: Pro-inflammatory cytokines (3A: MCP-1, 3B: MIP-1 α , 3C: MIP-1 β) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) of mice weekly exposed to saline (control group) or to 5-50 μ g of SRM679 or SRM1887b particles during 1 day (D1), 1 month (M1) and 3 months (M3). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$, compared to control group (NaCl 0.9%).

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

In addition, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) secreted by alveolar macrophages increases significantly only in 24h and 3 month-exposed mice to 50 μ g SRM679 particles ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$, respectively) (Figure 4A). Unlike, Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2 or CXCL2) protein expression was not modified, whatever particle samples, administrated doses or exposure duration (data not shown). Il-6 pro-inflammatory cytokine expression was particularly significantly increased only in 1 day, 1 and 3 month-exposed mice to 50 μ g SRM679 particles ($p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively) (Figure 4B). Moreover, in resonance with increased neutrophils percentage in BALF, the neutrophil chemoattractant KC (Keratinocyte Chemoattractant or CXCL1, IL-8 murine counterpart) expression was also significantly increased in repeated 1 day-, 1 month- or 3 month-exposed mice to 50 μ g SRM679 particles ($p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 4C).

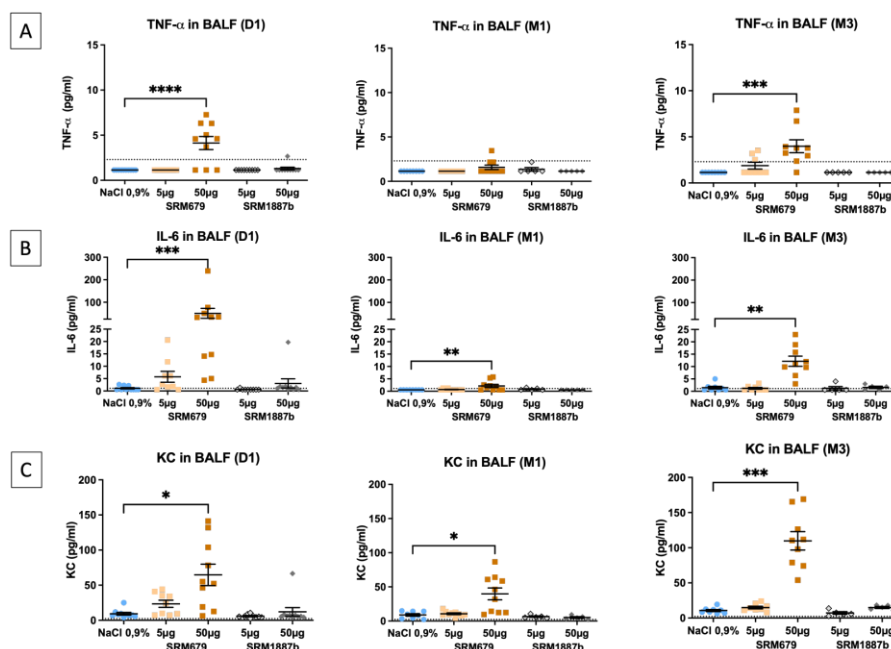


Figure 4: Pro-inflammatory cytokines (4A: TNF- α , 4B: IL-6, 4C: KC) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) of mice weekly exposed to saline (control group) or 5-50 μ g of SRM679 or SRM1887b particles during 1 day (D1), 1 month (M1) and 3 months (M3). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$, compared to control group (NaCl 0.9%).

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Furthermore, another IL-6 family cytokine, named Leukemia Inhibitory Factor (LIF), was also significantly increased only in weekly 24h-exposed mice to 50 µg SRM 679 particles ($p < 0.0001$) (Figure S2). Interestingly, interferon gamma (IFN- γ) cytokines family, such as Monokine Induced Gamma interferon (MIG or CXCL9) and Interferon-inducible Protein 10 (IP-10 or CXCL10) were also significantly increased in 1day-exposed mice to 50 µg SRM 679 and 1 day- and 3 month-exposed mice to 50 µg SRM 679, respectively, even if there was no secretion detected for IFN- γ (Figure S2).

Alveolar epithelial barrier integrity and cytotoxicity evaluations

We next addressed the epithelial barrier integrity. Total protein and lactate dehydrogenase (LDH) release in the BALF are two markers of this integrity. No modification was observed whatever SRM particle sample, exposure duration and administrated dose (data not shown).

Alveolar macrophages recruitment

In order to confirm a potential macrophagic activation, we next evaluated the alveolar macrophages recruitment in response to SRM particles exposure by MAC-3 immunohistochemistry. Alveolar macrophage number was significantly increased in 1 month-exposed mice to 50 µg SRM679 particles compared to control group ($p < 0.05$, Figure 5A). Alveolar macrophages were preferentially located in peribronchiolar regions (Figure 5B).

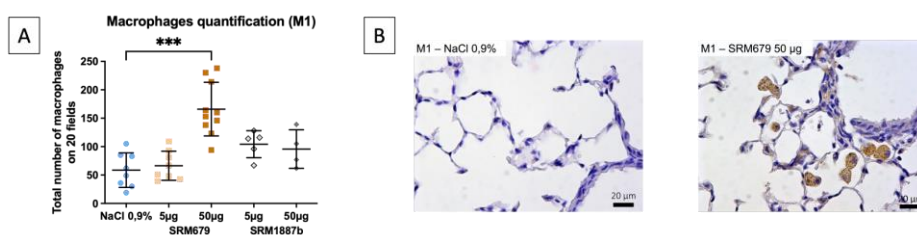


Figure 5: Macrophagic inflammatory response in lung tissue of mice weekly exposed to saline (control group) or to 5-50 µg of SRM679 or SRM1887b particles after 1 month exposure (M1) by MAC-3 immunohistochemistry labelling in brown (5A: total number of macrophages account in 20 random fields of lung tissue, 5B and 5C: MAC-3 stained macrophages in mouse weekly exposed to saline (control group) or 50 µg of SRM679 particles, during 1 month (M1), respectively (scale = 20 µm)). ***: $p < 0.001$, compared to control group (NaCl 0.9%).

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Lung remodelling

We next evaluated the lung remodelling beginning with lung fibrosis analyses. Histological analyses did not reveal any lung fibrotic lesion, whatever SRM particle type, timepoint or administrated dose. However, TGF- β 1 protein expression in BALF was significantly increased for 1 day-exposed mice to 50 μ g SRM1887b particles ($p < 0.05$) and for 1 and 3 month-exposed mice to 50 μ g to SRM679 particles ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 6).

In addition, we next addressed the alveolar and bronchiolar remodelling by morphometric analysis of control and exposed mice. Alveolar structure evaluation by MLI method or mean bronchial wall thickness was not significantly modified, whatever SRM particle type, timepoint or administrated dose (Figure 7A and 7B). In contrast, bronchus associated lymphoid tissue (BALT) were observed in all 3 month-exposed mice to 50 μ g SRM679 particles (Figure 7C).

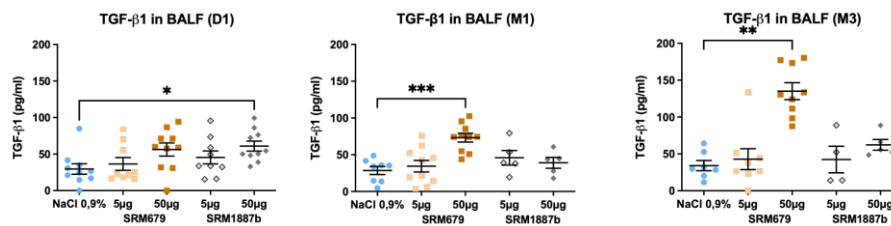


Figure 6: TGF- β 1 cytokine expression in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) of mice weekly exposed to saline (control group) or 5-50 μ g of SRM679 or SRM1887b particles during 1 day (D1), 1 month (M1) and 3 months (M3). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ compared to control group (NaCl 0.9%).

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

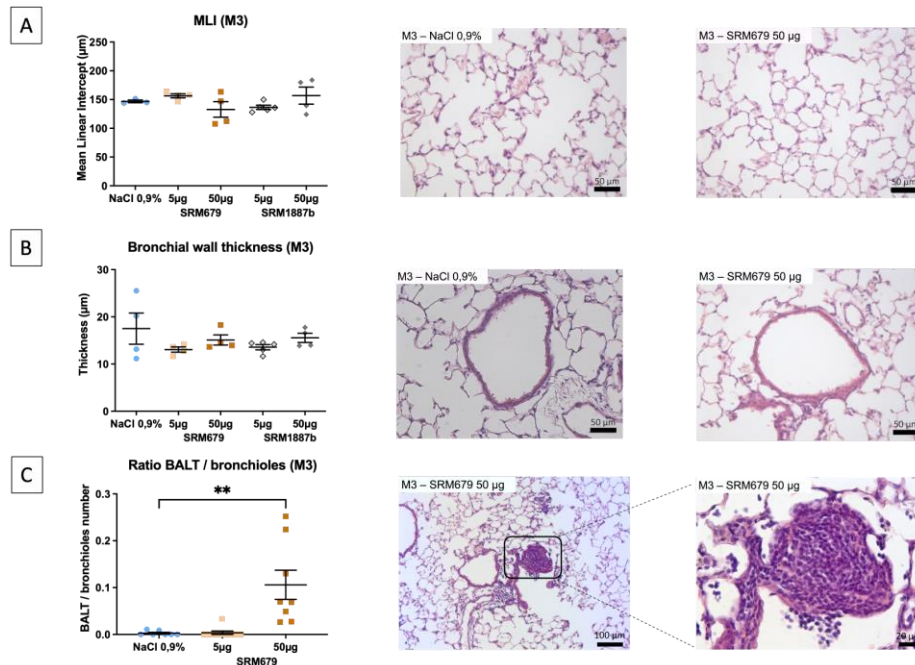


Figure 7: Alveolar remodelling assessed by the measure of Mean Linear Intercept (MLI) (7A) in 3 month (M3)-exposed mice to saline (control group) or 5-50 µg of SRM679 particles. *: p<0.05; **: p<0.01, compared to control group (NaCl 0.9%). Absence of bronchiolar remodelling assessed by bronchial wall thickness (7B) in 3 month (M3)-exposed mice to saline (control group) or 5-50 µg of SRM679 particles (scale = 50 µm). Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) present in each 3 month (M3)-exposed mouse to 50 µg SRM679 particles (7C; scales: 100 and 20 µm).

Discussion

The aim of our study was to investigate lung inflammation and remodeling in mice exposed to repeated doses of building dust containing high rate of crystallin silica administered at occupationally relevant doses. To achieve this aim, we developed an experimental study with mice weekly exposed up to 3months by pharyngeal aspiration to NaCl 0,9%, SRM679 (Brick Clay) or SRM 1887b (Portland cement) particles.

First, our results confirm that dust of building materials with a high rate of crystalline silica could induce lung inflammation at repeated and realistic doses. Indeed, realistic repeated-exposure to dust containing more than 50% crystallin silica induce an increased a

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

phenomenon of phagocytosis with lung macrophagic and neutrophilic inflammation. Indeed, alveolar macrophages recruitment is mostly in peribronchiolar regions in 1 month-exposed to 50 µg SRM679 particles. Moreover, significant increases of macrophagic cytokine secretions (i.e., MCP-1 (or CCL2), MIP-1α (or CCL3), MIP-1β (or CCL4) and TNF-α) in BALF have been also highlighted in 3 month-exposed to 50 µg SRM679 particles. Lung neutrophilic inflammation has been also highlighted in BALF of exposed-mice to 50 µg SRM679 particles whatever exposure duration. Indeed, neutrophil percentage was significantly increased under the influence of increased the neutrophil chemoattractant KC secretion in BALF. In the literature, very high doses of micrometric crystalline silica is known to induce lung inflammation—triggering expression of numerous inflammatory markers (i.e., IL-1β, TNF-α, and KC) and increased total cell counts in BALF, and activating inflammatory cell recruitment, such as neutrophils and alveolar macrophages, are reported (19–33). These observations are also confirmed in histological analyses, with significant recruitment of neutrophils and alveolar macrophages to the alveolar area (34). Moreover, Interferon gamma (IFN-γ) family cytokines (i.e., MIG and IP-10) are secreted by several cell types, such as monocytes, endothelial cells and fibroblasts, in response to IFN-γ secretion. Several roles have been attributed to IP-10, including acting as a chemoattractant for monocytes/macrophages. Our results showed that MIG and IP-10 were also significantly increased in 1day-exposed mice to 50 µg SRM 679 and 1 day- and 3 month-exposed mice to 50 µg SRM 679, respectively, even if there was no secretion detected for IFN-γ. According to the literature, significant expression of IFN-γ and IP-10 cytokines are also reported but after exposure to high doses of micrometric crystalline silica (35,36).

Secondly, our results have highlighted increased level of early biological pro-fibrotic biomarker without histological lung fibrosis. Indeed, TGF-β1 secretions is increased in BALF of 1 and 3 month-exposed mice to 50 µg SRM679 particles. On the other hand, morphometric analysis in 3 month-exposed mice to 50 µg SRM679 particles did not show any alveolar or bronchiolar remodelling. Two explanations can be put forward. The first one is that of a very low evolution pro-fibrotic process in the context of a realistic and repeated exposure to crystallin silica dust at very low administrated doses. The second one is a possible lung vessel fibrosis not explored in our study yet. According to the literature, chronic fibrosis was investigated in lung parenchyma and BALF after exposure to microcrystalline silica but at very high administrated

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

doses. Microcrystalline silica induces a significant increase in expression of various profibrotic markers, such as TGF- β 1 (29,37,38), CXCL10 (35), IL-10 (26,29,37) and PDGF-B (29,37). Some studies assessed also two other fibrosis markers reported significantly increased (i.e., collagen and hydroxyproline) (21,26,29,34,37–40). Using histological methods, lung tissue thickening (41) was linked to progressive and time-dependent fibrosis (22), but also to the emergence of fibrotic nodules 120 days after mice were intratracheally exposed to 100 mg/kg of crystallin silica particles (27).

Globally, no lung inflammation or remodeling were observed in exposed mice to SRM 1887b (Portland cement), except an increase of TGF- β 1 protein expression in BALF in 1 day-exposed mice to 50 μ g SRM1887b. Physico-chemical characterization of SRM1887b by TEM-EDX showed that sample contain approximatively 23% of Si elements. Almost of these SRM1887b particles are coated by a calcium layer with a very high rate, approximatively 66% of present chemical elements. This Ca layer could create a lower reactivity and biological toxicity, and may modify their pulmonary clearance. In addition, physico-chemical characterization of SRM679 by TEM-EDX showed that sample contain approximatively 51% of Si elements. Almost of these SRM679 particles are coated by an aluminium layer with a lower rate compared to Ca in SRM 679 sample, approximatively 35% of present chemical elements. These different chemical composition between these two types of SRM samples and a very important Ca-coating of SRM1887b could explain their lower toxicity compared to SRM679. In the literature, Calcium silicate cement is widely used for their biocompatibility and low toxicity (42,43).

In our study, we make the choice to administrate repeated and realistic doses of dust rich in crystalline silica emitted from classical building materials. Two samples of dusts rich in silica were provided (i.e., Brick Clay (SRM679) and Portland cement (SRM1887b)). These dusts were weekly administrated to mice up to 3 consecutive months, at 2 doses each one being relevant to occupational settings: 5 or 50 μ g, chosen as occupationally-relevant to the building activity, corresponding to 0.1-1 mg/m³ of quartz. In the literature, in contrast to our study, the majority of the experimental studies on animals reviewed here involved high - sometimes unrealistic - doses. Extrapolation to real human exposure levels in the workplace reveals maximal atmospheric concentrations ranging from a few mg/m³ to a few tens of mg/m³ when the occupational exposure limit values for most countries are significantly exceeded. Indeed, the

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

exposure limit value for quartz recommended in the United States (NIOSH-REL value) is 0.05 mg/m³, and in France it is 0.1 mg/m³ (44–46). These values should be kept in mind when considering data from whole-body inhalation studies, where the atmospheric concentrations used sometimes exceed 150 mg/m³ (47,48). With intratracheal or pharyngeal instillation, considering the regulatory daily occupational thresholds in most Western countries (examples above), realistic equivalent cumulative doses should be about 0.5 µg per mouse per week for quartz (49). In Marques Da Silva and colleague review, experimental studies used very high doses were used in most studies: ranging from 6.2 to 150 mg/m³ in whole-body inhalation studies, 2.6 to 27 mg/m³ in “nose-only” inhalation studies, and 0.02 to 640 mg/kg in intratracheal instillation studies (50). The use of such doses presents certain advantages in toxicology when seeking to assess risks, but cannot be considered to mimic actual work situations. Therefore, the biological, cellular, and tissue effects observed following exposure to such high doses are difficult to extrapolate to realistic working conditions. Consequently, when considering the data presented, it is essential to take into account the relevance of the dose applied.

Conclusion

To summarize, our results obtained suggest that chronic realistic exposure to microcrystalline silica could induce lung neutrophilic and macrophagic inflammation and lung initial fibrotic process in repeated-exposed mice to building material dust containing a rich rate of crystalline silica. To the best of our knowledge, our study using realistic exposure to crystalline silica are the first to suggest that the current occupational exposure limits for quartz (i.e. 0.05 and 0.1 mg/m³ depending on countries) correspond more to a lowest observed adverse effect level than a no observed adverse effect level. Complementary experiments should be conducted to our study in order to explore possible lung adverse effects of pure crystalline and amorphous silica at micro- and nanometric scale at occupationally relevant doses.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

References

1. Construction sector according to Eurostat [Internet]. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/cache/digpub/housing/bloc-3a.html?lang=en>
2. AVIS et RAPPORT de l'Anses relatif à la mise à proposition de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel - Evaluation des effets sur la santé sur le lieu de travail pour les poussières dites sans effet spécifique [Internet]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/VSR2017SA0148Ra.pdf>
3. Kramer MR, Blanc PD, Fireman E, Amital A, Guber A, Rhahman NA, et al. Artificial stone silicosis [corrected]: disease resurgence among artificial stone workers. *Chest*. 2012 Aug 1;142(2):419–24.
4. The Lancet Respiratory Medicine. The world is failing on silicosis. *Lancet Respir Med*. 2019 Apr;7(4):283.
5. Cavalin C, Lescoat A, Ballerie A, Belhomme N, Jégo P, Jouneau S, et al. Beyond silicosis, is the world failing on silica hazards? *Lancet Respir Med*. 2019;7(8):649–50.
6. Caplan-Shaw CE, Yee H, Rogers L, Abraham JL, Parsia SS, Naidich DP, et al. Lung Pathologic Findings in a Local Residential and Working Community Exposed to World Trade Center Dust, Gas, and Fumes. *J Occup Environ Med*. 2011 Sep;53(9):981–91.
7. Blanc PD, Torén K. Occupation in chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: An update. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11(3):251–7.
8. Reynolds CJ, MacNeill SJ, Williams J, Hodges NG, Campbell MJ, Newman Taylor AJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in Welsh slate miners. *Occup Med (Chic Ill)*. 2017 Jan 1;67(1):20–5.
9. teWaterNaude JM. Tuberculosis and silica exposure in South African gold miners. *Occup Environ Med*. 2006 Mar 1;63(3):187–92.
10. Calvert GM. Occupational silica exposure and risk of various diseases: an analysis using death certificates from 27 states of the United States. *Occup Environ Med*. 2003 Feb 1;60(2):122–9.

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

11. Directive (EU) 2017/2398 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2017 amending Directive 2004/37/EC on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens or mutagens at work (Text with EEA relevance) [Internet]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32017L2398>
12. Présumé M, Simon-Deckers A, Tomkiewicz-Raulet C, Le Grand B, Tran Van Nhieu J, Beaune G, et al. Exposure to metal oxide nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary effects in mice. *Nanotoxicology*. 2016 Nov 25;10(10):1535–44.
13. Andujar P, Simon-Deckers A, Galateau-Sallé F, Fayard B, Beaune G, Clin B, et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. *Part Fibre Toxicol*. 2014 May 13;11(1):23.
14. Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. *Ann ICRP*. 1994;24(1–3):1–482.
15. Paek D, McCool FD. Breathing patterns during varied activities. *J Appl Physiol*. 1992 Sep 1;73(3):887–93.
16. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*. 1988 Apr 1;41(4):467–70.
17. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*. 1966 Jul 1;30(1):23–38.
18. Weissgerber TL, Milic NM, Winham SJ, Garovic VD. Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. *PLoS Biology*. 2015.
19. Janssen YMW, Marsh JP, Absher MP, Hemenway D, Vacek PM, Leslie KO, et al. Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. *J Biol Chem*. 1992;267(15):10625–30.
20. Warheit DB, Carakostas MC, Bamberger JR, Hartsky MA. Complement facilitates macrophage phagocytosis of inhaled iron particles but has little effect in mediating

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

- silica-induced lung inflammatory and clearance responses. *Environ Res.* 1991;56(2):186–203.
21. Thakur SA, Beamer CA, Migliaccio CT, Holian A. Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation. *Toxicol Sci.* 2009;108(2):462–71.
 22. Xu H, Verbeken E, Vanhooren HM, Nemery B, Hoet PHM. Pulmonary toxicity of polyvinyl chloride particles after a single intratracheal instillation in rats. Time course and comparison with silica. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Jan;194(2):111–21.
 23. Jessop F, Hamilton RF, Rhoderick JF, Fletcher P, Holian A. Phagolysosome acidification is required for silica and engineered nanoparticle-induced lysosome membrane permeabilization and resultant NLRP3 inflammasome activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 Mar;318:58–68.
 24. Chauhan PS, Wagner JG, Benninghoff AD, Lewandowski RP, Favor OK, Wierenga KA, et al. Rapid Induction of Pulmonary Inflammation, Autoimmune Gene Expression, and Ectopic Lymphoid Neogenesis Following Acute Silica Exposure in Lupus-Prone Mice. *Front Immunol.* 2021 Feb 23;12.
 25. Adamson IYR, Letourneau HL, Bowden DH. Enhanced macrophage-fibroblast interactions in the pulmonary interstitium increases fibrosis after silica injection to monocyte-depleted mice. *Am J Pathol.* 1989;134(2):411–8.
 26. Barbarin V, Nihoul A, Misson P, Arras M, Delos M, Leclercq I, et al. The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis. *Respir Res.* 2005 Oct;6.
 27. Huaux F, Lardot C, Arras M, Delos M, Many MC, Coutelier JP, et al. Lung fibrosis induced by Silica particles in NMRI Mice is associated with an upregulation of the p40 subunit of interleukin-12 and Th-2 manifestations. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(4):561–72.
 28. Nemmar A, Nemery B, Hoet PHM, Van Rooijen N, Hoylaerts MF. Silica particles enhance peripheral thrombosis: Key role of lung macrophage-neutrophil cross-talk. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Apr;171(8):872–9.
 29. Rabolli V, Lo Re S, Uwambayinema F, Yakoub Y, Lison D, Huaux F. Lung fibrosis induced

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

- by crystalline silica particles is uncoupled from lung inflammation in NMRI mice. *Toxicol Lett.* 2011 Jun;203(2):127–34.
30. Rabolli V, Badissi AA, Devosse R, Uwambayinema F, Yakoub Y, Palmal-Pallag M, et al. The alarmin IL-1 α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2014 Dec;11(1).
 31. Reasor MJ, Antonini JM. Pulmonary responses to single versus multiple intratracheal instillations of silica in rats. *J Toxicol Environ Heal - Part A.* 2001 Jan;62(1):9–21.
 32. Schapira RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrisey J, Almagro UA, Dawson CA. Hydroxyl radical production and lung injury in the rat following silica or titanium dioxide instillation in vivo. *Pneumologie.* 1996;50(11):798.
 33. Sutunkova MP, Solovyeva SN, Katsnelson BA, Gurvich VB, Privalova LI, Minigalieva IA, et al. A paradoxical response of the rat organism to long-term inhalation of silica-containing submicron (predominantly nanoscale) particles of a collected industrial aerosol at realistic exposure levels. *Toxicology.* 2017 Jun;384:59–68.
 34. Adamson IYR, Bowden DH. Role of polymorphonuclear leukocytes in silica-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1984;117(1):37–43.
 35. Benmerzoug S, Rose S, Bounab B, Gosset D, Duneau L, Chenuet P, et al. STING-dependent sensing of self-DNA drives silica-induced lung inflammation. *Nat Commun.* 2018 Dec;9(1).
 36. Migliaccio CT, Hamilton RF, Holian A. Increase in a distinct pulmonary macrophage subset possessing an antigen-presenting cell phenotype and in vitro APC activity following silica exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Jun;205(2):168–76.
 37. Lo Re S, Yakoub Y, Devosse R, Uwambayinema F, Couillin I, Ryffel B, et al. Uncoupling between inflammatory and fibrotic responses to silica: Evidence from MyD88 knockout mice. *PLoS One.* 2014 Jul;9(7).
 38. van den Brûle S, Misson P, Bühling F, Lison D, Huaux F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF- β . *Respir Res.* 2005 Jul;6.
 39. Adamson IYR, Prieditis H. Silica deposition in the lung during epithelial injury

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

- potentiates fibrosis and increases particle translocation to lymph nodes. *Exp Lung Res.* 1998;24(3):293–306.
40. Arras M, Huaux F, Vink A, Delos M, Coutelier JP, Many MC, et al. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(4):368–75.
 41. Warheit DB, Webb TR, Reed KL. Pulmonary toxicity screening studies in male rats with TiO₂ particulates substantially encapsulated with pyrogenically deposited, amorphous silica. *Part Fibre Toxicol.* 2006 Jan;3.
 42. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015 Apr 1;31(4):351–70.
 43. Gaudin A, Tolar M, Peters OA. Cytokine Production and Cytotoxicity of Calcium Silicate-based Sealers in 2- and 3-dimensional Cell Culture Models. *J Endod.* 2020 Jun 1;46(6):818–26.
 44. CDC - NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards - Silica, crystalline (as respirable dust) [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0684.html>
 45. Liste des VLEP françaises - Outil - INRS [Internet]. Available from: <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=outil65>
 46. AVIS et RAPPORT de l'Anses relatif à la mise à jour des connaissances concernant les dangers, expositions et risques relatifs à la silice cristalline [Internet]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-lanses-relatif-au-danger-salmonella-spp-en-alimentation-animale>
 47. SILICA, CRYSTALLINE, MIXED RESPIRABLE (QUARTZ, CRISTOBALITE, TRIDYMITE) | Occupational Safety and Health Administration [Internet]. Available from: <https://www.osha.gov/chemicaldata/278>
 48. SILICA, AMORPHOUS INCLUDING NATURAL DIATOMACEOUS EARTH | Occupational Safety and Health Administration [Internet]. [cited 2022 Oct 15]. Available from: <https://www.osha.gov/chemicaldata/613>
 49. Zhao Q, Li Y, Chai X, Geng Y, Cao Y, Xu L, et al. Interaction of pulmonary surfactant

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

with silica and polycyclic aromatic hydrocarbons: Implications for respiratory health.
Chemosphere. 2019 May;222:603–10.

50. Marques Da Silva V, Benjdir M, Montagne P, Pairon J-C, Lanone S, Andujar P.
Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and
Crystal Structure: A Review. Nanomaterials. 2022 Jul 13;12(14):2392.

Voilet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives
issues de matériaux de construction non-nanostructurés

Appendix

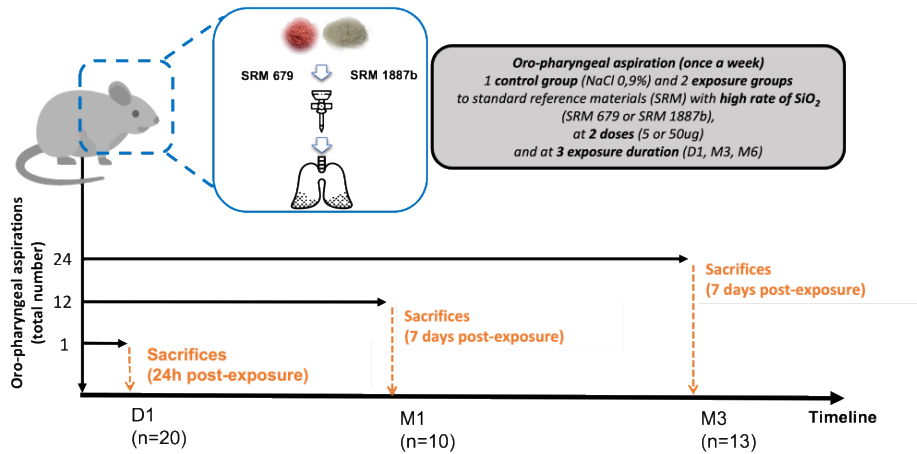


Figure S1: Study design. For each experiment timepoint (D1: 24h; M1: 1 month; M3: 3 months), mice were weekly exposed by non-surgical oro-pharyngeal aspirations to saline (control group), 5 or 50 µg of suspended SRM 679 or SRM 1887b particles.

Volet PURESNOW-BIO

Étude expérimentale « préliminaire » avec des particules de silice cristalline natives issues de matériaux de construction non-nanostructurés

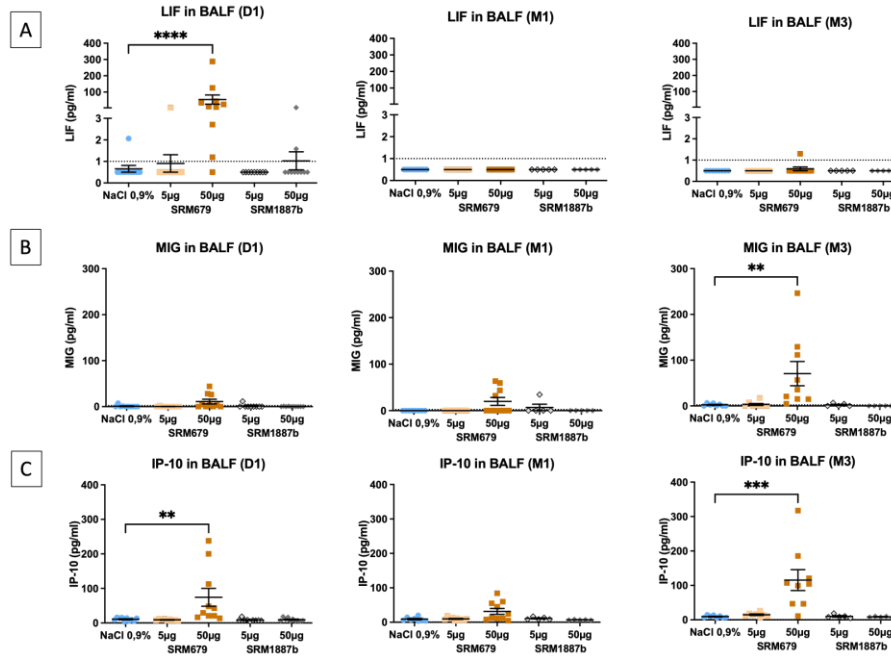


Figure S2: Inflammatory responses due to expression in BALF of pro-inflammatory proteins LIF (A), MIG or CXCL9 (B) and IP-10 or CXCL10 (C) assessed by Luminex® in group of mice exposed during 24h, one and three months. **p<0.01, and ***p<0.001, ****p<0.0001 and compared with control group (NaCl 0,9%).

V.2 Étude expérimentale PURESNOW-BIO

V.2.1 Matériel et méthodes

V.2.1.1 Modèle animal

Tout comme dans l'étude expérimentale « préliminaire », le modèle animal choisi est la souris Wild-Type C57BL6. Les animaux étaient tous des mâles adultes, âgés de 8 semaines au début de l'expérimentation, et ont été obtenus auprès du fournisseur Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Les souris ont été hébergées à la plateforme d'animalerie EP3 de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB) dans des cages de dimension 39,1 x 19,9 X 16cm, au maximum par 5 souris par cage pour éviter tout isolement dans des conditions environnementales standards (avec une température à 25°C, un taux d'humidité de l'air à 55% et une alternance de cycles diurne (lumière) / nocturne (obscurité) de 12h/12h). Les souris ont été nourries et abreuvées *ad libitum*. Une attention particulière a été portée en ce qui concerne l'enrichissement du milieu de vie (ajout de feuilles d'enrichissement).

V.2.1.2 Autorisations réglementaires

Un avis favorable a été obtenu le 11 octobre 2020 pour cette étude auprès du Comité d'éthique animal (ComEth, n°20-089). En parallèle, une autorisation a été accordée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation le 30 octobre 2020, avec l'agrément A94-028-379, EU APAFIS 0633, demande n°27286.

V.2.1.3 Synthèse et caractérisation physico-chimiques des particules de silice

V.2.1.3.1 Synthèse des particules de silice cristalline et amorphe

Une collaboration a été établie avec le Pr Corinne Chanéac, chimiste au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (Sorbonne-Université CNRS), pour mettre au point la néosynthèse particules de silice cristalline et amorphe de taille micrométrique (1µm) et nanométrique (100 nm).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

La synthèse des NPs de silice amorphe (100 nm) a été réalisée par la méthode de Stöber décrite dans l'introduction en **I.2.3.1**. Plus précisément, cette synthèse a consisté en l'hydrolyse-condensation d'un précurseur de silicium, le tétraéthoxysilane (TEOS), en solution dans un mélange eau/éthanol (EtOH) en milieu basique (NH_4OH). La cinétique de la réaction d'hydrolyse-condensation est contrôlée par la quantité d'ammoniac (NH_3) et permet d'obtenir des particules sphériques de taille contrôlée dans le domaine nanométrique observées ensuite en MET. La synthèse des particules micrométriques de silice amorphe de 1 μm repose sur la même méthodologie de synthèse, mais plusieurs étapes de croissance sont opérées par ajout successif de TEOS dans une suspension initiale de NPs de 100 nm qui sert de germe de croissance.

La synthèse des particules de silice cristalline de taille nanométrique ou micrométrique est ensuite obtenue par un procédé de dissolution et de cristallisation à haute température en solution basique d'hydroxyde de sodium (NaOH) de suspensions initiales de nano- ou microparticules de silice amorphe, respectivement. La taille dépend de la basicité du milieu, de la température et du temps de croissance. Après synthèse, les particules de silice cristalline ont été isolées du milieu de synthèse, lavées et centrifugées puis séchées sous vide. Les surfaces des particules ont été hydroxylées par une digestion en milieu basique.

Afin de confirmer l'absence de contamination par des endotoxines bactériennes des échantillons de SiO_2 néosynthétisées, un test de recherche d'endotoxines au Limulus Amebocyte Lysate (LALe) a été réalisé à l'aide du kit de quantification d'endotoxines chromogènes PierceTM selon les recommandations du fabricant (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Une gamme étalon comprise entre 0,1 et 1 EU/mL a été établie à partir de l'endotoxine d'*E. Coli* fournie par le kit. Les échantillons de particules de SiO_2 néosynthétisées et le témoin positif, en l'occurrence des Lipopolysaccharides d'*E. Coli* (réf n°L3024, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, États-Unis) ont été solubilisés dans de l'eau Ultrapure dépourvue d'endotoxines, puis déposés sur une plaque de 96 puits. Le substrat chromogène du kit a été ajouté par la suite. Les absorbances ont été ensuite mesurées à 405 nm par spectroscopie (TECAN, Infinite M200PRO, Männedorf, Suisse).

V.2.1.3.2 Choix des doses employées

Afin d'être le plus réaliste possible par rapport aux niveaux d'exposition potentiellement rencontrés chez les travailleurs du BTP, il a été décidé d'administrer, comme dans l'étude expérimentale « préliminaire », des doses représentatives, en prenant en compte de la VLEP française (pour une durée de travail de 8 heures) des poussières alvéolaires non spécifiques tout en respectant parallèlement la VLEP spécifique de la silice cristalline, en l'occurrence le quartz, avec une VLEP à 0,1mg/m³. Ces valeurs ont varié au cours de ce travail de thèse avec une VLEP initialement à 5 mg/m³ en milieu intérieur jusqu'en 2021, puis 3,5 mg/m³ depuis le 1^{er} janvier 2022, et enfin 0,9 mg/m³ à partir du 1^{er} juillet 2023. Il est à noter que la VLEP est maintenue dans les mines et carrières à 5 mg/m³ (81,83). Or, la gamme de concentration entre 0,5 et 5 mg/m³ est fréquemment rencontrée pour la silice cristalline d'après les données métrologiques recueillies sur le terrain comme le montre le volet métrologique PURESNOW-METRO.

Ainsi, afin de déterminer ces doses réalistes à administrer à la souris en tenant compte de ces valeurs de VLEP, il a été décidé de définir les deux niveaux doses 0,5 et 5 mg/m³ dans les conditions citées dans le paragraphe précédent avec une activité physique soutenue. Cette estimation a été effectuée à partir de la formule permettant cette extrapolation de l'Homme à l'animal avec une méthodologie (99) publiée antérieurement par l'équipe a été appliquée (100) comme suit :

- Soit N (µg), la dose journalière de particules déposées dans les poumons chez l'Homme :

$N (\mu\text{g}) = \text{concentration particulaire} \times \text{débit ventilatoire} \times \text{durée d'exposition journalière}$

$\times \text{fraction de déposition des particules dans la région alvéolaire}$

- Concentration particulaire à 5 mg/m³ soit 5 µg/L
- Débit ventilatoire à 50L/min pour un effort physique modéré (25 cycles par minute X volume courant à 2L d'air)
- Durée d'exposition journalière de 8 heures, soit 480 min
- Fraction de déposition des particules dans la région alvéolaire (20% si les particules ont un diamètre moyen de 100 nm)

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

- De plus, en admettant que le poids moyen d'un sujet masculin est d'environ 75kg pour 1m75 (soit un indice de masse corporelle de 24,5 kg/m²) et celui d'une souris mâle adulte est de 30g, on a : $N/75\text{kg} = X/30\text{g}$.
- Soit X (µg) = Dose journalière de particules déposées dans les poumons d'une souris, on obtient alors X égal à 9,6 µg, soit environ 10 µg par jour et 50 µg par semaine (5 jours par semaine).

Chaque échantillon de particules de SiO₂ néosynthétisées a été dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) à une concentration de 5mg/mL (solution mère) et conditionné dans des tubes filles stériles de 2mL pour une conservation à -20°C en vue d'une préparation extemporanée des concentrations suivantes pour chaque temps d'exposition :

- 0,25mg/mL représentant l'exposition à la dose hebdomadaire de 5 µg représentant une concentration à 0,5 mg/m³
- 2,5mg/mL représentant l'exposition à la dose hebdomadaire de 50 µg représentant une concentration à 5 mg/m³

V.2.1.3.3 Caractérisation physico-chimique des échantillons de silice

La caractérisation physico-chimique des 4 lots de silice a été réalisée au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris par le Pr Corinne Chanéac. Les tailles des particules ont été déterminées par une analyse en MET (Technai Spirit G2 équipé d'une caméra Gatan Orius 832 digital). Il est à noter que ces observations ont concerné 1) les particules de SiO₂ pures fraîchement néosynthétisées sous forme de poudre, 2) mais aussi vieilles et conservées dans des solutions mères (6 mois après la néosynthèse). Chaque échantillon fille a été resuspendu dans de l'eau ultrapure. Une goutte a été déposée sur une grille MET, celle-ci est alors disposée sur un support dit « penta » composé d'une grille de cuivre recouvert d'une membrane composée de carbone. La forme et la taille des particules des 4 lots d'échantillons ont été déterminées à l'aide du MET. Dans des conditions poussées de vide, chaque échantillon est balayé par un faisceau d'électrons à l'aide de lentilles électromagnétiques, puis l'image est projetée vers un détecteur qui va permettre ainsi d'observer l'image.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

La cristallinité des particules de quartz ou son absence pour les particules amorphes a été déterminée par diffraction de rayonnement X (DRX) sur poudres à l'aide d'un diffractomètre (Bruker D8 ADVANCE) utilisant un tube à rayons X en cuivre (Cu K α), un porte-échantillon tournant et un détecteur mobile. Il est à noter que là aussi cette caractérisation physico-chimique a concerné les particules de SiO₂ pures à 2 stades, 1) fraîchement néosynthétisées sous forme de poudre, mais aussi 2) vieilles et conservées dans les solutions mères (6 mois après la néosynthèse).

V.2.1.4 Design de l'étude

Les souris ont été exposées à 3 temps d'exposition : 1 jour (J1), 3 mois (M3) et 6 mois (M6) de façon hebdomadaire par aspiration oro-pharyngée (technique d'instillation intra-trachéale non chirurgicale), soit à du NaCl 0,9% seul (3 groupes témoins), soit à des microparticules de SiO₂ cristalline (μ P SiO₂ Cr), soit à des microparticules de SiO₂ amorphe (μ P SiO₂ Am), soit à des NPs SiO₂ cristalline (NP Si Cr), soit à des NPs SiO₂ amorphe (NP Si Am), aux doses hebdomadaires de 5 ou 50 μ g. Au total, pour chaque temps d'exposition (J1, M3, M6), 9 groupes d'exposition ont été constitués (comprenant 1 groupe témoin et 4 groupes exposés aux 4 lots de particules avec pour chacune d'entre elles une des 2 doses hebdomadaires de 5 ou 50 μ g). Ainsi, au total, 27 groupes d'exposition ont été constitués. Pour cela, un effectif de 297 souris a été nécessaire, avec 10 souris par groupe d'exposition pour les deux temps d'exposition J1 et M3, et 13 souris par groupe d'exposition à M6. Ces effectifs plus importants au temps d'exposition M6 ont été prévus pour pallier le risque de survenue de pertes d'animaux au cours de l'expérimentation (**Figure 29**) :

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

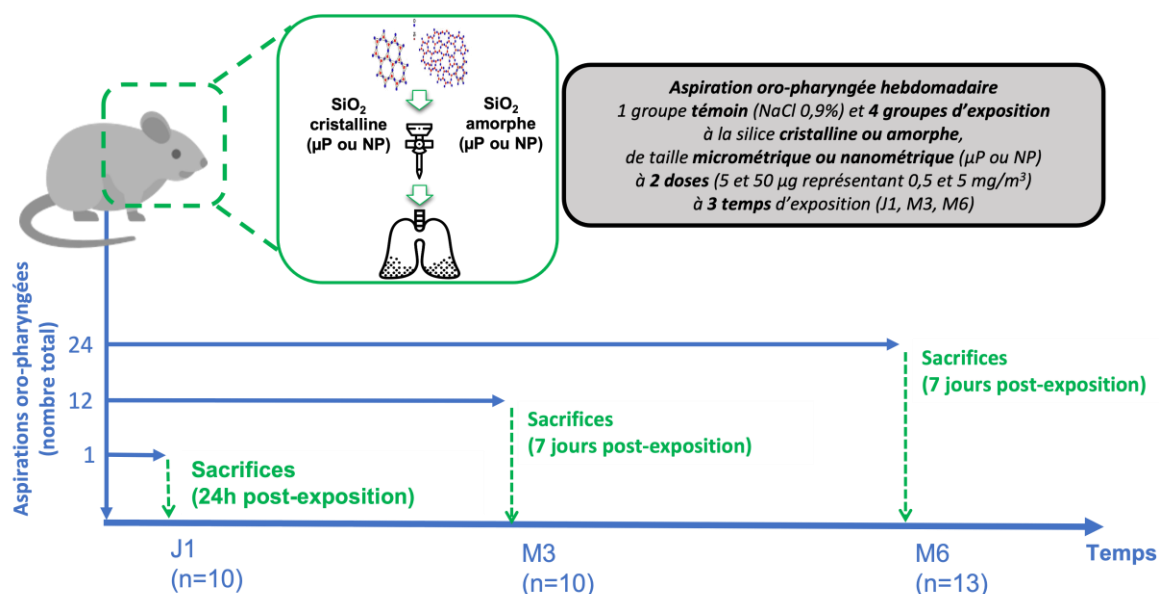


Figure 29 : Chronogramme du plan expérimental de l'étude PURESNOW-BIO.

J1 : aspiration oro-pharyngée unique sur 1 jour ; M3 et M6 : aspiration oro-pharyngée hebdomadaire pendant 3 et 6 mois ; µP : microparticule ; NP : nanoparticule.

Lors de chaque phase d'exposition, les animaux ont été préalablement anesthésiés par voie intrapéritonéale avec un mélange de Zolétil (Zolazépam/Tilétamine, 40 mg/kg), Xylazine (4,25 mg/kg) et Buprénorphine (0,05 mg/kg).

Des tubes contenant les 4 lots de silice aux 2 doses hebdomadaires choisies (5 et 50 µg) ont été préparés extemporanément à partir d'une solution mère à 5mg/mL en suspension dans le NaCl 0,9%. Chaque tube a été ensuite vortexé, puis soniqué. La sonication est programmée à 37kHz durant 20min à +20°C (Elmasonic S30H, Singen, Allemagne) et permet d'éviter la formation d'agglomérats et d'agrégats. Les aspirations oro-pharyngées ont été ensuite réalisées avec 20µL de solution à la dose de 5 et 50 µg selon le groupe d'exposition.

V.2.1.5 Sacrifice et recueil des échantillons biologiques et tissulaires

Les sacrifices des animaux pour chaque temps d'exposition sont intervenus selon le déroulé temporel suivant :

- J1 : aspiration oro-pharyngée unique (n=10 souris par groupe) suivie d'un sacrifice 24 heures après l'exposition
- M3 : 12 aspirations oro-pharyngées hebdomadaires (n=10 souris par groupe) suivies d'un sacrifice 7 jours après la dernière exposition
- M6 : 24 aspirations oro-pharyngées hebdomadaires (n=13 souris par groupe) suivies du sacrifice 7 jours après la dernière exposition

Lors du sacrifice, les animaux ont été préalablement anesthésiés par voie intrapéritonéale à l'aide d'un mélange de Zolétil (Zolazépam/Tilétamine, 40mg/kg), Xylazine (4,25mg/kg) et Buprénorphine (0,05mg/kg), puis sacrifiés par exsanguination pour effectuer le recueil des échantillons biologiques et tissulaires.

Afin de réduire le nombre nécessaire d'animaux dans cette expérimentation et de garantir une puissance statistique suffisante, une nouvelle technique de prélèvement des échantillons pulmonaires a été mise au point par mes soins préalablement à cette étude (**Figure 30**). En effet, après l'expérience acquise lors de l'étude expérimentale « préliminaire », l'objectif de la mise au point a été d'effectuer tous les prélèvements biologiques et tissulaires requis (prélèvements du LLBA sur le poumon droit puis des lobes du poumon droit pour une quantification du collagène et du lobe du poumon gauche pour une fixation tissulaire) chez l'ensemble des souris de façon homogène sans affecter sur la qualité des prélèvements. Antérieurement au laboratoire et pour l'étude expérimentale « préliminaire », deux lots de souris par groupe étaient utilisés : le premier lot était réservé aux prélèvements du LLBA tandis que le deuxième lot était réservé aux prélèvements des deux poumons pour une fixation tissulaire.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

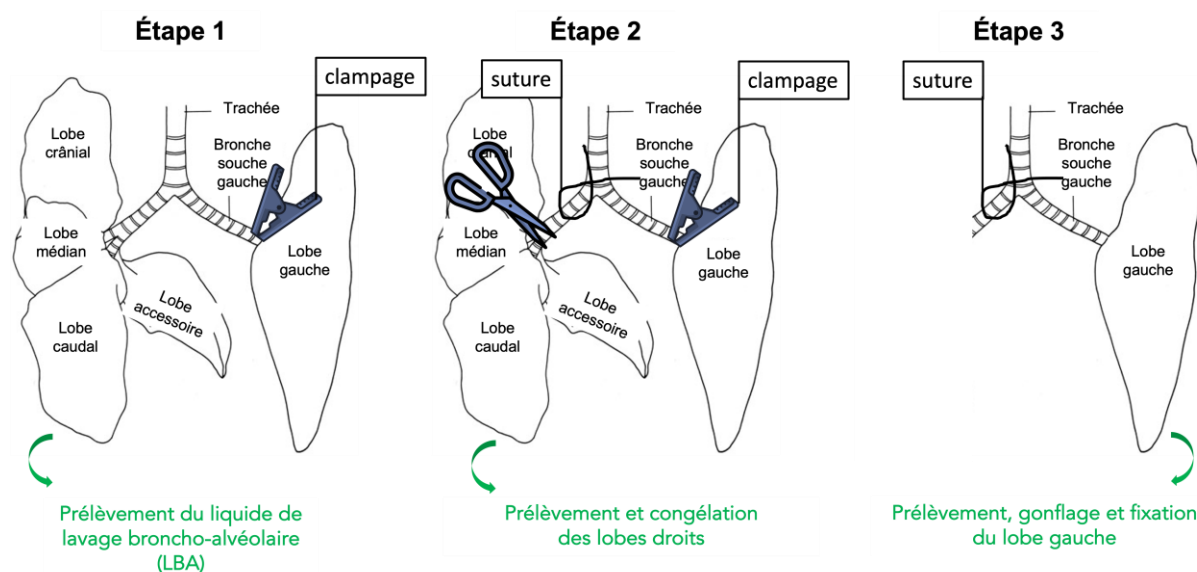


Figure 30 : Nouvelle technique mise au point pour prélever les lobes pulmonaires chez la souris.

Cette nouvelle méthode de prélèvement est constituée de 3 étapes décrites ci-dessous (Figure X).

La première étape consiste pour chaque souris à clamer la bronche souche du poumon gauche et à recueillir le LLBA sur le poumon droit (**Figure 30 – étape 1**). Ensuite, la seconde étape consiste à suturer la bronche souche du poumon droit, puis à recueillir les 4 lobes (crânial, moyen, accessoire et caudal) du poumon droit pour les congeler pour la tissuthèque à -80°C (**Figure 30 – étape 2**). Enfin, la troisième étape consiste à déclamer le poumon gauche, à le prélever, le gonfler et le fixer par du formaldéhyde dilué à 4% (Ref n°100496, Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) (**Figure 30 – étape 3**). Le poumon gauche de chaque animal a été positionné sur sa face postérieure au fond de la cassette avec toujours la même orientation. Le poumon positionné dans sa cassette a été ensuite inclus dans de la paraffine, puis coupé au microtome à une épaisseur de $3\ \mu\text{m}$ et monté ensuite sur des lames Superfrost II (en collaboration avec la plateforme d'imagerie de l'IMRB) en vue d'analyses histologiques et morphométriques après colorations spécifiques.

Enfin, une dernière étape a consisté à prélever le sang de chaque souris par une ponction intracardiaque. Le plasma a été obtenu après centrifugation à température ambiante à 400g durant 10min, puis à 3500g durant 10min, puis stocké dans ces tubes à -80°C . Par ailleurs, d'autres organes ont été recueillis et congelés à -80°C à savoir le foie, la rate et les reins pour la tissuthèque.

V.2.1.6 Analyse de l'inflammation pulmonaire

V.2.1.6.1 Quantification de la cellularité totale dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

La cellularité totale dans le LLBA est un indicateur global de la présence ou non d'un phénomène inflammatoire. Afin de comptabiliser le nombre de cellules présentes dans le LLBA, 10 μ L de LLBA ont été dilués dans 10 μ L de Bleu de Trypan. Le comptage de la cellularité totale en microscopie optique (MO) a été réalisé à l'aide d'une grille de comptage sous la forme d'une cellule plastique à numération de type KOVA où 10 μ L du mélange contenant le LLBA et le Bleu de Trypan sont déposés (Dutscher, Brumath, France). Cette grille de comptage contient 9 grands carrés composés chacun de 9 petits carrés. L'intégralité des cellules vivantes présentes sur la grille a été ainsi décomptée pour obtenir un nombre total de cellules rapporté au volume du LLBA en μ L.

V.2.1.6.2 Étude du différentiel cellulaire dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

Le différentiel cellulaire est également un indicateur également global de l'inflammation pulmonaire, mais plus fin tout de même, car il correspond à la proportion en pourcentage de cellules présentes dans le LLBA. Les macrophages sont les cellules majoritairement retrouvées dans le LLBA chez un animal sain (entre 95 et 100%), toute augmentation de plus de 5% d'un autre type cellulaire (polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, lymphocytes notamment) est potentiellement un signe pathologique, notamment d'inflammation(101). Afin d'identifier les types de cellules présentes dans le LLBA, 100 μ L ont été transférés sur une lame à l'aide d'une cyto centrifugeuse utilisant le système Cytospin (Wescor CytoPro 7620, Puteaux, France) à 220 tours/min pendant 6 min à température ambiante et colorées avec la coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG). Un décompte de chaque population cellulaire identifiée dans le LLBA a été réalisé par un double comptage aléatoire en MO de 100 cellules par échantillon.

V.2.1.6.3 Quantification des protéines totales dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

La quantification des protéines totales dans le LLBA est un autre indicateur global d'inflammation pulmonaire de la sécrétion de protéines de l'inflammation dans le liquide de LBA, mais aussi potentiellement d'une altération de la barrière alvéolo-capillaire (signe de perméabilisation avec passage de protéines). Le dosage colorimétrique des protéines a été réalisé par la méthode de Bradford, afin d'obtenir la concentration en protéines totales présentes dans le surnageant du LLBA, à l'aide d'une gamme étalon comprise entre 1,25 et 80 µg/mL à partir de BSA (Bovine Albumine Serum, Réf n°AB9647, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis). Chaque échantillon de surnageant a été dilué au 1/5^{ème} afin d'avoir une concentration dans la gamme étalon. Cent µL de chaque surnageant dilué ont été déposés dans un puits d'une plaque de 96 puits, avec l'ajout de 100µL de réactif Quick Start Bradford 1X DyeReagent (Ref n°500-0205, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). L'absorbance a été ensuite mesurée pour chaque échantillon par spectroscopie à une longueur d'onde de 595 nm (TECAN, Infinite M200PRO, Männedorf, Suisse).

V.2.1.6.4 Quantification des médiateurs pro-inflammatoires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

La concentration de protéines de l'inflammation a été obtenue à l'aide d'un kit Multiplex Luminex® (Luminex Corporation, Austin, États-Unis) détectant 32 marqueurs potentiellement rencontrés dans des processus inflammatoires pulmonaires (eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, RANTES, TNF-α, VEGF) (Réf MCYTOMAG-70K, Merck Millipore, Saint-Quentin, France) grâce à une collaboration avec la plateforme d'immunomonitoring de l'IMRB. La technique Luminex® est une méthode combinant la cytométrie en flux (pour l'identification des marqueurs) et l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, pour la quantification des marqueurs). Cette technologie repose sur des microsphères de polystyrène, dans lesquelles sont incorporés différents fluorochromes couplés à des anticorps de capture propres à chaque espèce chimique (analyte). Chaque fluorochrome possédant une longueur d'onde spécifique, la liaison d'un

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

analyte à son anticorps de capture permet alors d'identifier et de quantifier finement l'analyte en question même à des doses très faibles de l'ordre du pg/mL. Il est à noter que lorsque la détection de certains analytes était inférieure au seuil minimal de détection, il a été arbitrairement choisi d'affubler la moitié de la concentration de ce seuil de détection pour chaque échantillon dans cette situation, afin de pouvoir interpréter les données statistiques et minimiser les biais entre les analytes détectés sous ce seuil et ceux non détectés.

V.2.1.6.5 Quantification des macrophages alvéolaires en immunohistochimie dans le parenchyme pulmonaire

La protéine MAC-3 (ou CD107b) est une glycoprotéine membranaire exprimée de façon importante à la surface des macrophages, l'anticorps monoclonal M3/84 se lie spécifiquement à la protéine MAC-3 et permet ainsi sa détection. L'immunomarquage de la protéine MAC-3 a été fait par un marquage au diaminobenzidine (DAB, de couleur marron). Les coupes de poumons ont été déparaffinées par bains successifs dans du xylène, de l'alcool et de l'eau. Le démasquage antigénique facilitant l'accessibilité aux épitopes des antigènes et donc de la protéine, a été réalisé par un bain dans de l'eau bouillante dans une solution contenant de l'acide citrique. Les sites aspécifiques ont été bloqués avec l'ajout de sérum de lapin puis, l'anticorps primaire de rat anti-MAC-3 de souris, (Ref n°550292, BD Biosciences, New Jersey, États-Unis) a été ajouté sur les coupes de poumon suivi de l'anticorps secondaire biotinylé de lapin anti-IgG de rat, absorbé chez la souris, (Ref BA-4001, Vector Lab, Peterborough, Royaume-Uni). En effet, la biotine interagit fortement pour la streptavidine et a donc été utilisée comme agent de liaison. Une solution contenant le complexe streptavidine-peroxydase (Vectastain ABC HRP Kit peroxydase standard Ref PK-4000, Vector Lab, Peterborough, Royaume-Uni) a été disposée sur les coupes de poumons. La révélation a été faite par l'ajout du substrat de la peroxydase, le DAB se traduisant par un marquage de couleur marron.

Afin de quantifier le nombre de macrophages dans le parenchyme pulmonaire, les coupes histologiques immunomarquées ont été photographiées au moyen d'un MO à plateforme motorisée (Zeiss Axioimager 2, Oberkochen, Allemagne) équipé d'une caméra (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) avec 10 champs au grossissement 400X pris de façon aléatoire du

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

parenchyme pulmonaire du lobe gauche de chaque souris. Le nombre total de macrophages obtenu correspond à la somme des dénombrements sur ces 10 champs.

V.2.1.7 Quantification de la cytolyse dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

La lactate déshydrogénase (LDH) est un marqueur de cytolyse et donc de l'intégrité membranaire des cellules, car elle est relarguée dans le cytosol lorsque les cellules sont endommagées. Afin de mesurer l'activité de la LDH relarguée dans le surnageant du LLBA, une gamme étalon comprise entre 39 et 5000 μ U à partir de LDH standard (Ref n°10 127 230 001, Roche, Bâle, Suisse) a été établie. Les échantillons contenant le surnageant ont été déposés sur une plaque de 96 puits, avec adjonction d'un mélange des réactifs du Cytotoxicity Detection Kit (Ref n°11 644 793 001, Roche, Bâle, Suisse). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, l'absorbance a été mesurée à 492 nm par spectroscopie (TECAN, Infinite M200PRO, Männedorf, Suisse).

V.2.1.8 Analyse du remodelage pulmonaire

V.2.1.8.1 Quantification de l'expression protéique du TGF β -1 dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

La fibrose est un processus de remodelage survenant lors de la dysfonction de réparation d'une lésion, caractérisé par un échec de régénération tissulaire et par un dépôt excessif de matrice extracellulaire (MEC) par les fibroblastes. Le cytokine TGF β -1 est un marqueur précoce du processus de fibrose pulmonaire car il s'agit de l'un des plus puissants inducteurs de la production de la MEC, notamment de fibres de collagène et d'autres protéines matricielles. La quantification de la concentration du TGF β -1 relarguée dans le surnageant du LLBA a été effectuée à l'aide du kit Mouse TGF β -1 Quantikine ELISA (Ref MB100B, R&D Systems Minneapolis, Etats-Unis) à l'aide d'une gamme étalon comprise entre 31,5 et 1000 pg/mL à partir d'une quantité standard de TGF β -1. Les échantillons contenant le surnageant ont été préalablement activés afin de révéler la forme immunoréactive du TGF β -1. Pour cela, il a été ajouté successivement dans 100 μ L chaque échantillon, 20 μ L d'acide chlorhydrique (HCl) à 1N

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

et 20µL d'un mélange contenant du NaOH à 1,2N et de l'HEPES à 0,5N, puis l'ensemble de la solution a été dilué au ½ et déposé sur une plaque de 96 puits pré-coatée avec l'anticorps primaire anti-TGFβ-1 de souris. L'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase, le substrat de celle-ci et une solution « stop » contenant du HCl ont été ajoutés après 5 lavages entre chaque étape et l'absorbance par spectroscopie a été ensuite mesurée à 450 nm (TECAN, Infinite M200PRO, Männedorf, Suisse).

V.2.1.8.2 Quantification du collagène soluble dans un extrait pulmonaire digéré

Les fibres de collagène sont une famille de protéines de la MEC dont l'excès témoigne d'un phénomène de fibrose. Les dépôts de collagène sont présents au sein des structures alvéolaires, bronchiolaires et/ou vasculaires, on parle alors de fibrose alvéolaire, péribronchiolaire et/ou périvasculaire, respectivement. Le dosage du collagène soluble n'est pas spécifique d'un type de collagène particulier ; en effet, ce dosage permet d'avoir une indication sur la potentielle synthèse de collagène fibrillaire de type I, II, III, V et XI, et de collagène membranaire de type IV. Le dosage du collagène soluble a été effectué par le test colorimétrique Sircol™ Soluble Collagen Assay (Réf n°S1000 Biocolor Ltd, Carrickfergus, Royaume-Uni) basée sur le changement d'absorbance du Sircol Dye Reagent après sa complexation avec le collagène présent dans du tissu pulmonaire digéré. Afin de permettre la mesure de la concentration de collagène soluble, une gamme étalon comprise entre 15,625 et 500 µg/mL à partir d'une quantité standard de collagène de type I soluble a été réalisée. Les échantillons pulmonaires utilisés provenaient du lobe caudal appartenant au poumon droit des souris exposées, préalablement digéré enzymatiquement et concentré. Cent µL de chaque échantillon digéré ont été déposés dans un tube de 5mL. Ensuite, 1mL de la solution de Sircol, puis 1mL de l'Alkali Reagent (qui libère le colorant du complexe collagène-Sircol) ont été ajoutés successivement dans ce même tube. Enfin, 200µL de ce mélange final a été déposé sur une plaque de 96 puits. L'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à 556 nm par spectroscopie (TECAN, Infinite M200PRO, Männedorf, Suisse).

V.2.1.8.3 Étude histologique morphométrique du remodelage pulmonaire

Les coupes histologiques de poumon coupées à une épaisseur de 3 µm ont été colorées en H&E, puis photographiées au grossissement 200X au moyen d'un MO à plateforme motorisée (Zeiss Axioimager 2, Oberkochen, Allemagne) équipé d'une caméra (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne). L'acquisition des images a été réalisée avec le logiciel Zeiss Zen 2012. Deux types d'analyses morphométriques sont présentées ci-dessous, l'une selon la méthode des intersections linéaires « Mean Linear Intercept » et l'autre par la mesure des épaisseurs des parois bronchiolaires. Ces analyses ont permis d'obtenir des données sur le remodelage alvéolaire et bronchiolaire, respectivement.

V.2.1.8.3.1 Analyse morphométrique du remodelage alvéolaire

L'analyse morphométrique des structures alvéolaires employée est celle de la méthode des intersections linéaires « Mean Linear Intercept » (MLI) ayant but de donner une indication sur la formation d'emphysème (distension anormale et permanente des espaces aériens associée à une destruction des cloisons interalvéolaires). Pour cela, le logiciel d'analyse d'image ImageJ (version 1.53) a été utilisé après création d'un programme de comptage automatisé développé en collaboration avec la plateforme d'imagerie de l'IMRB pour optimiser une méthode antérieure intégralement manuelle. Brièvement, ce programme permet de reproduire de façon automatisée la méthode MLI avec l'application d'une grille de comptage habituellement employée : la grille de Weibel (102). Il s'agit d'une grille composée de plusieurs segments qui est superposée sur chaque champ de tissu pulmonaire (**Figure 31**). Chaque intersection (Ia) entre un segment de la grille et une paroi alvéolaire est alors dénombrée de façon automatisée. Pour calculer l'intercept linéaire moyen ou MLI, la formule suivante a été employée (103):

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

$$MLI (\mu\text{m}) = \frac{2 \times f \times L_{\text{tot}}}{l_a \times G}$$

- f : facteur de rétraction du poumon dans le formaldéhyde (ici 1,22 car il a été estimé lors d'une mise au point antérieure au sein du laboratoire qu'1 cm de parenchyme pulmonaire sur une coupe équivalait à 1,22 cm de parenchyme frais)
- G : grossissement du microscope
- L_{tot} : Longueur totale des segments de la grille de comptage (μm)
- l_a : nombre d'intersections entre un segment de la grille et une paroi alvéolaire

Pour chaque champ, l'intercept linéaire moyen ou MLI ainsi obtenu a permis de rendre compte d'une distance moyenne entre chaque septa alvéolaire. Au total, pour chaque coupe du lobe gauche de souris, 10 champs contenant des structures alvéolaires exclusivement au grossissement 200X ont été sélectionnés de façon aléatoire. Les résultats obtenus par souris sont la moyenne des intercepts linéaires moyens ou MLI retrouvés pour les 10 champs (μm).

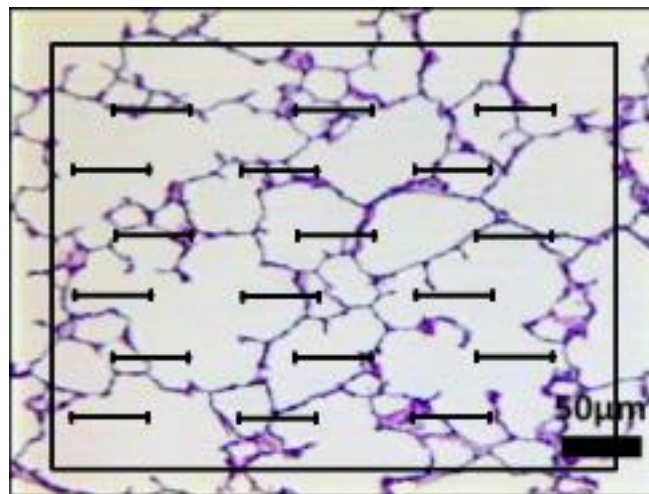


Figure 31 : Méthode de quantification du remodelage alvéolaire par la méthode d'évaluation de l'intercept linéaire moyen « Mean Linear Intercept » (MLI). Exemple de champ aléatoire d'une coupe de poumon de souris colorée en hématoxyline et éosine (H&E) en microscopie optique (grossissement X200), avec apposition d'une grille de comptage de Weibel permettant de quantifier les intercepts linéaires selon la méthode MLI. Chaque intersection entre un segment de la grille et une paroi alvéolaire est dénombrée de façon automatisée d'après (102).

V.2.1.8.3.2 Analyse morphométrique du remodelage bronchiolaire

L'évaluation de l'épaisseur moyenne des parois des bronchioles de chaque animal a été réalisée sur l'ensemble des bronchioles d'environ 200 μm de diamètre dont la paroi est circulaire présentes sur la coupe histologique (**Figure 32**). Pour cela, le logiciel d'analyse d'image ImageJ (version 1.53) a été utilisé après création d'un programme en collaboration avec la plateforme d'imagerie de l'IMRB. Brièvement, ce programme transformait l'image colorée en image binarisée (noir & blanc) en gardant les paramètres de l'image, notamment l'échelle afin d'obtenir ensuite l'épaisseur. Au minimum, 7 bronchioles par animal ont été photographiées (grossissement 200X), puis 10 mesures équidistantes d'épaisseur ont été effectuées sur l'ensemble de la circonférence de chaque bronchiole. La moyenne de ces 10 mesures équidistantes ont permis d'obtenir la valeur moyenne d'épaisseur d'une bronchiole. Les valeurs moyennes d'épaisseurs de chaque bronchiole sont ensuite sommées et moyennées pour chaque animal, afin d'obtenir la valeur moyenne des épaisseurs moyennes de l'ensemble des bronchioles d'un animal.

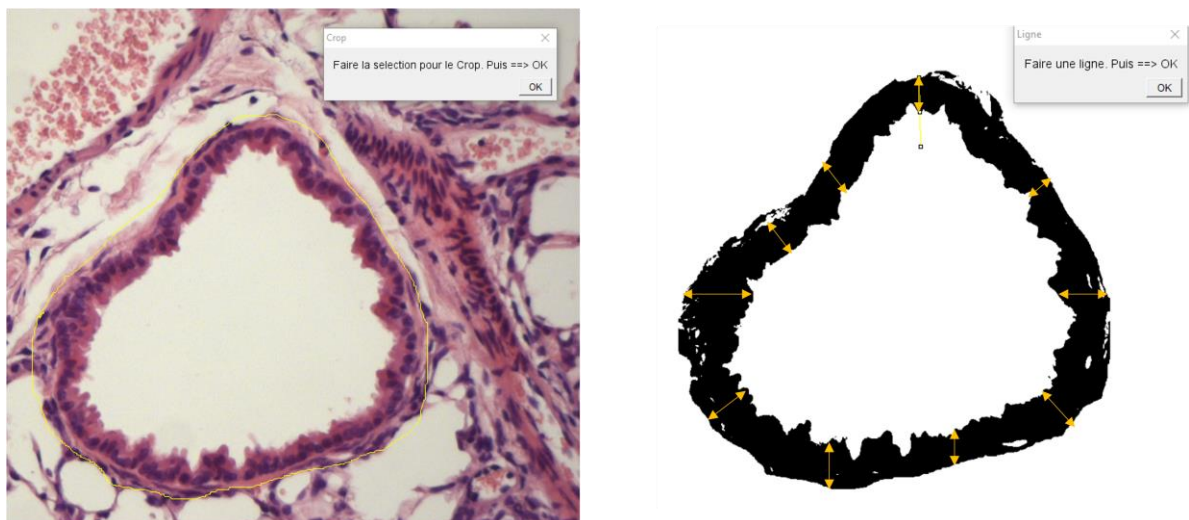


Figure 32 : Méthode d'évaluation de l'épaisseur de la paroi d'une bronchiole.

A gauche : Coupe histologique d'une bronchiole circulaire coloré en hématoxyline et éosine (H&E) en microscopie optique (grossissement X200)

A droite : Contourage automatisé de la circonférence de la bronchiole avec 10 mesures équidistantes (jaune) de l'épaisseur de la paroi bronchiolaire en μm

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Matériel et méthodes

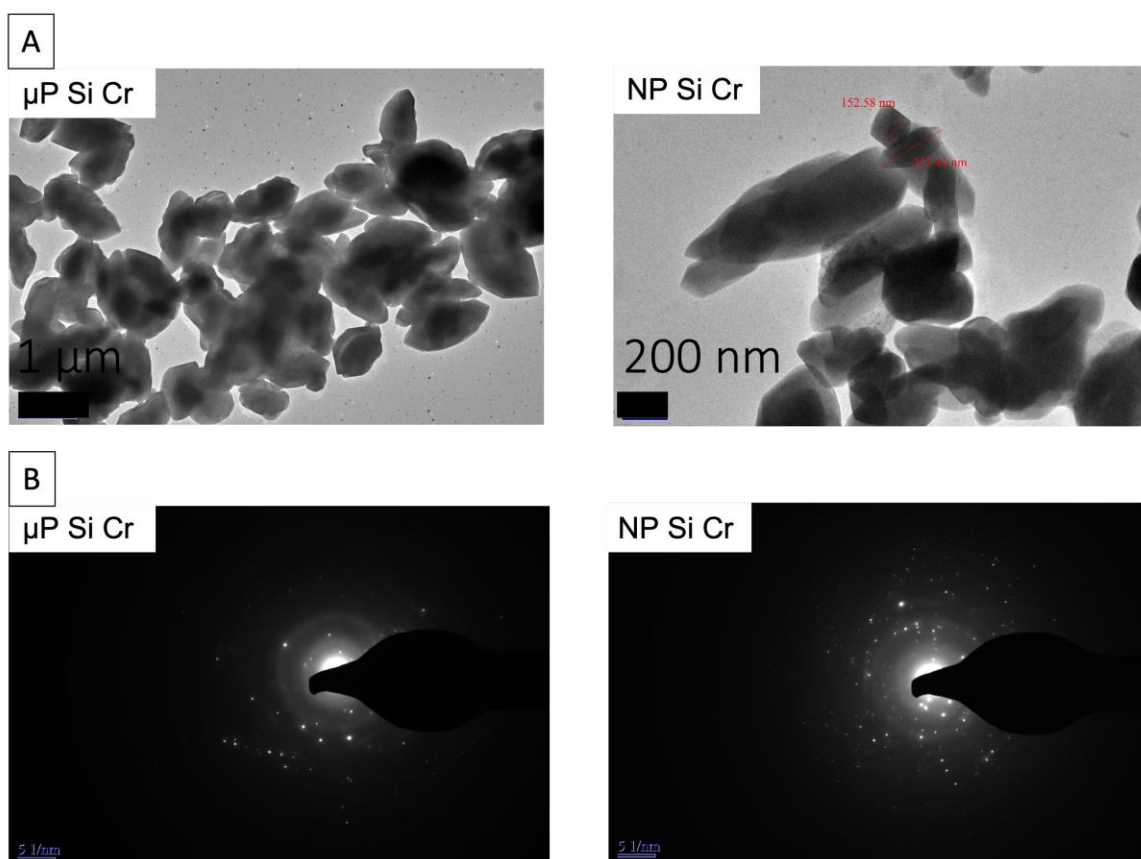
V.2.1.9 Analyses statistiques

A chaque dose et à chaque temps d'exposition, un effectif final de 8 à 13 animaux par groupe expérimental a été utilisé (en fonction des pertes suite à l'expérimentation). En admettant que la population de souris ne suive pas une loi de distribution normale, puisque le nombre de souris est inférieur à 30, les analyses statistiques choisies ont employé le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs si la valeur de p était strictement inférieure à 0,05 et exprimés en matière de moyenne avec un écart-type de la moyenne (SEM ou Standard Error of the Mean) sous forme de diagrammes de dispersion univariés (95). Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9 (La Jolla, Californie, Etats-Unis).

V.2.2 Résultats

V.2.2.1 Caractérisation physico-chimique des échantillons de particules de SiO₂

Les observations des échantillons de silice en MET montrent que de façon attendue les μ P Si Cr et les NP Si Cr sont sous la forme de cristaux (**figure 33A**). De plus, l'EDX a permis de bien montrer que la structure des μ P Si Cr et des NP Si Cr était bien cristalline (**figure 33B**). Concernant la morphologie des μ P Si Am et des NP Si Am), la caractérisation en MET révèle que celles-ci sont bien parfaitement sphériques (**figure 33C**). Par ailleurs, l'EDX ne montre pas sur ces dernières de caractère cristallin.



Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

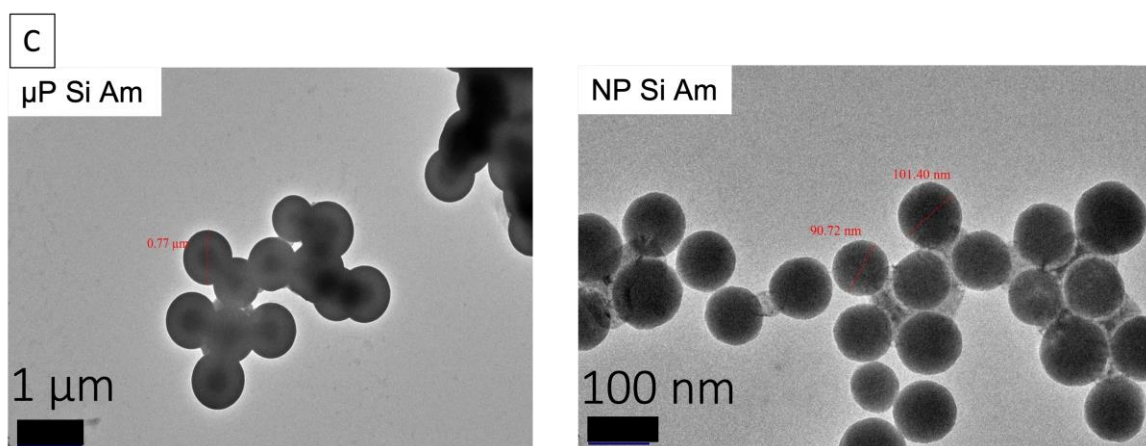


Figure 33 : Caractérisation physico-chimique des microparticules et nanoparticules de SiO₂ cristalline et amorphe vieilles (6 mois après leur synthèse) et conservées dans les solutions mères en microscopie électronique à transmission (MET) couplée à la diffraction des rayons X (DRX). Microparticules et nanoparticules de silice cristalline (**A en MET, B en DRX**) et de silice amorphe (**C en MET, D en DRX**).

μP : microparticule ; *NP* : nanoparticule ; *Si Cr* : particules de SiO₂ cristalline ; *Si Am* : particules de SiO₂ amorphe

V.2.2.2 Expérimentation chez l'animal : effectifs de souris

Globalement et à l'issue de chaque temps d'exposition (J1, M3 et M6), il existe un faible taux de perte de souris (**Tableau 10**). Au temps d'exposition J1, une seule souris est décédée dans le groupe exposé aux NP Si Cr à la dose de 5 μg. Au temps d'exposition M3, 5 souris sont décédées au total, avec au plus 1 décès par groupe. Au temps d'exposition M6, 12 souris sont décédées au total, avec 1 à 2 décès au plus par groupe, hormis le groupe exposé aux NP Si Am à la dose hebdomadaire de 50 μg, avec 5 souris décédées.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

Tableau 10 : Effectifs initiaux et finaux de souris dans les neuf groupes d'exposition à des particules de silice (SiO₂) cristalline ou amorphe à l'issue de chaque temps d'exposition (J1 : 1 jour, M3 : 3 mois et M6 : 6 mois).

μP : microparticule ; *NP* : nanoparticule.

Groupes d'exposition		J1 Nombre de souris	M3 Nombre de souris	M6 Nombre de souris
Témoin NaCl 0,9%	■	10	9 (-1)	12 (-1)
μP SiO ₂ cristalline 5 μg (μP Si Cr 5 μg)	◇	10	9 (-1)	13
μP SiO ₂ cristalline 50 μg (μP Si Cr 50 μg)	◇	10	9 (-1)	13
NP SiO ₂ cristalline 5 μg (NP Si Cr 5 μg)	◇	10	10	11 (-2)
NP SiO ₂ cristalline 50 μg (NP Si Cr 50 μg)	◇	9 (-1)	10	12 (-1)
μP SiO ₂ amorphe 5 μg (μP Si Am 5 μg)	○	10	9 (-1)	12 (-1)
μP SiO ₂ amorphe 50 μg (μP Si Am 50 μg)	○	10	10	12 (-1)
NP SiO ₂ amorphe 5 μg (NP Si Am 5 μg)	○	10	10	12 (-1)
NP SiO ₂ amorphe 50 μg (NP Si Am 50 μg)	○	10	9 (-1)	8 (-5)
Effectif total initial par temps d'exposition		90	90	118
Perte totale par temps d'observation		-1	-5	-12
Effectif total final par temps d'exposition		89	85	105

V.2.2.3 Analyse de l'inflammation pulmonaire

V.2.2.3.1 Quantification de la cellularité totale dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

L'analyse de la cellularité totale dans le LLBA montre qu'il existe une diminution significative du nombre de cellules vivantes chez les souris exposées aux NP Si Cr à la dose unique de 50 µg à J1 et chez les souris exposées aux µP Si Cr à la dose hebdomadaire de 5 µg à M3 ($p < 0,01$ et $p < 0,05$, respectivement). Il n'y a en revanche aucune différence statistiquement significative quel que soit le groupe chez les souris au temps d'exposition M6 (Figure 34). Globalement, ce marqueur global ne permet pas de mettre en évidence d'inflammation pulmonaire.

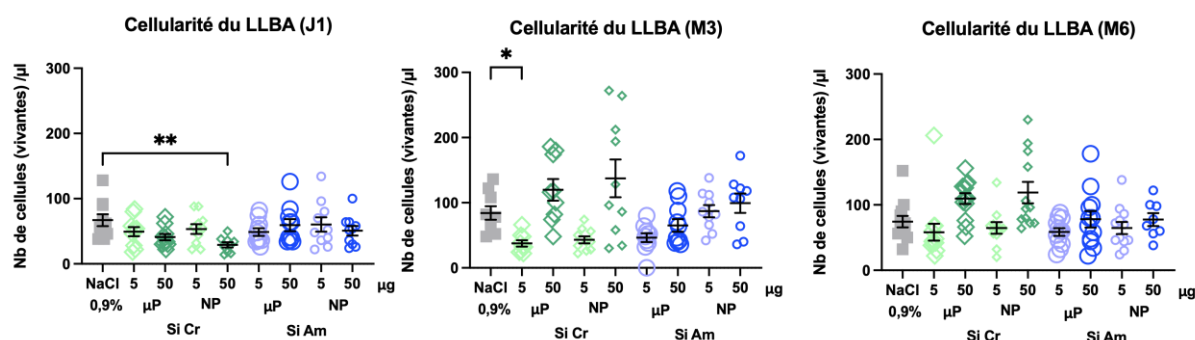


Figure 34 : Quantification de la cellularité totale dans le liquide lavage broncho-alvéolaire (LLBA) (en nombre de cellules vivantes par µL de LLBA) de souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 1 jour, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).
** $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport au groupe témoin.*

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

V.2.2.3.2 Étude du différentiel cellulaire dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

Au temps d'exposition J1, une augmentation statistiquement significative du pourcentage en polynucléaires neutrophiles ($p < 0,0001$) est observée au détriment d'une diminution significative du pourcentage en macrophages ($p < 0,0001$) dans les groupes de souris exposées aux μP Si Cr et aux NP Si Cr aux doses hebdomadaires de 50 μg . Par ailleurs, il existe une légère augmentation statistiquement significative pour le groupe de souris exposées aux μP Si Am à la dose hebdomadaire de 50 μg ($p < 0,05$) (**Figure 35**).

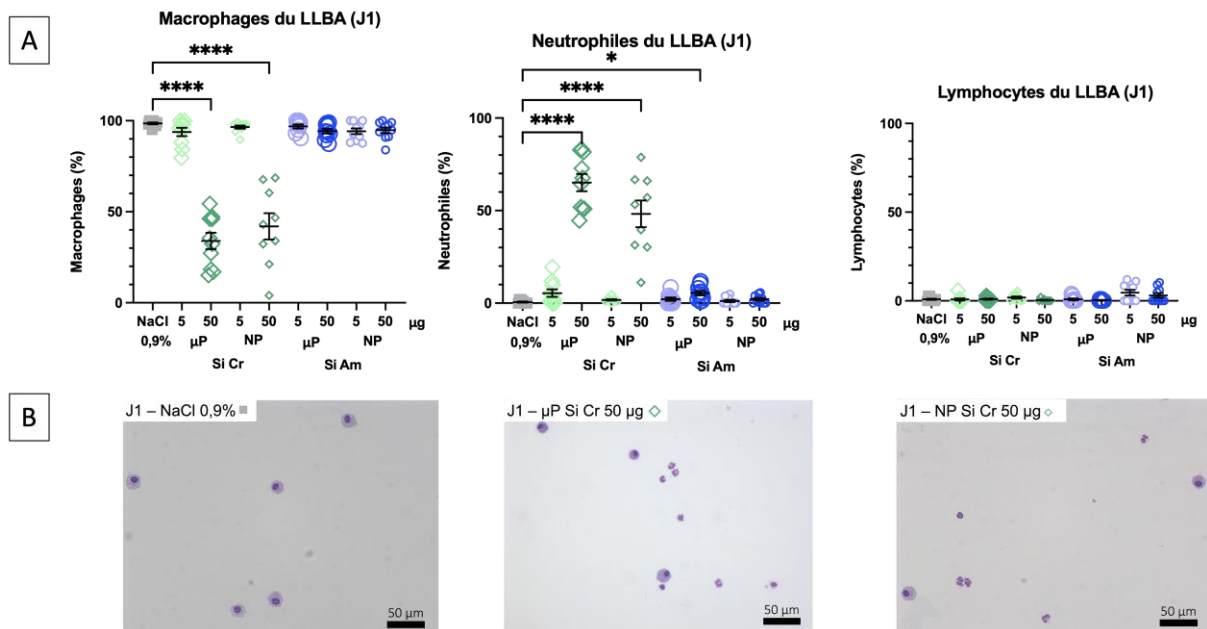


Figure 35 : Quantification de la cellularité différentielle (en pourcentage) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) de souris exposées aux doses de 5 μg ou 50 μg de microparticules (μP) ou nanoparticules (NP) de SiO_2 cristalline (Si Cr) ou de SiO_2 amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, 24h après une exposition unique (J1) (**A**). Clichés **B** des cellules présentes dans le LLBA de souris exposées à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins ou aux particules (μP et NP) de silice cristalline à la dose de 50 μg à J1 après coloration au MGG en microscopie optique (grossissement : X200, échelle = 50 μm).

** $p < 0,05$, et **** $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin.*

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

Au temps d'exposition M3 (**Figure 36A et B**) :

- Dans les groupes de souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg , le pourcentage en macrophages chute d'environ un tiers ($p < 0,001$), au détriment de la population des polynucléaires neutrophiles représentant environ un tiers et un quart, respectivement ($p < 0,001$). Dans ces deux groupes, la troisième population cellulaire majoritaire est représentée par les lymphocytes avec une augmentation statistiquement significative à environ 10%, ($p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement).
- Dans le groupe de souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ à la dose hebdomadaire de 5 μg , une légère augmentation statistiquement significative du pourcentage en polynucléaires neutrophiles est observée également sans diminution significative des macrophages alvéolaires parallèlement ($p < 0,05$).

De la même façon, au temps d'exposition M6 (**Figure 36C et D**) :

- Dans les groupes de souris exposées aux μP et aux NP Si Cr la dose hebdomadaire de 50 μg , le pourcentage en macrophages chute de façon statistiquement significative d'environ 40% ($p < 0,01$ et $p < 0,001$ respectivement), en faveur du pourcentage en polynucléaires neutrophiles augmentant à environ 25% ($p < 0,001$) et 30% ($p < 0,001$) des populations cellulaires présentes dans le LLBA. La troisième population cellulaire majoritaire est représentée par les lymphocytes qui augmentent également de façon statistiquement significative à environ 15% et 10% respectivement ($p < 0,05$ pour ces deux groupes d'exposition).
- Dans le groupe de souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ à la dose hebdomadaire de 5 μg , une légère diminution statistiquement significative du pourcentage en macrophages est observée ($p < 0,05$), alors qu'en contrepartie le pourcentage en polynucléaires neutrophiles augmente de façon statistiquement significative ($p < 0,01$).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

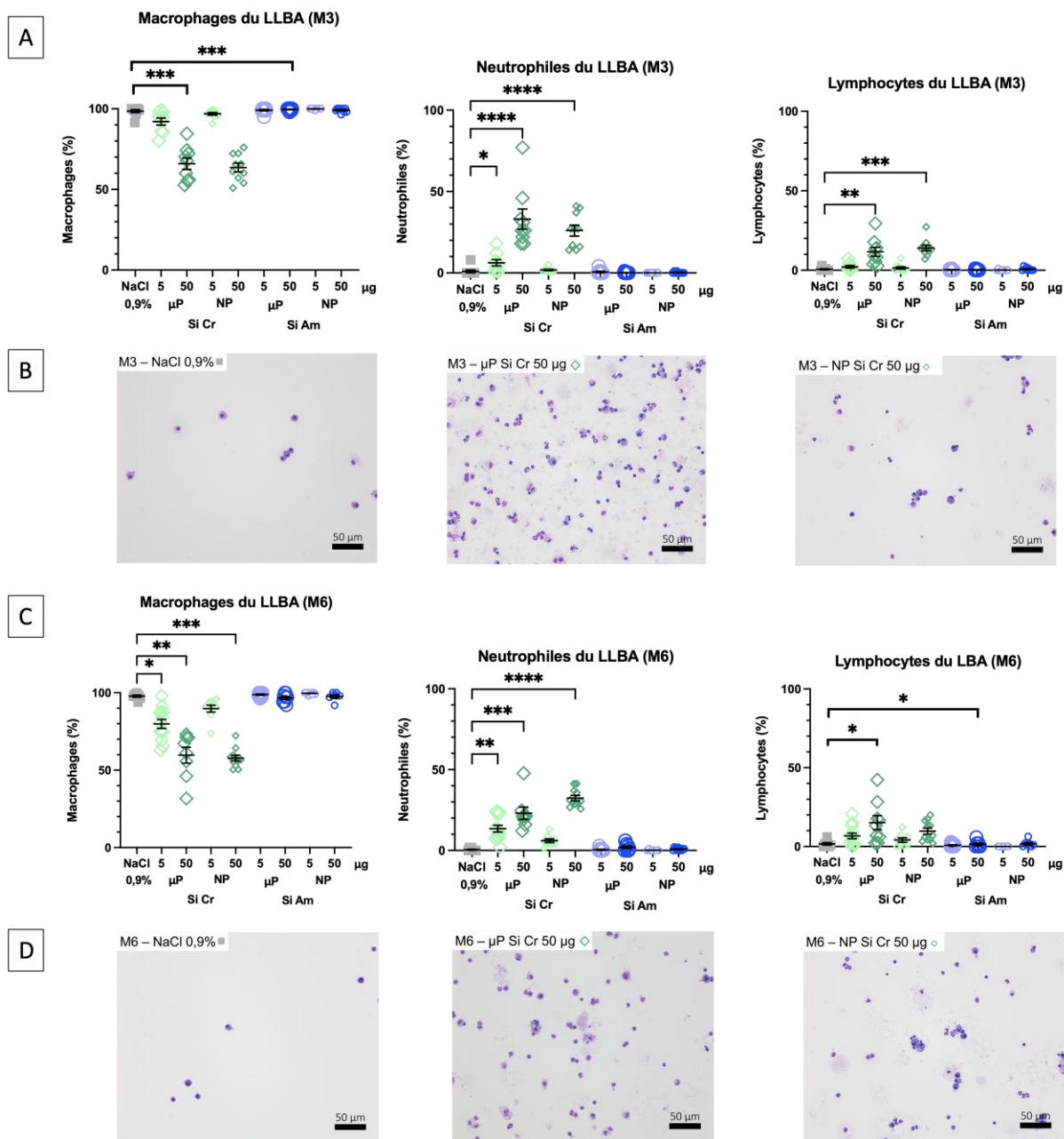


Figure 36 : Quantification de la cellularité différentielle (en pourcentage) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) de souris exposées de façon hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à l'issue des temps d'exposition de 3 mois (M3) (A) et 6 mois (M6) (C). Clichés des cellules présentes dans le LLBA de souris exposées à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, ou aux particules (µP et NP) de silice cristalline à la dose hebdomadaire de 50 µg aux temps d'exposition M3 (B) et M6 (D) après coloration au MGG en microscopie optique (grossissement : X200, échelle = 50 µm).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

V.2.2.3.3 Quantification des protéines totales dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

La concentration en protéines totales dans le surnageant du LLBA augmente de façon statistiquement significative dès le temps d'exposition J1 dans le groupe de souris exposées aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 µg ($p < 0,01$), avec une augmentation qui s'accroît quantitativement aux temps d'exposition M3 ($p < 0,0001$) et M6 ($p < 0,001$). De même, une tendance à l'augmentation est observée au temps d'exposition J1 pour le groupe de souris exposées aux µP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 µg. Cette tendance est confirmée par la suite avec une augmentation statistiquement significative équivalente quantitativement aux deux temps d'exposition M3 ($p < 0,0001$) et M6 ($p < 0,001$). De plus, une augmentation statistiquement significative est également observée au temps d'exposition M6 ($p < 0,05$) est aussi retrouvée dans le groupe de souris exposées aux µP Si Cr à la dose hebdomadaire de 5 µg. Il n'existe aucune variation de la concentration en protéines totales pour les groupes de souris exposées à des particules de silice amorphe, quels que soient la dose administrée et le temps d'exposition (**Figure 37**).

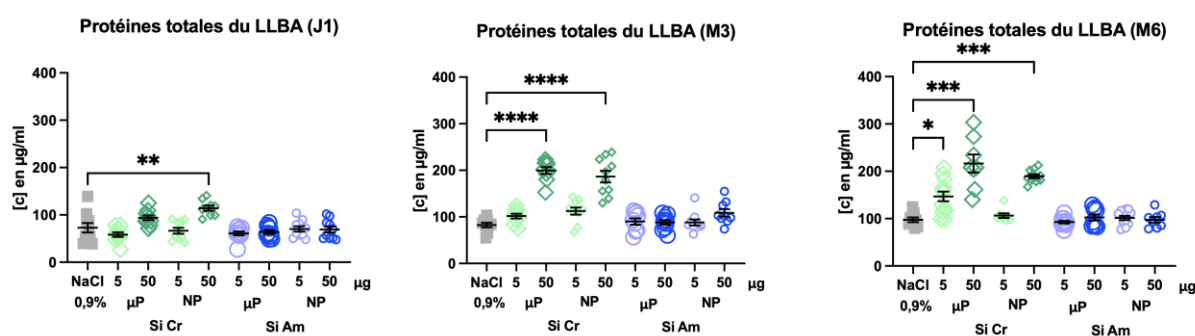


Figure 37 : Quantification des protéines totales (en µg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) de souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin.

V.2.2.3.4 Quantification des médiateurs pro-inflammatoires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

V.2.2.3.4.1 Facteurs de croissance hématopoïétiques et vasculaires

Les facteurs de croissance hématopoïétiques G-CSF (Granulocytes-Colony Stimulating Factor) et GM-CSF (Granulocytes Macrophages-Colony Stimulating Factor) sont des cytokines de la moelle osseuse sécrétées pour contrôler la production, la différenciation et la fonction des polynucléaires (ou granulocytes) pour G-CSF et à la fois des granulocytes et des macrophages pour GM-CSF. Dans le surnageant du LLBA, certains de ces facteurs de croissance sont augmentés de façon statistiquement significative :

Le facteur de croissance G-CSF est augmenté de façon statistiquement significative à tous les temps d'exposition J1, M3 et M6 pour les groupes de souris exposées aux μ P Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g ($p < 0,0001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$, respectivement pour ces 3 temps d'exposition pour les souris exposées aux μ P Si Cr, et $p < 0,0001$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, respectivement pour ces 3 temps d'exposition pour les souris exposées aux NP Si Cr) (**Figure 38A**). Cependant, il est à noter que :

- Pour les groupes de souris exposées aux μ P Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g, l'augmentation du G-CSF décroît à partir du temps d'exposition M6.
- Pour le groupe de souris exposées aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g, le taux de G-CSF est maximal au temps d'exposition J1, puis cette augmentation décroît aux temps d'exposition M3 et M6.

Enfin, pour le groupe de souris exposées aux μ P Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 5 μ g, une augmentation faible statistiquement significative est observée uniquement au temps d'exposition M6 ($p < 0,01$ et $p < 0,05$, respectivement).

Parmi les groupes de souris exposées aux μ P Si Am et aux NP Si Am, seul le groupe de souris exposées aux μ P Si Am à la dose hebdomadaire de 50 μ g présente une légère augmentation statistiquement significative ($p < 0,001$) uniquement au temps d'exposition J1.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

Concernant le facteur de croissance GM-CSF celui-ci est augmenté de manière significative au temps d'exposition J1 seulement pour les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ à la dose hebdomadaire de 50 μg ($p < 0,0001$) (**Figure 38B**).

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) contrôle quant à lui la prolifération et la migration des cellules endothéliales mais permet aussi le recrutement par chimiotactisme des macrophages et des polynucléaires (**Figure 38C**). Le VEGF est augmenté de manière statistiquement significative et progressive au cours des 3 temps d'exposition J1, M3 et M6 pour les groupes de souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg ($p < 0,01$, $p < 0,01$ et $p < 0,05$, respectivement pour les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$, et $p < 0,001$, $p < 0,001$ et $p < 0,01$, respectivement pour les souris exposées aux NP Si Cr).

Il est à noter également qu'une augmentation statistiquement significative est observée également pour les groupes de souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ à la dose hebdomadaire de 5 μg , aux temps d'exposition M3 et M6 ($p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement). Concernant les souris exposées aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 5 μg , l'augmentation est statistiquement significative mais uniquement au temps d'exposition M6 ($p < 0,05$).

En revanche, il n'existe aucune variation statistiquement significative du VEGF pour les souris exposées aux particules de silice amorphe, quels que soient la taille, la dose administrée ou le temps d'exposition.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

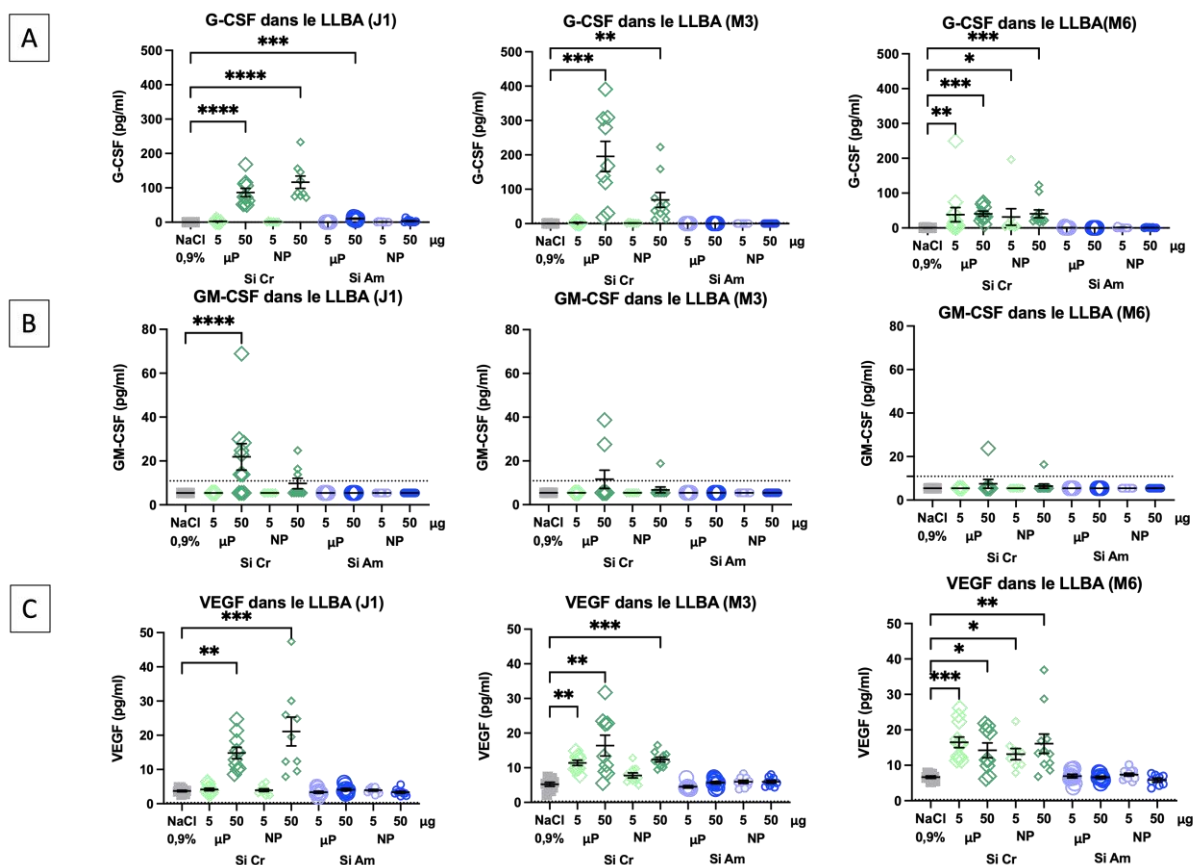


Figure 38 : Quantification des facteurs de croissance hématopoïétiques G-CSF (A), GM-CSF (B) et de l'endothélium vasculaire VEGF (C) (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex[®] de souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).
p<0,05, ** p<0,01, * p<0,001 et ****p<0,0001 par rapport au groupe témoin.*

V.2.2.3.4.2 Cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation macrophagique

Les cytokines pro-inflammatoires TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1, également appelée CC chemokine ligand 2 ou CCL2) et MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein 1α, également appelée CC chemokine ligand ou CCL3) sont toutes les trois impliquées dans l'inflammation macrophagique à des degrés divers, comme il suit. La protéine TNF-α est directement sécrétée par les macrophages. La protéine MCP-1 est, quant à elle, une chimiokine sécrétée par les macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales permettant notamment, le recrutement par chimiotactisme de monocytes présents dans la circulation sanguine, sachant qu'il s'agit des précurseurs des macrophages

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

tissulaires. Enfin, la protéine MIP-1 α est elle aussi une chimiokine sécrétée par les macrophages permettant principalement le recrutement d'autres macrophages dans le tissu, de polynucléaires neutrophiles et de monocytes sanguins. Les cytokines TNF- α , MCP-1 et MIP-1 α ont été dosées dans le surnageant du LLBA au cours des trois temps d'exposition J1, M3 et M6 (**Figure 39**).

Au temps d'exposition J1, seule la cytokine MIP-1 α est augmentée de manière statistiquement significative uniquement chez les souris exposées aux μ P Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g ($p < 0,001$ et $p < 0,0001$, respectivement) (**Figure 39C**). En revanche, pour les cytokines TNF- α et MCP-1, les résultats obtenus sont globalement sous le seuil de détection (2,3 et 6,7 pg/mL, respectivement) ne permettant pas de conclure quelles que soient la particule et la dose hebdomadaire.

En revanche, aux temps d'exposition M3 et M6, l'expression de la cytokine TNF- α est significativement augmentée chez les souris exposées aux μ P Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g ($p < 0,0001$ pour ces 2 groupes à ces deux temps d'exposition) (**Figure 39A**). L'expression de la cytokine MCP-1 est augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées aux μ P Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g ($p < 0,0001$ pour ces 2 groupes à ces deux temps d'exposition) (**Figure 39B**). De plus, à ces deux temps d'exposition à la dose hebdomadaire de 50 μ g, les expressions des cytokine MIP-1 α et de MCP-1 sont augmentées de façon statistiquement significative aussi bien chez les souris exposées aux μ P Si Cr qu'aux NP Si Cr ($p < 0,0001$ pour tous les groupes et à ces deux temps d'exposition pour MCP-1, et $p < 0,001$ pour le MIP-1 α pour tous les groupes et à ces deux temps d'exposition, sauf pour les souris exposées aux NP Si Cr au temps d'exposition M6 avec un $p < 0,0001$). Par ailleurs, à ces deux temps d'exposition à la dose hebdomadaire de 5 μ g, la cytokine MCP-1 est également augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées aux μ P Si Cr aux temps d'exposition M3 et M6 ($p < 0,01$ pour ces deux temps d'exposition). A ces deux temps d'exposition à la dose hebdomadaire de 5 μ g, la cytokine MIP-1 α est augmentée de façon statistiquement significative seulement chez les souris exposées aux μ P Si Cr au temps d'exposition M6 ($p < 0,01$).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

Il est important de noter qu'il n'existe aucune variation statistiquement significative de ces 3 cytokines chez les souris exposées aux particules de silice amorphe, quels que soient la taille, la dose administrée ou le temps d'exposition.

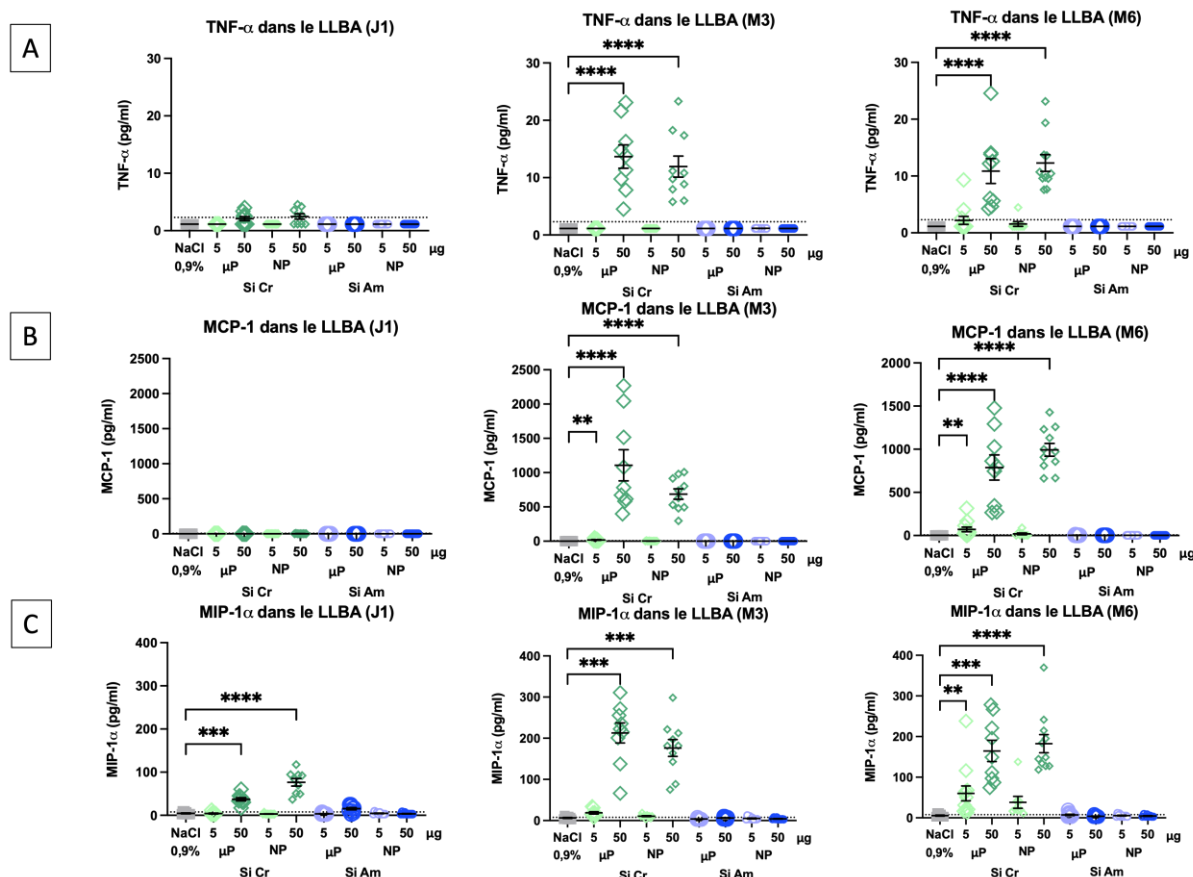


Figure 39 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation macrophagique TNF-α (A), MCP-1 (B) et MIP-1α (C) (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex® chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin.

Concernant les dosages des autres cytokines de la famille de MIP, les protéines MIP-1β et MIP-2, n'a pas permis de mettre en évidence de différence statistiquement significative, quels que soient la particule ou le temps d'exposition, puisque les résultats étaient tous sous le seuil de détection (données non montrées).

V.2.2.3.4.3 Cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation neutrophilique

La protéine chémoattractante des polynucléaires neutrophiles KC (Keratinocyte Chemoattractant, également appelée C-X-C motif ligand-1 ou CXCL1) et la chimiokine CXC induite par les lipopolysaccharides LIX (Lipopolysaccharide-Induced CXC Chemokine, également appelée CXCL5) font partie des cytokines impliquées dans l'inflammation neutrophilique, notamment dans le recrutement par chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles. Ces deux chimiokines ont été dosées dans le surnageant du LLBA au cours des trois temps d'exposition J1, M3 et M6 (**Figure 40**).

Au temps d'exposition J1, la cytokine pro-inflammatoire KC est augmentée de façon statistiquement significative pour l'ensemble des groupes d'exposition aux particules de silice cristalline quelle que soit la taille, aux doses hebdomadaires de 5 et 50 μg ($p < 0,001$ et $p < 0,0001$, respectivement pour les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$, et $p < 0,01$ et $p < 0,0001$, respectivement pour les souris exposées aux NP Si Cr) (**Figure 40A**). En revanche, la cytokine KC est augmentée de façon statistiquement significative uniquement chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Am}$ à la dose hebdomadaire de 50 μg ($p < 0,05$). Concernant la cytokine pro-inflammatoire LIX, celle-ci est augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg ($p < 0,0001$ et $p < 0,001$, respectivement) (**Figure 40B**).

Aux temps d'exposition chronique (M3 et M6), l'expression de ces deux chimiokines est relativement comparable avec :

- Une augmentation significative de la protéine KC observée chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$, quel que soit le temps d'exposition aux doses hebdomadaires administrées de 5 et 50 μg ($p < 0,05$ et $p < 0,0001$, respectivement au temps d'exposition M3, et $p < 0,01$ et $p < 0,0001$, respectivement au temps d'exposition M6).
- Une augmentation significative de la protéine LIX observée chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$, uniquement au temps d'exposition M6 à la dose hebdomadaire de 5 μg ($p < 0,05$). En revanche, à la dose hebdomadaire de 50 μg , une augmentation significative de la protéine LIX observée chez les souris exposées aux particules de silice

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

cristalline, quels que soient la taille et le temps d'exposition M3 ou M6 ($p < 0.0001$ pour les quatre conditions).

- Chez les souris exposées aux particules de silice amorphe, aucune variation statistiquement significative n'est observée pour ces deux cytokines, quels que soient la dose administrée ou le temps d'exposition (M3 ou M6)

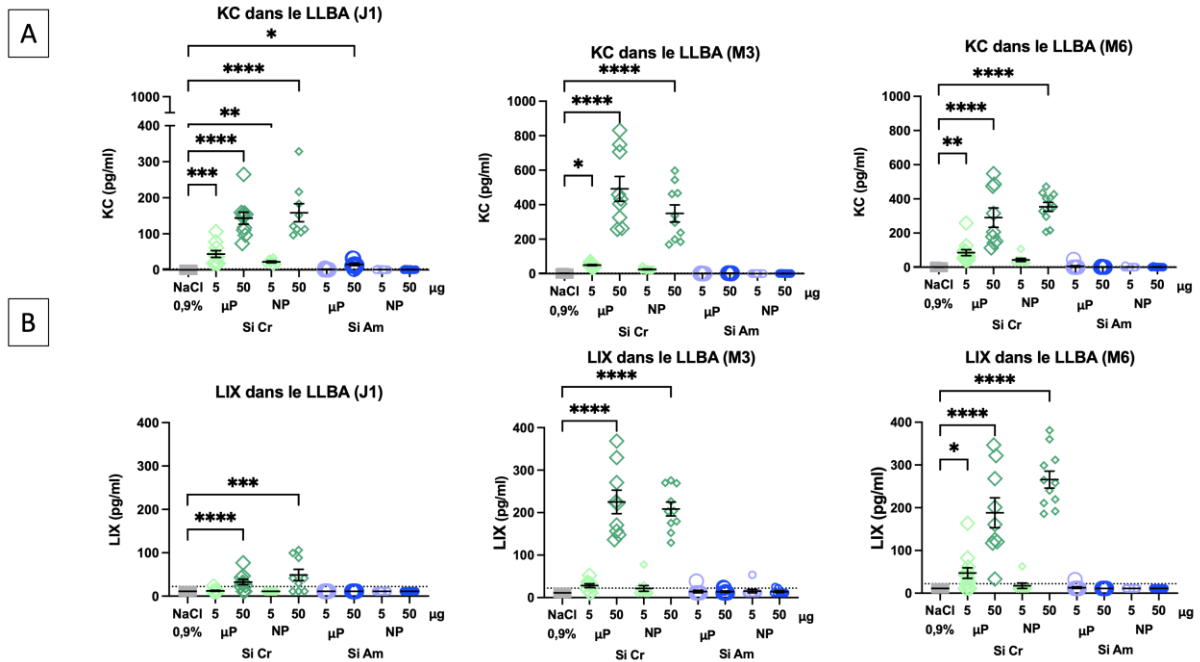


Figure 40 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation neutrophilique KC (**A**) et LIX (**B**) (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex® chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

V.2.2.3.4.4 Cytokines pro-inflammatoires liées à l'interféron gamma (IFN- γ)

L'interféron gamma ou IFN- γ , sécrétée par les lymphocytes T de type Th1, est une des principales cytokines pro-inflammatoires de l'immunité innée. Par ailleurs, les protéines MIG (Monokine Induced Gamma interferon, également appelée CXCL9) et IP-10 (Interferon inducible Protein 10, également appelée CXCL10) sont des cytokines sécrétées par les populations de monocytes et de macrophages après une sécrétion d'IFN- γ . Par ailleurs, l'interleukine IL-10 est sécrétée par les monocytes et diminue la sécrétion de cytokines, telle que l'IFN- γ par exemple.

Au temps d'exposition J1, les cytokines IFN- γ , MIG, IP-10 et IL-10 sont très faiblement détectées dans le surnageant du LLBA sans variation statistiquement significative observée, quels que soient le type de particules de silice, la taille de la particule et la dose instillée.

Pour le temps d'exposition M3, ces 3 cytokines sont augmentées de façon statistiquement significative dans certains groupes d'exposition, hormis l'IL-10, comme il suit (**Figure 41A**) :

- L'expression de l'IFN- γ est augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g au temps d'exposition M3 ($p < 0,05$). Il est à noter qu'il existe par ailleurs une tendance à l'augmentation, mais non significative statistiquement, de cette même cytokine chez les souris exposées aux μ P Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g comme en témoigne la **Figure 41A**.
- L'expression des protéines MIG est augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées aux particules de silice cristalline à la dose hebdomadaire de 50 μ g, quelle que soit la taille de la particule ($p < 0,0001$ pour les souris exposées aux μ P Si Cr ou aux NP Si Cr) (**Figure 41B**).
- De même, l'expression des protéines IP-10 est augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 μ g de μ P Si Cr ou de NP Si Cr ($p < 0,0001$ et $p < 0,001$, respectivement) (**Figure 41C**).
- En revanche, il existe une diminution statistiquement significative de l'IL-10 chez les souris exposées aux μ P Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g ($p < 0,05$) (**Figure 41D**).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

Concernant le temps d'exposition M6, les observations sont les suivantes :

- Aucune variation statistiquement significative de l'IFN- γ n'est observée à ce temps d'exposition, quels que soient le type de particule, la taille de la particule ou la dose administrée (**Figure 41A**).
- L'expression des protéines MIG est augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 μg aux particules de silice cristalline, quelle que soit la taille de la particule ($p < 0,0001$) (**Figures 41B**).
- De même, l'expression des protéines IP-10 est augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 μg aux particules de silice cristalline, quelle que soit la taille de la particule ($p < 0,001$ pour les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ ou aux NP Si Cr) (**Figures 41C**).
- En revanche, il existe une diminution statistiquement significative de l'IL-10 chez les souris exposées aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg ($p < 0,01$) (**Figure 41D**).
- Il est à noter qu'à la dose hebdomadaire de 5 μg , il existe uniquement une augmentation de façon statistiquement significative de la protéine MIG seulement chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ ($p < 0,05$) (**Figures 41B**).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

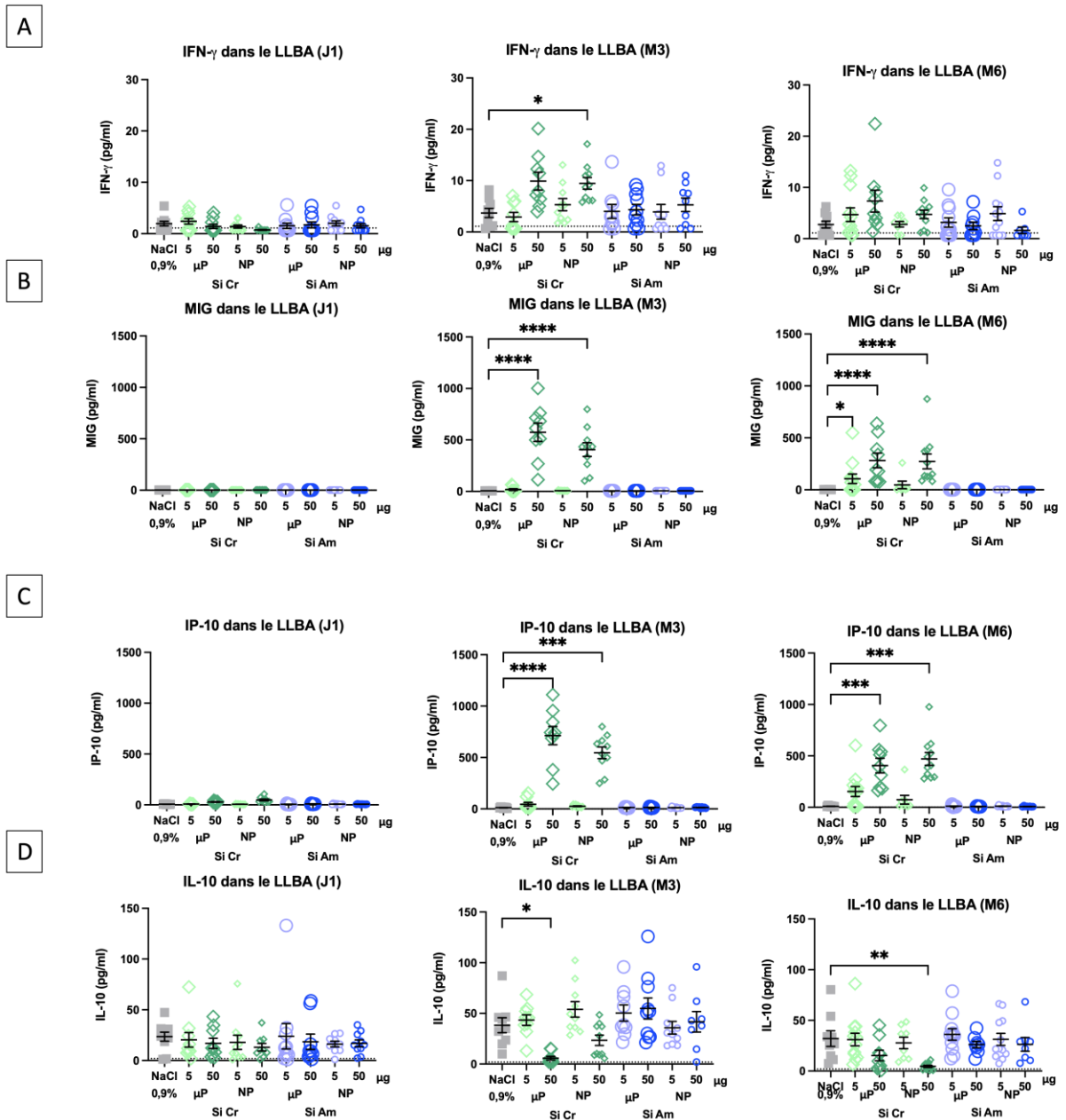


Figure 41 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ (A), MIG (B), IP-10 (C) et IL-10 (D) (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex[®] chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 μ g ou 50 μ g de microparticules (μ P) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

V.2.2.3.4.5 Cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'interleukine 1

L'interleukine IL-1 α est une cytokine de la famille de l'interleukine 1 et est sécrétée par les monocytes dans le sang et par les macrophages activés dans les tissus.

Au temps d'exposition J1, il n'existe pas de différence statistiquement significative, quel que soit le groupe d'exposition.

Néanmoins, aux temps d'exposition chronique M3 et M6, l'IL-1 α diminue de façon statistiquement significative, chez les souris exposées aux μ P Si Cr ou aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g ($p < 0,0001$ au temps d'exposition M3 et $< 0,01$ au temps d'exposition M6, et $p < 0,01$ au temps d'exposition M3 et $< 0,0001$ au temps d'exposition M6, respectivement) (**Figure 42**).

Il est important de noter qu'il n'existe aucune variation statistiquement significative de l'IL-1 α chez les souris exposées aux particules de silice amorphe, quels que soient la taille de la particule, la dose administrée ou le temps d'exposition (**Figure 42**).

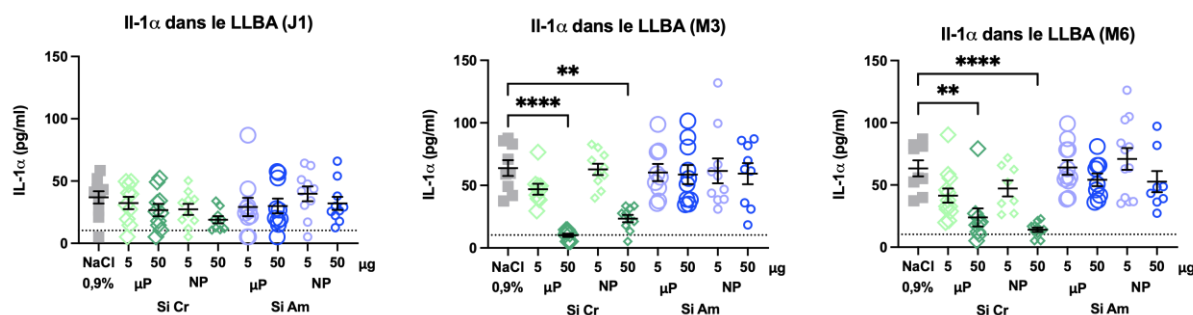


Figure 42 : Quantification de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 α (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex[®] chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 μ g ou 50 μ g de microparticules (μ P) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

** $p < 0,01$ et **** $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

V.2.2.3.4.6 Cytokines pro-inflammatoires de la famille dite de l'interleukine 2

Les interleukines IL-2 et IL-9 sont des cytokines pro-inflammatoires jouant un rôle pour la première dans la prolifération des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et pour la seconde anti-apoptotique.

Au temps d'exposition J1, il n'existe pas pour ces 2 cytokines de différence statistiquement significative, quel que soit le groupe d'exposition.

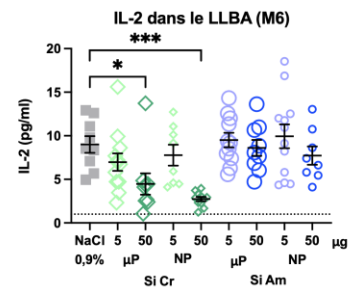
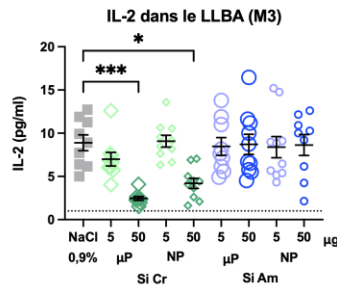
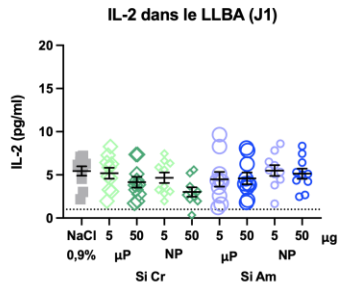
Néanmoins, aux temps d'exposition chronique M3 et M6, des diminutions statistiquement significatives de l'IL-2 et de l'IL-9 ont été retrouvées dans certains groupes de souris exposées aux particules de silice cristalline :

- En effet, il existe une diminution statistiquement significative de l'IL-2 chez les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 µg aux µP Si Cr aux temps d'exposition M3 et M6 ($p < 0,001$ et $p < 0,05$, respectivement) ou aux NP Si Cr aux temps d'exposition M3 et M6 ($p < 0,05$ et $p < 0,001$, respectivement) (**Figure 43A**).
- De même, il existe une diminution statistiquement significative de l'IL-2 chez les souris exposées à la dose hebdomadaire de 50 µg aux µP Si Cr au temps d'exposition M3 ($p < 0,001$) ou aux NP Si Cr aux temps d'exposition M3 et M6 ($p < 0,05$ et $p < 0,001$, respectivement) (**Figure 43B**).

Il est par ailleurs à noter que globalement il n'existe aucune variation statistiquement significative chez les souris exposées aux particules de silice amorphe, quels que soient la taille de la particule, la dose administrée ou le temps d'exposition (**Figures 43A et B**).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

A



B

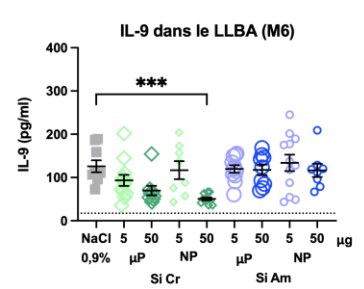
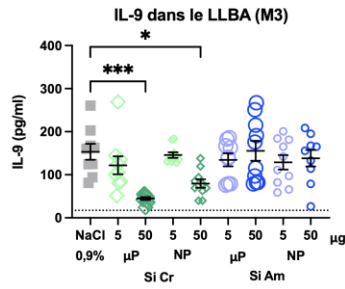
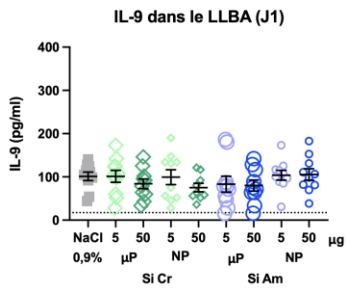


Figure 43 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-2 (**A**) et IL-9 (**B**) (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex® chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

* $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ par rapport au groupe témoin.

V.2.2.3.4.7 Cytokines pro-inflammatoires de la famille dite de l'interleukine 6

L'interleukine 6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire participant à l'inflammation *via* entre autres la maturation des lymphocytes B. Le facteur inhibiteur de leucémie LIF (Leukemia Inhibitory Factor) fait aussi partie de cette famille d'interleukine 6, mais son rôle dans l'inflammation pulmonaire n'a pas encore été totalement élucidé.

Dans le surnageant du LLBA, les cytokines IL-6 et LIF sont augmentées significativement dans certains groupes d'exposition et temps d'exposition :

L'interleukine IL-6 augmente de façon statistiquement significative de chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg aux trois temps d'exposition J1, M3 et M6 ($p < 0,0001$ pour les deux groupes d'exposition et aux trois temps d'exposition). Par ailleurs, à la dose hebdomadaire de 5 μg , il est observé, au temps d'exposition M6, une augmentation statistiquement significative chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ ($p < 0,05$). Concernant les souris exposées aux particules de silice amorphe, la seule augmentation statistiquement significative est observée chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Am}$ à la dose hebdomadaire de 50 μg uniquement au temps d'exposition J1 ($p < 0,05$) (**Figure 44A**).

L'expression du facteur de croissance LIF est uniquement augmentée de façon statistiquement significative chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ à la dose hebdomadaire de 50 μg au temps d'exposition M3 ($p < 0,0001$) (**Figure 44B**).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

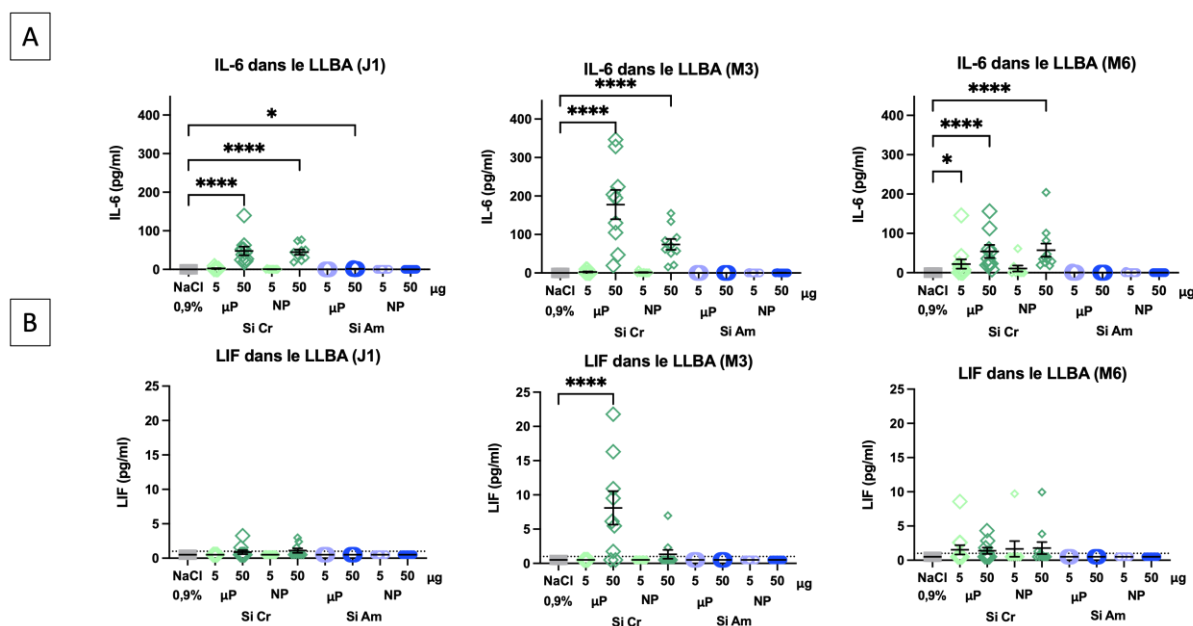


Figure 44 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-6 (A) et LIF (B) (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex[®] chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

* $p < 0,05$ et **** $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin.

V.2.2.3.4.8 Autres cytokines pro-inflammatoires

La protéine éotaxine (également appelée C-C motif ligand-11 ou CCL11) et RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted, également appelée CCL5) sont des molécules chémoattractantes permettant le recrutement par chimiotactisme de polynucléaires éosinophiles pour la première, et celui des monocytes sanguins et des lymphocytes T pour la seconde. L'interleukine IL-17 est quant à elle une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les lymphocytes T.

Au temps d'exposition J1, ces trois chimiokines ne sont pas détectées dans le surnageant du LLBA, quels que soient le type de particule, la taille de la particule et la dose instillée (Figure X). En revanche, aux temps d'exposition M3 et M6, des augmentations statistiquement significatives sont observées pour ces trois chimiokines dans certains groupes de souris exposées uniquement aux particules de silice cristalline.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

- Des augmentations statistiquement significatives de l'éotaxine sont observées chez les souris exposées aux μ P Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g au temps d'exposition M3 et M6 ($p < 0,0001$ et $p < 0,05$, respectivement pour les souris exposées aux μ P Si Cr, et $p < 0,05$ et $p < 0,0001$, respectivement pour les souris exposées aux NP Si Cr) (**Figure 45A**).
- Une légère augmentation statistiquement significative de la protéine RANTES est observée chez les groupes souris exposées aux μ P Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μ g aux temps d'exposition M3 et M6 ($p < 0,0001$ pour les deux groupes d'exposition au temps d'exposition M3 et $p < 0,001$ pour les deux groupes d'exposition au temps d'exposition M6) (**Figure 45B**).
- Une augmentation statistiquement significative de l'IL-17 est une sécrétion augmentée chez les souris exposées aux particules de silice cristalline à la dose hebdomadaire de 50 μ g aux temps d'exposition M3 et M6 ($p < 0,0001$ pour les souris exposées μ P Si Cr ou aux NP Si Cr quel que soit le temps d'exposition) (**Figure 45C**).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

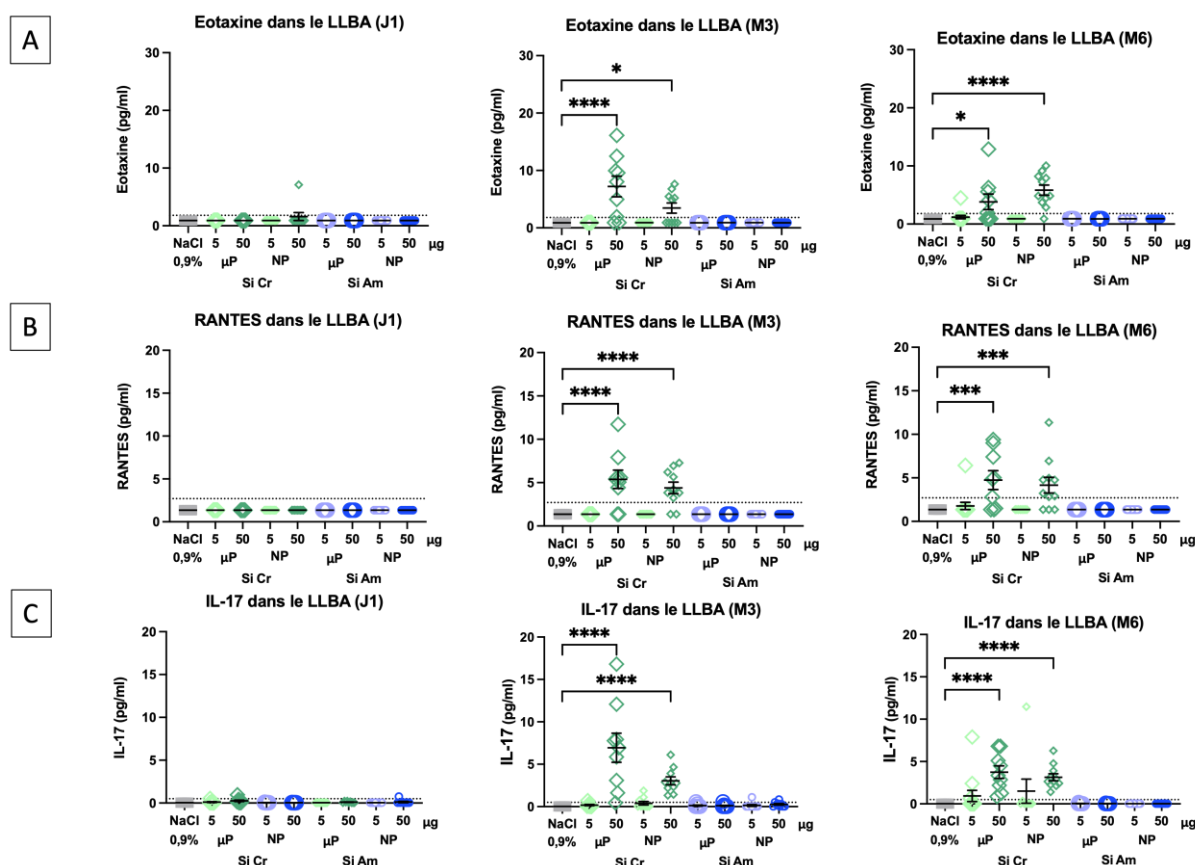


Figure 45 : Quantification des cytokines pro-inflammatoires éotaxine (A), RANTES (B) et IL-17 (C) (en pg/mL) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex® chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).
p<0,05, * p<0,001 et ****p<0,0001 par rapport au groupe témoin.*

Par ailleurs, les cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-12 (p40 et 70), IL-13, IL-15, M-CSG, MIP-1β et MIP-2 n'ont pas été détectées dans le surnageant du LLBA, quels que soient le groupe d'exposition ou le temps d'exposition, avec la méthodologie employée (Données non montrées).

V.2.2.3.5 Synthèse de la quantification des médiateurs pro-inflammatoires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

Les **tableaux 11 et 12** résument les principaux résultats en correspondance avec les données décrites précédemment sur la quantification des médiateurs pro-inflammatoires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire.

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

Tableau 11 : Synthèse de la quantification des médiateurs pro-inflammatoires dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex® chez des souris exposées de façon unique doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, 24h après une exposition unique (J1)

Groupes d'exposition	Facteurs de croissance hématopoïétiques et vasculaires	Cytokines de l'inflammation macrophagique	Cytokines de l'inflammation neutrophilique	Cytokines liées à l'interféron gamma	Cytokines de la famille de l'IL-1	Cytokines de la famille de l'IL-2	Cytokines de la famille de l'IL-6	Autres cytokines pro-inflammatoires
NaCl 0,9% ■	-	-	-	-	-	-	-	-
µP Si Cr 5 µg ◇	ns	ns	↑ KC (p<0,001)	ns	ns	ns	ns	ns
µP Si Cr 50 µg ◇	↑ G-CSF et GM-CSF (p<0,0001) ↑ VEGF (p<0,01)	↑ MIP-1α (p<0,001)	↑ KC et LIX (p<0,0001)	ns	ns	ns	↑ IL-6 (p<0,0001)	ns
NP Si Cr 5 µg ◇	ns	ns	↑ KC (p<0,01)	ns	ns	ns	ns	ns
NP Si Cr 50 µg ◇	↑ G-CSF (p<0,0001) ↑ VEGF (p<0,001)	↑ MIP-1α (p<0,0001)	↑ KC (p<0,0001) ↑ LIX (p<0,001)	ns	ns	ns	↑ IL-6 (p<0,0001)	ns
µP Si Am 5 µg ○	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
µP Si Am 50 µg ○	↑ G-CSF (p<0,001)	ns	↑ KC (p<0,05)	ns	ns	ns	↑ IL-6 (p<0,05)	ns
NP Si Am 5 µg ○	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NP Si Am 50 µg ○	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

Tableau 12 : Synthèse de la quantification des médiateurs pro-inflammatoires dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) par la technique du Luminex® chez des souris exposées de façon hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à l'issue des temps d'exposition de 3 et 6 mois (M3 et M6)

Groupes d'exposition	Facteurs de croissance hématopoïétiques et vasculaires		Cytokines de l'inflammation macrophagique		Cytokines de l'inflammation neutrophilique		Cytokines liées à l'interféron gamma		Cytokines de la famille de l'IL-1		Cytokines de la famille de l'IL-2		Cytokines de la famille de l'IL-6		Autres cytokines pro-inflammatoires							
	M3	M6	M3	M6	M3	M6	M3	M6	M3	M6	M3	M6	M3	M6	M3	M6						
NaCl 0,9% ■	-		-		-		-		-		-		-		-							
µP Si Cr 5 µg ◇	↑ VEGF (p<0,01)	(p<0,001)	↑ MCP-1 (p<0,01)		↑ KC (p<0,05)	(p<0,01)	ns	↑ MIG (p<0,05)	ns		ns		ns	↑ IL-6 (p<0,05)	ns							
µP Si Cr 50 µg ◇	↑ G-CSF (p<0,001)	(p<0,01)	↑ TNF-α et MCP-1 (p<0,0001)		↑ KC et LIX (p<0,0001)	ns	↑ MIG et IP-10 (p<0,0001) (p<0,001)		↓ IL-1α (p<0,0001) (p<0,01)		↓ IL-2 (p<0,001) (p<0,05)		↑ IL-6 (p<0,0001)		↑ éotaxine (p<0,0001) (p<0,05)							
	↑ VEGF (p<0,01)	(p<0,05)	↑ MIP-1α (p<0,01)				↓ IL-10 (p<0,05)		ns		↓ IL-9 (p<0,001) (p<0,01)		↑ LIF (p<0,0001)		ns		↑ RANTES (p<0,0001) (p<0,001)					
NP Si Cr 5 µg ◇	ns	↑ G-CSF et VEGF (p<0,05)	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns							
NP Si Cr 50 µg ◇	↑ G-CSF (p<0,01) (p<0,001)		↑ TNF-α et MCP-1 (p<0,0001)		↑ KC et LIX (p<0,0001)		↑ IFN-γ (p<0,05)		ns		↓ IL-1α (p<0,01) (p<0,0001)		↓ IL-2 et IL-9 (p<0,05) (p<0,001)		↑ IL-6 (p<0,0001)		↑ éotaxine (p<0,05) (p<0,0001)					
	↑ VEGF (p<0,001) (p<0,01)		↑ MIP-1α (p<0,001) (p<0,0001)				↑ MIG (p<0,0001)		↑ IP-10 (p<0,001)								ns		↓ IL-10 (p<0,01)		↑ RANTES (p<0,0001) (p<0,001)	
	ns		ns				ns		ns								ns		ns		↑ IL-17 (p<0,0001)	
µP Si Am 5 µg ○	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns							
µP Si Am 50 µg ○	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns							
NP Si Am 5 µg ○	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns							
NP Si Am 50 µg ○	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns							

V.2.2.3.6 Quantification des macrophages alvéolaires en immunohistochimie dans le parenchyme pulmonaire

Aux temps d'exposition chronique M3 et M6, il existe une augmentation statistiquement significative du nombre de macrophages alvéolaires dans le parenchyme pulmonaire des souris exposées aux μP Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg ($p < 0,05$ pour les deux groupes d'exposition au temps d'exposition M3 et $p < 0,001$ pour les deux groupes d'exposition au temps d'exposition M6) (**Figure 46**).

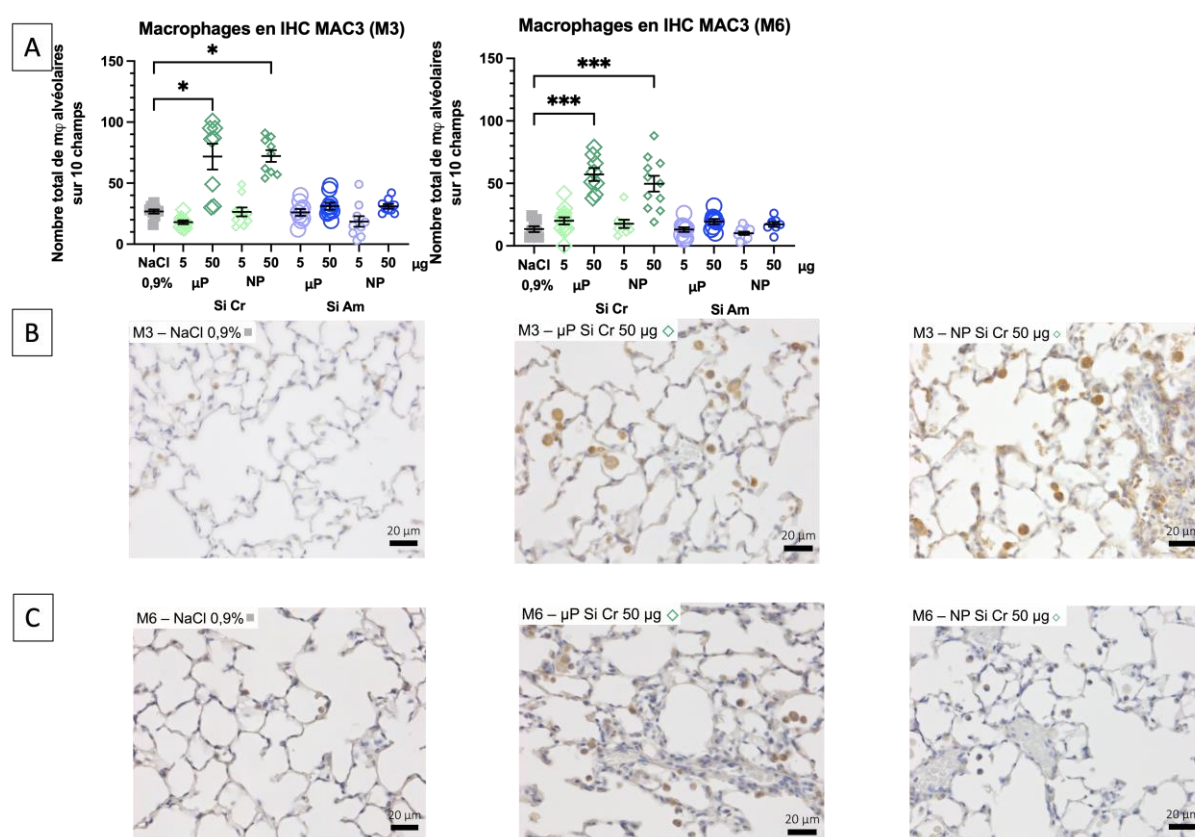


Figure 46 : Quantification des macrophages alvéolaires marqués par la protéine MAC-3 en immunohistochimie chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 μg ou 50 μg de microparticules (μP) ou nanoparticules (NP) de SiO_2 cristalline (Si Cr) ou de SiO_2 amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à deux temps d'exposition (M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

Quantification du nombre total de macrophages alvéolaires sur 10 champs aléatoires aux temps M3 et M6 (**A**). Clichés représentatifs de l'immunomarquage MAC-3 des macrophages alvéolaires observés (marquage marron) chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 50 μg de microparticules (μP) ou nanoparticules (NP) de SiO_2 cristalline (Si Cr) et à NaCl 0,9% pour les groupes témoins, en microscopie optique (grossissement : X400, échelle = 20 μm) aux temps M3 (**B**) et à M6 (**C**).

** $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ par rapport au groupe témoin.*

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

V.2.2.3.7 Quantification de la cytolysé dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire

L'activité de la LDH dans le surnageant du LLBA augmente de façon statistiquement significative, témoignant d'une cytolysé, au temps d'observation J1 uniquement chez les souris exposées aux μP Si Am à la dose unique de 5 μg . De façon chronique, une légère augmentation statistiquement significative est présente uniquement au temps d'exposition M6 chez les souris exposées aux μP Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg ($p < 0,05$ pour ces deux groupes d'exposition) (**Figure 47**).

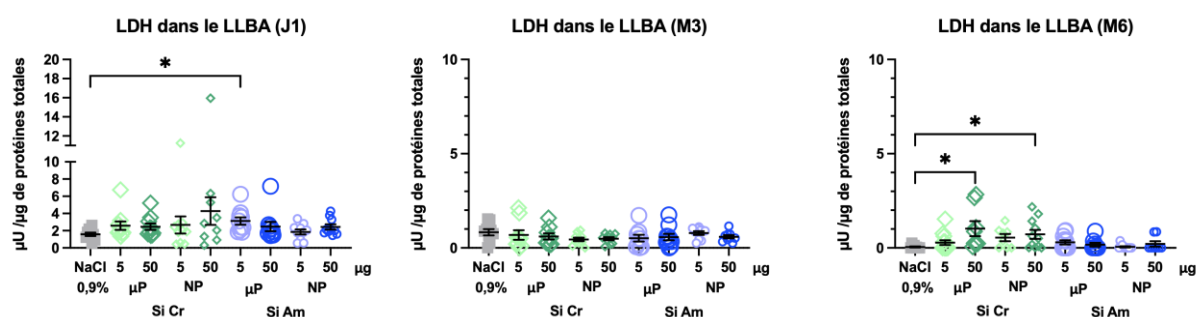


Figure 47 : Cytolyse évaluée par l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) (en $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ de protéines totales) dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 μg ou 50 μg de microparticules (μP) ou nanoparticules (NP) de SiO_2 cristalline (Si Cr) ou de SiO_2 amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

* $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin.

V.2.2.4 Analyse du remodelage pulmonaire

V.2.2.4.1 Quantification de l'expression protéique du TGFβ-1 dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et du collagène soluble dans un extrait pulmonaire digéré

Aux temps d'exposition M3 et M6, des augmentations statistiquement significatives de l'expression de la protéine TGF-β1 sont observées chez les souris exposées aux particules de silice cristalline à la dose hebdomadaire de 50 µg ($p < 0,05$ pour le temps M3 pour les souris exposées aux µP Si Cr, et $p < 0,0001$ pour le temps d'exposition M6 pour les souris exposées aux µP Si Cr et aux NP Si Cr) (**Figure 48**). Il est à noter qu'il existe, au temps d'exposition M3, une tendance non significative à l'augmentation chez les souris exposées aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 µg comme en témoigne la **Figure 48A**.

De façon étonnante, il est à noter qu'au temps d'exposition J1 seulement, l'expression de la protéine TGF-β1 dans le LLBA diminue de manière statistiquement significative chez les souris exposées aux µP Si Cr à la dose hebdomadaire de 5 µg ($p < 0,01$) (**Figure 48A**).

Parallèlement, la concentration en collagène soluble dans le broyat du lobe caudal du poumon droit est augmentée de façon statistiquement significative uniquement au temps d'exposition M3 chez les souris exposées aux µP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 µg ($p < 0,01$) (**Figure 48B**).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

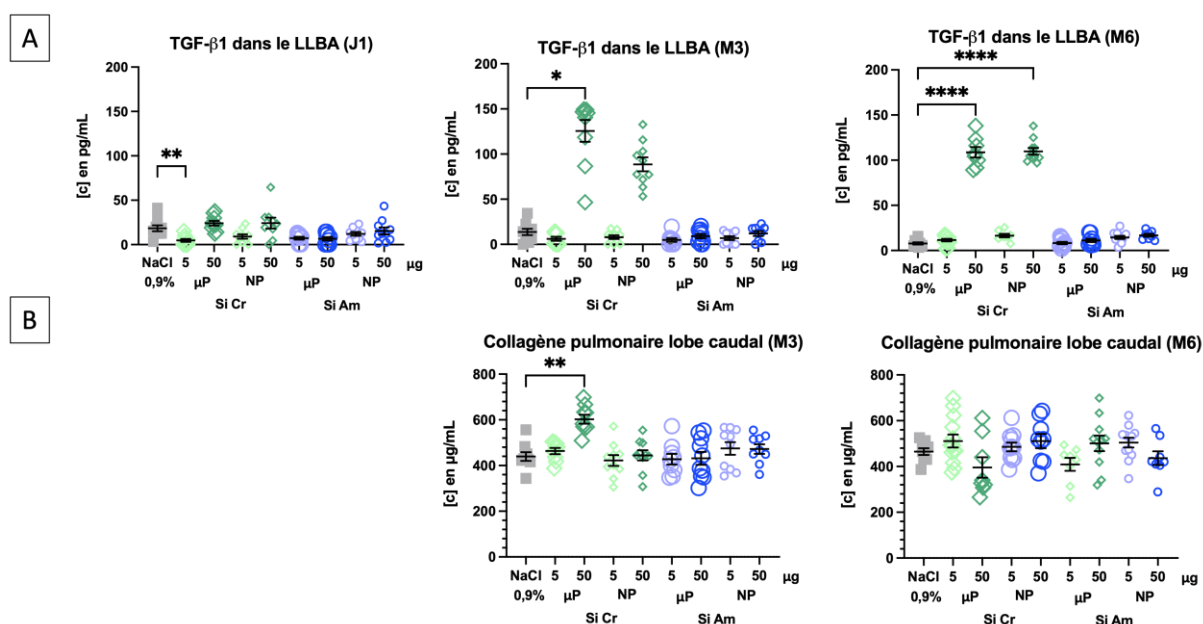


Figure 48 : Quantification de la cytokine TGF-β1, marqueur précoce de fibrose pulmonaire, dans le surnageant du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) (en pg/mL) par ELISA chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 μg ou 50 μg de microparticules (μP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois) (A). Quantification du collagène soluble pulmonaire par la technique de dosage de Sircol dans le broyat du lobe caudal du poumon droit chez ces mêmes groupes de souris au temps d'exposition M3 et M6 (B).
p<0,05, ** p<0,01 et **p<0,0001 par rapport au groupe témoin.*

Ainsi, ces données biologiques montrent qu'il existerait un début de processus pro-fibrosant pulmonaire uniquement aux temps d'exposition M3 et M6 chez les souris exposées aux μP Si Cr et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg.

V.2.2.4.2 Étude histologique morphométrique du remodelage pulmonaire

Globalement, il n'existe pas de différence statistiquement significative concernant les deux analyses morphométriques des structures pulmonaires effectuées au cours de ce travail, que ce soit par l'étude morphologique des structures alvéolaires par la mesure de la MLI (**Figure 49A**) ou par l'analyse de la morphologie des bronchioles en mesurant l'épaisseur de la paroi bronchiolaire (**Figure 49B et C**), ceci quels que soient le type de particules, la dose administrée ou le temps d'exposition (M3 ou M6).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Résultats

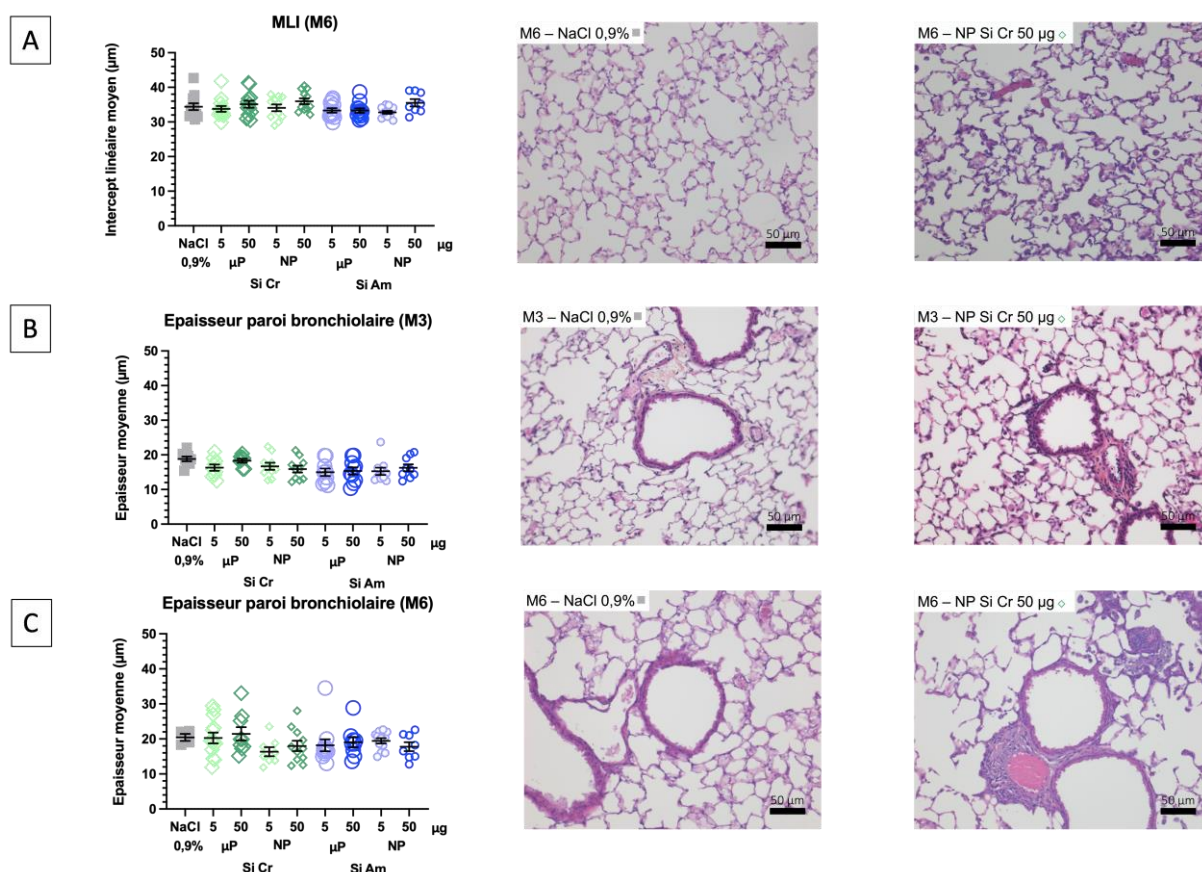


Figure 49 : Analyses histologiques morphométriques du parenchyme pulmonaire. A gauche : Résultats des mesures de l'intercept linéaire moyen (MLI) à M6 (A) et de l'épaisseur de la paroi bronchique chez des souris exposées à M3 (B) et M6 (C). A droite : Clichés représentatifs des coupes histologiques colorées en hématoxyline et éosine (H&E) et observés en microscopie optique (grossissement : X200, échelle = 50 µm). Ces analyses ont été réalisées sur les coupes de poumon des chez des souris exposées de façon unique ou hebdomadaire aux doses de 5 µg ou 50 µg de microparticules (µP) ou nanoparticules (NP) de SiO₂ cristalline (Si Cr) ou de SiO₂ amorphe (Si Am) et à du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les groupes témoins, à trois temps d'exposition (J1 : 24h, M3 : 3 mois, M6 : 6 mois).

Volet PURESNOW-BIO
Étude expérimentale PURESNOW-BIO
Synthèse des résultats du volet PURESNOW-BIO

V.2.3 Synthèse des résultats du volet PURESNOW-BIO

Globalement, les processus inflammatoires et de remodelage étudiés au cours du volet PURESNOW-BIO font ressortir les éléments suivants :

- Des processus d'inflammation macrophagique et neutrophilique qui ont été mis en évidence quasiment exclusivement chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg et dans une moindre mesure pour la dose hebdomadaire de 5 μg avec pour l'inflammation macrophagique, une augmentation de $\text{TNF-}\alpha$, MCP-1 et $\text{MIP-1}\alpha$ et pour l'inflammation neutrophilique, une augmentation de KC et LIX . De plus, il existe une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le LLBA au détriment des macrophages, alors que le nombre total de macrophages alvéolaires observés est significativement plus important aux temps d'exposition M3 et M6 chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg .
- Il existe un phénomène de cytolysse uniquement au temps M6 chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg .
- Il existe un début de processus de fibrose pulmonaire uniquement aux temps d'exposition M3 et M6 chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Cr}$ et aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 μg . Néanmoins, les analyses morphométriques des structures alvéolaires et bronchiolaires n'ont distingué aucune différence quels que soient le type de particules, la dose administrée et le temps d'exposition.
- Il n'existe quasiment aucun phénomène inflammatoire ou de remodelage chez les souris exposées aux particules de silice amorphe quels que soient la taille des particules, la dose administrée et le temps d'exposition. En revanche, de façon étonnante, une cytolysse est observée uniquement chez les souris exposées aux $\mu\text{P Si Am}$ à la dose hebdomadaire de 5 μg .

VI Discussion

Ce travail de thèse visait à mieux comprendre le remodelage et l'inflammation pulmonaire après exposition à des micro- et nanoparticules de silice chez des travailleurs du BTP. Ce chapitre de discussion est constitué de discussions spécifiques pour chacun des 3 volets successifs, le volet métrologique PURESNOW-METRO, le volet clinique rétrospectif chez l'Homme PURESNOW-RETRO et le volet expérimental chez la souris PURESNOW-BIO, et puis d'une discussion générale sur les principaux résultats comparant, d'une part, les effets toxiques de chaque lot de particules néosynthétisées chez l'animal, d'autre part, les effets pulmonaires chez l'Homme et l'animal et enfin les impacts potentiels des résultats de la thèse sur la réglementation.

VI.1 Discussion par volet

VI.1.1 Volet PURESNOW-METRO

Le volet métrologique PURESNOW-METRO avait pour objectif d'améliorer les connaissances sur la métrologie des nanomatériaux à base de silice cristalline et amorphe dans le secteur du BTP. Pour cela, une stratégie dite multi-étapes, comprenant des mesures en temps réel d'aérosols particulaires provenant de matériaux contenant de la silice sur le terrain soumis à un outil de chantier à haute énergie et des analyses en temps différé après collecte des particules émises, a permis d'obtenir des données métrologiques de terrain en vie réelle. Grâce à une meilleure caractérisation physico-chimique des aérosols particulaires contenant de la silice, notamment sur la fraction nanométrique, ces données viennent compléter les connaissances actuelles dans le secteur du BTP qui sont uniquement réalisées en respect de la réglementation qui ne prévoit pas la mesure de cette fraction (10,90).

L'analyse de la littérature et les enquêtes auprès des professionnels du BTP en étape n°1 nous ont permis de sélectionner 9 situations d'exposition très émissives dans chaque secteur du BTP. La plupart de ces situations ont pu être explorées dans les étapes n°2 (screening) et 3 (campagnes ciblées), avec au total 33 tâches réparties de la manière suivante :

Discussion

Discussion par volet

- Dans le secteur « structure et gros œuvre » : la découpe de matériaux (n=3 lors du screening et n=3 lors des campagnes ciblées), la préparation du béton ou du mortier (n=0), la pulvérisation de béton ou de mortier (n=1 lors du screening et n=1 lors des campagnes ciblées) et le ponçage ou percements du béton (n=2 lors du screening et n=2 lors des campagnes ciblées).
- Dans secteur du second œuvre : la découpe de tuiles (n=7 lors du screening et n=2 lors des campagnes ciblées), la découpe de carrelage (n=3 lors du screening) et la découpe ou finition de plans de travail en pierre reconstituée (n=0).
- Dans le secteur des Travaux Publics : la découpe de bordures (n=5 lors du screening et n=4 lors des campagnes ciblées).

Ces 33 tâches mesurées ont donc permis de colliger des données sur la majorité des situations d'exposition repérées comme étant très émissives. La plupart des chantiers auxquels nous avons pu avoir accès ont résulté de contacts déjà bien établis entre des petites et moyennes entreprises (PME) du BTP et les services de prévention et de santé au travail dans les Hauts-de-France et la CRAMIF en région parisienne. Néanmoins, il est à noter que parmi ces 9 situations, 2 d'entre elles n'ont pu aboutir à un recueil de données sur le terrain sur lesquelles nous allons revenir ci-dessous.

D'une part, dans le secteur « structure et gros œuvre », la **fabrication du ciment en cimenterie ou préparation du béton ou du mortier dans une centrale à béton** faisait partie des situations retenues afin de mieux comprendre les aérosols particuliers émis lors de la préparation de ces matériaux hautement complexes et pouvant contenir une teneur plus ou moins importante en silicium sous forme de silice (SiO_2) et de silicates en fonction des propriétés recherchées. Cependant, il n'a pas été possible d'avoir accès à ces types d'activités malgré nos tentatives d'approche de ces industries.

D'autre part, dans le secteur du second œuvre, **la découpe ou finition de plans de travail en pierre reconstituée** était également ciblée, ce d'autant qu'il existe une émergence depuis quelques années de silicoses aiguës rapportée dans la littérature (31–33) mais aussi dans le but d'apporter des éléments de réponse identifiés comme manquants dans le rapport d'expertise de l'ANSES (10). Nous n'avons pas pu accéder à ce type d'activité, car elle est peut

Discussion

Discussion par volet

fréquente à grande échelle en France. En effet, ce type de matériau arrive sur le territoire très souvent prêt à être posé, notamment pour les plans de travail de cuisine ou encore des revêtements dans les salles de bain. La découpe de ces matériaux est réalisée en Europe du Sud (Espagne, Italie et Portugal), ce qui explique potentiellement le recensement et le signalement de silicozes aigus dans ces pays et pas en France (31). Cependant, dans la littérature, deux études métrologiques récentes peuvent néanmoins apporter certains éléments de réponse quant à la caractérisation de ces types d'aérosols émis lors de la mise en œuvre de ces pierres reconstituées.

La première étude italienne et américaine a été réalisée lors d'opérations de découpe et de broyage mécanique de 3 échantillons de pierres reconstituées différentes et un échantillon de granit naturel en salle blanche (104). Ces travaux ont démontré d'une part que 2 des 3 échantillons de pierres reconstituées ont des teneurs en silice plus élevées en comparaison au granit naturel (91% pour deux d'entre elles *versus* 31% pour le granit). D'autre part, que l'aérosol généré lors de la découpe et du broyage de ces pierres reconstituées contient des concentrations en silice plus élevées en nombre de nanoparticules.

La seconde étude australienne vient compléter les données de caractérisation de l'étude précédente (105). Sur le même principe, une métrologie a été réalisée en salle blanche suite à des coupes à sec de 12 échantillons de différentes pierres reconstituées et 3 échantillons de pierres naturelles : granit blanc, granit noir et marbre. La caractérisation de l'aérosol a mis en évidence la présence de silice cristalline dans sa fraction alvéolaire (sous forme de quartz et de cristobalite) plus importante de l'ordre d'au moins 80% lors de la découpe des pierres reconstituées contre 4 à 30% pour les granits et le marbre. De plus, la caractérisation a révélé que les particules présentes dans les aérosols émis à partir de pierres reconstituées avaient globalement une surface spécifique plus importante que celles présentes dans les aérosols émis à partir de pierres naturelles.

Ainsi, ces deux études métrologiques récentes viennent apporter des éléments qui pourraient expliquer une toxicité plus importante des aérosols émis à partir de pierre reconstituée. En effet, cette toxicité pourrait être expliquée par la grande quantité de nanoparticules générées mais aussi par la réactivité de surface plus importante que pour d'autre matériaux tels que le granit ou le marbre (5,28).

Ce travail de thèse va plus loin dans la caractérisation de la fraction alvéolaire des aérosols particuliers émis lors de la mise en œuvre de matériaux non nanostructurés. En effet, ce

Discussion Discussion par volet

travail montre pour la première fois que les NP émises lors d'une découpe à sec de matériaux non nanostructurés contenant de la silice cristalline, sont bien composées de Silicium et qu'elles gardent une structure cristalline, ce qui n'avait pas été montré auparavant, signant ainsi que ces NP sont très probablement constituées de silice cristalline, avec toute fois semble-t-il une faible concentration massique et en nombre. De façon intéressante, il a été montré que la surface de la silice cristalline (notamment le quartz) est modifiée au cours de sa formation par des molécules d'H₂O notamment avec un phénomène de dissolution et d'amorphisation de surface, ceci à l'échelle micrométrique mais aussi nanométrique (106).

Dans la littérature, à ce jour, une seule étude expérimentale a regardé les effets toxiques pulmonaires d'un nanoquartz de synthèse (manufacturé à l'humide par une méthode hydrothermale) chez le rat (57,107). La quasi-absence de données toxicologiques dans la littérature nous a confortés dans la nécessité d'étudier l'implication éventuelle des micro- et nanoparticules de silice cristalline ou amorphe dans l'inflammation et le remodelage pulmonaires lors d'expositions répétées à des doses réalistes et représentatives des aérosols présents dans le secteur du BTP.

VI.1.2 Volet PURESNOW-RETRO

Le volet rétrospectif PURESNOW-RETRO avait pour objectif d'étudier les effets inflammatoires et le remodelage pulmonaire de la silice cristalline chez des travailleurs du BTP exposés au moins 10 ans, comparés à des sujets témoins non exposés appariés, et explorer *in situ* une éventuelle co-localisation des éléments Silicium (Si) et des lésions pulmonaires.

Chez l'Homme, les analyses histologiques réalisées à l'aide de scores semi-quantitatifs ont mis en évidence notamment la présence d'une fibrose péribronchiolaire et d'une fibrose périvasculaire chez tous les patients exposés à la silice (n=18) et chez tous les sujets témoins non exposés professionnellement (n=18). En revanche, de façon intéressante, la sévérité de la fibrose péribronchiolaire et de la fibrose périvasculaire était plus importante chez les travailleurs exposés à la silice cristalline comparativement aux sujets témoins non exposés. Dans ces zones de fibroses péribronchiolaires et périvasculaires, le nombre moyen de PMR était également augmenté significativement chez les travailleurs exposés à la silice cristalline par rapport aux sujets témoins non exposés. Lors de travaux antérieurs de l'équipe, une approche similaire avait été utilisée chez des travailleurs exposés à des fumées de soudage et

Discussion

Discussion par volet

issus de la même cohorte initiale (108). Dans cette étude comportant 21 soudeurs et 21 sujets témoins non exposés appariés sur l'âge, l'exposition antérieure à l'amiante et le tabagisme, les analyses histologiques avec une approche méthodologique similaire avaient pu mettre en évidence une présence similaire d'une fibrose péribronchiolaire chez les soudeurs et chez les sujets témoins non exposés. Là encore, le score de sévérité semi-quantitatif de la fibrose péribronchiolaire s'était révélé plus important chez les sujets soudeurs par rapport aux sujets témoins non exposés. En revanche, concernant la fibrose périvasculaire, il est à noter que celle-ci était significativement plus retrouvée chez les sujets soudeurs par rapport aux sujets témoins non exposés, avec, de plus, un score semi-quantitatif de sévérité significativement plus importante chez les sujets soudeurs que chez les sujets témoins non exposés. Ainsi, ces deux études suggèrent qu'une exposition professionnelle à des tâches exposant à des aérosols de silice ou à des fumées de soudage pourraient constituer un facteur aggravant de la fibrose péribronchiolaire et périvasculaire. Un seul article basé sur des analyses anatomo-pathologiques et scannographiques de patients ardoisiers exposés à la silice et atteints d'une pneumoconiose mixte rapporte des lésions fibrotiques péribronchiolaires et périvasculaires (109). Dans la littérature, la silicose pulmonaire est caractérisée par une fibrose réticulo-nodulaire, liée un processus inflammatoire avec initialement une alvéolite macrophagique avec la libération de médiateurs (notamment chémoattractants des polynucléaires neutrophiles), de radicaux libres endogènes et d'enzymes, associée à la formation de radicaux libres endogènes et contenus dans les cristaux de silice (notamment des molécules de SiO_2 , SiO^\cdot). Ces mécanismes inflammatoires aboutissent d'une part à la destruction des cellules alvéolaires et à la prolifération des fibroblastes avec une production accrue de collagène et *in fine* la formation de nodule ou granulome fibrohyalin avec un centre acellulaire comportant une particule biréfringente de silice cristalline. Ce syndrome micronodulaire prédominant aux apex pulmonaires et visible à l'imagerie thoracique (à la radiographie thoracique standard ou au scanner thoracique). A ces lésions, peut-être associée également une fibrose prédominant dans le tissu interstitiel en périlymphatique (34,110). Notre étude rétrospective chez l'Homme n'a pas observé de granulome ou nodules silicotiques sur les coupes histologiques chez les patients exposés à la silice ou chez tous les sujets témoins non exposés professionnellement. Même si nos analyses histologiques ne sont pas exhaustives de l'ensemble du parenchyme pulmonaire, ceci s'explique parfaitement par le fait que les patients exposés à la silice

Discussion

Discussion par volet

professionnellement n'avaient pas de silicose pulmonaire connue ou radiologique à la lecture de leur examen tomodensitométrique thoracique.

Le Silicium est un élément chimique ubiquitaire dans les poumons en population générale. En effet, une fraction très importante des particules inhalées par tout à chacun comporte du Silicium (Si), tels que dans la silice cristalline ou amorphe, ou les silicates, notamment. Une étude française chez l'Homme, comportant des analyses minéralogiques à la recherche de particules minérales non fibreuses dans des LLBA, a permis de montrer d'une part l'importance de la biopersistance des particules minérales (peu solubles, comme le quartz, les micas, les feldspaths) à plusieurs années voire dizaine d'années dans le poumon, mais aussi l'importance de la fraction de particules minérales contenant du Si (silice cristalline ou amorphe, silicates, etc) estimée en moyenne à 2/3 de l'ensemble des particules, avec en particulier environ 17% de silice cristalline et 5% de silice amorphe (111). Malgré le caractère ubiquitaire du Silicium dans les poumons chez l'Homme, il a été décidé d'effectuer des microanalyses de caractérisation physico-chimique au Synchrotron SOLEIL sur la ligne LUCIA. Afin de vérifier s'il existe une co-localisation entre les lésions pulmonaires observées à l'histologie et la présence de particules comportant des éléments chimiques Si dans des zones de remodelage pulmonaire (fibrose péribronchiolaire, périvasculaire et alvéolaire), des analyses ont été réalisées en microfluorescence X (μ XRF) sur des coupes de poumon de cas exposés et de sujets témoins. La μ XRF a permis de confirmer que le Si est préférentiellement retrouvé dans les zones de fibrose que ce soit chez les cas et les sujets témoins. Précédemment, dans l'étude rétrospective chez des travailleurs identifiés comme exposés à des fumées de soudage, les analyses effectuées en μ XRF mettaient aussi en évidence la co-localisation de NP d'oxydes métalliques (tels que les oxydes de Fe, Mn ou Cr) issues des fumées de soudage avec les zones de fibrose (108).

La ligne LUCIA est également équipée d'un μ XANES (X-ray absorption near edge) permettant d'étayer la spéciation d'un élément chimique, c'est-à-dire de renseigner le type de liaison chimique de cet élément chimique en fonction de son environnement, grâce des spectres caractéristiques de ces différents états par une analyse spectroscopique par micro-absorption des rayons X permettant de comparer a priori la présence de Si dans des minéraux différents chez les cas et les sujets témoins (94). Dans les zones histologiques présentant un

Discussion

Discussion par volet

fort signal de Si identifié sur les différentes cartographies obtenues en μ XRF (500 X 500 μ m), les analyses de la spéciation du Si au seuil de Si (1,9keV) a permis de détecter des deux types de profils de spectres μ XAS très différents entre les deux populations de cas et témoins. Malheureusement, à ce stade, en raison de l'absence d'une banque de référence de spectres pour le Si au seuil de Si disponibles dans la littérature ou au synchrotron SOLEIL, les analyses précises de la spéciation de Si n'ont pas pu à ce stade être déterminées pour ces 12 échantillons pulmonaires analysés. En effet, les seuls spectres retrouvés dans la littérature au seuil du Si sont ceux des polymorphes de la silice cristalline : quartz, tridymite et cristobalite. Les auteurs des publications soulignent que des travaux supplémentaires sont nécessaires en associant un recueil important de données associées à des calculs théoriques pour établir un lien correct entre les spectres obtenus par XANES et chaque structure de silice (SiO_2) et/ou de silicates (112–114). La création d'une telle banque de spectres de référence va être proposée au Synchrotron pour les principaux minéraux contenant du silicium à partir d'échantillons de substances minérales pures contenant du Si. Cette banque de référence permettrait d'avoir un profil minéralogique plus précis en fonction des expositions professionnelles et/ou environnementales à la silice cristalline (quartz, tridymite, cristobalite), mais aussi à la silice amorphe, aux talcs, aux alumino-silicates (micas dans le granit et feldspath dans le carrelage par exemple), de phyllosilicates (chrysotile ou amiante blanche), d'amphiboles (crocidolite ou amiante bleue), mais aussi d'autres matériaux couramment employés (laine de verre par exemple).

Discussion

Discussion par volet

VI.1.3 Volet PURESNOW-BIO

Le volet biologique PURESNOW-BIO avait pour objectif d'étudier les effets inflammatoires et le remodelage pulmonaire de la silice cristalline chez des souris Wild-Type C57BL6 exposées par aspirations oro-pharyngées uniques (observation après 24h) ou répétées jusqu'à 3 et à 6 mois (observation post-exposition 1 semaine) à des doses réalistes de particules de silice cristalline ou amorphe, à une taille micrométrique ou nanométrique.

Le volet PURESNOW-METRO a montré l'existence d'authentiques NP de silice cristalline produites de façon non intentionnelle après usage d'outils rotatifs à haute énergie sur des matériaux non nanostructurés comportant de la silice cristalline. Ainsi, du fait de l'absence de NP de silice cristalline sur le marché, il a été décidé de constituer 4 lots de particules de silice cristalline ou amorphe de taille nanométrique ou micrométrique.

Afin d'accomplir cet objectif, nous avons établi une collaboration avec le Pr Corinne Chanéac du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, Sorbonne-Université, pour mettre au point la néosynthèse complexe *de novo* et à façon de particules de silice cristalline et amorphe de taille micrométrique (1 μm) et nanométrique (100 nm) permettant d'avoir des lots issus du même laboratoire (12,115). Cette néosynthèse de NP de silice cristalline a été un défi technique à partir d'une seule publication disponible dans la littérature sur la synthèse de cette NP (116). La difficulté a été liée essentiellement au maintien de la stabilité des NP de silice sous sa forme cristalline en évitant toute amorphisation au cours du processus de synthèse. Après plusieurs mois de mise au point, le défi a été relevé avec une vérification de sa stabilité dans le temps de ces NP de silice cristalline. La mise au point de cette néosynthèse complexe a conditionné le démarrage du volet PURESNOW-BIO.

L'expérimentation animale chez des souris exposées de façon répétée (hebdomadaire) aux micro- ou nanoparticules de silice cristalline ou amorphe au cours de 3 temps d'exposition (24h, 3 mois et 6 mois), a permis de mettre en évidence des processus inflammatoires pulmonaires et une initiation biologique d'un remodelage pulmonaire.

En effet, tout d'abord, une inflammation pulmonaire macrophagique et neutrophilique a été mise en évidence chez quasiment toutes les souris exposées de façon hebdomadaire à des doses réalistes de 50 μg (dans une moindre mesure pour la dose de 5 μg) de micro- et

Discussion

Discussion par volet

nanoparticules de silice cristalline. En premier lieu, l'inflammation pulmonaire macrophagique est fortement corrélée à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le LLBA, telles que le TNF- α , MCP-1 et MIP-1 α , lors des temps d'exposition chronique de 3 et 6 mois. Dans la littérature, une augmentation de ces mêmes cytokines a été montrée mais uniquement lors de temps d'exposition plus précoces (phase aiguë) ; de plus, il est à noter que les doses employées dans ces études étaient aussi plus élevées que notre étude qui montre que ces cytokines sont sécrétées lors de doses réalistes et répétées jusqu'à 6 mois (117–122). En second lieu, l'inflammation pulmonaire neutrophilique était présente dans le LLBA, quant à elle, dès la phase aiguë (après 24h) avec une persistance jusqu'à 6 mois en association avec une augmentation statistiquement significative des cytokines KC (chémoattractants des polynucléaires neutrophiles), mais aussi de la protéine LIX. Ces éléments sont concordants avec la littérature puisque de nombreuses études expérimentales rapportent une augmentation de ces cytokines pro-inflammatoires directement en lien avec l'augmentation de la population de polynucléaires neutrophiles dans le poumon (117,119,122–124).

De façon étonnante, la sécrétion de la cytokine IL-1 β n'était pas significativement augmentée quel que soit le groupe d'exposition par rapport au groupe de souris non exposées. Pourtant, de nombreuses études expérimentales *in vivo* mais aussi *in vitro* rapportent l'augmentation de l'IL-1 β avec une activation de la voie de l'inflammasome NLRP3. Cette voie de signalisation figure en effet parmi les voies majoritaires impliquées dans la toxicité des particules micrométriques de silice cristalline (125). Cependant, ce mécanisme biologique ne semble pas être impliqué lors d'exposition à de faibles doses de particules de silice comme le montre notre étude. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait particulièrement intéressant d'étudier l'expression des protéines et ARN messagers des gènes impliqués dans la voie de l'inflammasome (NLRP3, caspase-1 et IL-1 β), mais aussi l'activité de la caspase-1 comme il a pu être réalisé dans la littérature *in vivo* (126,127) et *in vitro* sur des lignées cellulaires de macrophages et de cellules épithéliales (127,128). Pour aller plus loin, une étude expérimentale chez des souris KO pour les gènes NLRP3, caspase-1 et/ou IL-1 β permettrait également de répondre à l'implication ou non de l'inflammasome à de faibles doses réalistes et répétées.

Dans notre étude, il existe un phénomène de cytolysse uniquement chez les souris exposées de façon répétée à des doses réalistes (essentiellement de 50 μ g) de micro- et nanoparticules de silice cristalline pour une durée d'exposition de 6 mois. Dans la littérature,

Discussion

Discussion par volet

un relargage de LDH est pourtant détecté à des temps plus précoces, notamment en phase aiguë, mais là encore en employant des doses beaucoup plus élevées que notre étude (117,122,126).

Par ailleurs, il est à noter qu'il existe dans notre étude une initiation biologique d'un processus pro-fibrosant pulmonaire marqué par l'augmentation statistiquement significative de la protéine TGF- β 1, mais uniquement chez les souris exposées de façon répétée à des doses réalistes (essentiellement de 50 μ g) de silice cristalline, quelle que soit la taille. Ces éléments sont concordants avec la littérature puisque de nombreuses études rapportent l'augmentation du TGF- β 1 après une exposition à la silice (122,129–131). Néanmoins, contrairement à la littérature, notre étude n'a pas permis, lors des analyses morphométriques des structures alvéolaires et bronchiolaires, d'observer une différence concernant la présence d'une fibrose pérbronchiolaire ou de sa sévérité entre les souris exposées à la silice et les souris non exposées, quels que soient le type de particules de silice, la dose administrée et le temps d'exposition. Cependant, à ce stade, la fibrose périvasculaire n'a pas été encore étudiée.

Si l'on considère le type de structure spatiale (cristalline *versus* amorphe), il n'existe quasiment aucun phénomène inflammatoire et de remodelage chez les souris exposées aux particules de silice amorphe quels que soient la taille des particules, la dose administrée et le temps d'exposition. Ce point spécifique sera discuté dans la discussion générale.

Si le cœur de ce volet a consisté à étudier l'existence potentielle d'une inflammation et d'un remodelage pulmonaire, il serait éventuellement intéressant d'étudier également la cinétique de distribution spatiale et temporelle propre des particules de silice en fonction de la structure spatiale (cristalline *versus* amorphe) et/ou à la taille (micrométrique *versus* nanométrique), ainsi que les effets extra-pulmonaires afin de mieux les comprendre. Ainsi, afin d'étudier un éventuel passage dans la circulation systémique, le foie et les reins ont été prélevés et conservés à -80°C dans la tissuthèque. Ces organes étant respectivement impliqués dans le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques, il serait intéressant de quantifier l'élément Si retrouvé une fois ces organes digérés comme il a été fait lors de travaux antérieurs de l'équipe résultant d'une collaboration avec le CEREGE (Centre Européen de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement) grâce à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS ou Inductively Coupled Plasma Mass

Discussion

Discussion par volet

Spectrometry) (132). Comme toute technique de spectrométrie de masse, l'intérêt est d'utiliser le mouvement des ions d'un échantillon dans les champs électriques et magnétiques afin de classer les éléments présents au sein de cet échantillon en fonction de leur rapport masse sur charge. L'ajout de la technique à plasma à couplage inductif permet une plus grande précision des concentrations mesurées, y compris celles retrouvées en très faible quantité. En effet, certaines études suggèrent une translocation systémique plus importante des NP en comparaison avec des particules micrométriques, par exemple *via* la phagocytose macrophagique par la voie des caveolae, petites vésicules résultant de l'invagination de la membrane plasmique (3,25). Afin d'étudier un éventuel passage systémique *via* la circulation lymphatique, le-prélèvement des organes lymphoïdes a été possible pour la rate mais qui n'est pas sur le sens du flux de la lymphe du poumon profond vers la circulation systémique. Par ailleurs, il n'a pas été possible de prélever simplement les ganglions médiastinaux sur le modèle murin. En effet, malgré une publication claire sur la localisation des ganglions médiastinaux chez la souris, la pratique de ce prélèvement en routine n'a pu être mise au point par manque de caractérisation macroscopique spécifique liée à leur petite taille, mais aussi à leur localisation sous pleurale pouvant facilement être confondus avec du tissu adipeux chez des souris âgées de 8 mois comme celles utilisées dans notre étude au temps d'exposition de 6 mois, et également de la contrainte de temps lors de l'ensemble des prélèvements (133). Il est à noter que l'atteinte ganglionnaire thoracique, notamment médiastinale, est actuellement discutée comme faisant partie intégrante de la silicose chez l'Homme, avant l'apparition des nodules silicotiques et/ou d'une fibrose pulmonaire (35,36).

VI.2 Discussion générale

VI.2.1 Hypothèses à propos de la toxicité des 4 lots de particules de silice étudiées

Le volet PURESNOW-BIO a permis de montrer la présence d'inflammations pulmonaires neutrophiliques et macrophagiques de façon chronique (après 3 et 6 mois) chez des souris exposées de façon répétée à des doses réalistes hebdomadaires essentiellement de 50 µg de micro- et nanoparticules de silice cristalline. Il a été mis également en évidence par ailleurs un phénomène initial de fibrose sans mise en évidence de lésions histologiques avec une augmentation significative de la cytokine TGF-β1 chez des souris exposées aux micro- et nanoparticules de silice cristalline à la dose hebdomadaire de 50 µg après 6 mois d'exposition.

Ainsi, à la dose hebdomadaire de 50 µg équivalente à une concentration de particules dans l'air de 5 mg/m³ et sur les paramètres analysés, la toxicité pulmonaire de la forme cristalline à l'échelle nanométrique semble avoir un profil relativement comparable à celle observée à l'échelle micrométrique, mais avec semble-t-il un degré moindre en matière de sévérité. Cette similitude est également rapportée avec la seule étude expérimentale dans la littérature sur les effets pulmonaires des NP de quartz (12 et 50 nm) et des microparticules de silice cristalline (Min-U-Sil) et de quartz fin (0,5 et 0,3 µm respectivement) chez des rats exposés par voie intratrachéale à une dose unique de 1 ou 5 mg/kg avec un sacrifice et une observation à 24h, 1 mois ou 3 mois. A la suite d'une instillation intratrachéale unique de 5 mg/kg de nanoquartz chez les rats, la concentration en protéines totales dans le LLBA était significativement plus élevée après 24 h après une instillation unique à 1 mg/kg de nanoquartz, et après un mois lors d'une instillation unique à 5 mg/kg. De plus, une infiltration neutrophilique a été mise en évidence dans le LLBA après 1 mois. Par ailleurs, les nanoquartz ont induit de la cytotoxicité avec une augmentation statistiquement significative du taux de LDH dans le LLBA jusqu'à 3 mois après une instillation unique à 5 mg/kg de nanoquartz. Enfin, une inflammation macrophagique persistante a été observée sur les coupes de parenchyme pulmonaire (107).

En revanche, dans cette thèse, il n'existe aucun effet inflammatoire ou de remodelage notable chez les souris exposées aux particules de silice amorphe micrométrique ou nanométrique, quelle que soit la dose hebdomadaire administrée (5 ou 50 µg) ou la durée d'exposition (24h, 3 ou 6 mois). Pourtant, la revue de la littérature sur les effets pulmonaires

Discussion

Discussion générale

non tumoraux *in vivo* et *in vitro* de l'exposition à la silice cristalline et amorphe micro- ou nanométrique suggère l'existence d'une toxicité pulmonaire comparable entre les différentes formes de silice cristalline ou amorphe quelles que soient leurs tailles, avec notamment une présence d'une inflammation et d'un remodelage pulmonaire (57). Cependant, en regardant de plus près, il est néanmoins à noter que les lots de NP de silice amorphe utilisés dans ces études expérimentales, la toxicité pulmonaire rapportée ne concerne que des NP de silice amorphe synthétisées par voie thermique, telles que les NP de silices pyrogénées, fumées de silice ou silices à l'arc (124,134–137). Or, dans notre étude expérimentale du volet PURESNOW-BIO, les particules ont été synthétisées par la méthode de Stöber, qui est un procédé de synthèse par voie humide réputé pour produire des NP de silice amorphe de toxicité moindre. En effet, des études expérimentales ont comparé la toxicité des NP de silice amorphe synthétisées par différents procédés ont mis en évidence une toxicité plus importante pour les particules synthétisées par voie thermique *in vivo* et *in vitro* comparativement à celles produites à l'humide (56,124). Dans cette dernière étude, la plus grande toxicité des NP de silice amorphe obtenues par voie thermique (silice pyrogénée) *in vitro* comparativement aux NP de silice amorphe obtenues par voie humide (silice colloïdale ou de Stöber) serait expliquée par leur structure et leur chimie de surface (56). En effet, pour des NP de même tailles (16 nm), la silice pyrogénée utilisée dans cette étude possédait en surface une quantité de groupement hydroxyle (-OH) plus importante que la silice colloïdale. Ces groupements -OH, sont les constituants des silanols. Un silanol est composé d'un atome de silicium (Si) relié à un groupement hydroxyle (-OH) sous la conformation Si-OH. Selon les auteurs, ces silanols créeraient très facilement des liaisons H et des interactions électrostatiques avec la membrane plasmique des cellules, ce qui pourrait expliquer la plus grande toxicité des NP de silice amorphe produites par voie thermique. En effet, les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles sont des populations cellulaires les plus susceptibles d'être en contact des particules du fait de leur capacité à phagocyter. Ainsi, les silanols rentreraient en contact de façon préférentielle avec ses cellules, et plus particulièrement le sous-type appelé silanols « détachés » dit NFS (nearly free silanols). Une étude récente employant des particules de quartz enrichies ou appauvries en NFS, a montré que les particules de quartz enrichies en NFS entraîneraient 1) *in vitro* une membranolyse et une activité proinflammatoire sur la lignée THP-1 (human macrophage-like cells) et 2) *in vivo* une inflammation pulmonaire avec une augmentation des polynucléaires neutrophiles dans

Discussion

Discussion générale

le LLBA suite à une aspiration oro-pharyngée unique chez des rats exposés aux particules de quartz enrichies en NFS (63). Par la suite, les mêmes auteurs se sont focalisés sur les mécanismes à l'échelle moléculaire en regardant l'effet des particules de quartz enrichies en NFS sur différents modèles de membranes cellulaires ayant chacune une complexité moléculaire et une charge différente. Cette étude mécanistique a pu mettre en évidence qu'il existait des épitopes sélectifs (épitopes contenant un groupe amino-quaternaire positif et un groupe phosphate négatif) sur la membrane phospholipidique disponibles pour interagir avec les NFS en surface des particules de quartz (138). Ces études expérimentales récentes viennent remettre en question le paradigme selon lequel la structure cristalline serait la seule clé de la toxicité de la silice et la silice amorphe serait non toxique (61,62,139). Dans une autre étude, les mêmes auteurs avancent que le potentiel zêta (ζ) serait le reflet de l'état de protonation des silanols à la surface de la silice cristalline, et donc donner un indicateur de la probabilité qu'ont les silanols à perturber les membranes cellulaires (140). De cette manière, le potentiel ζ pourrait aussi être utilisé pour prédire la toxicité des particules de silice. *In fine*, l'étude de l'implication de la chimie de surface en lien avec les silanols est une hypothèse très intéressante pour expliquer la différence de résultats obtenus de toxicité entre les 4 lots de particules de cette thèse. En ce sens, des échanges ont été initiés avec l'équipe italienne du département de Chimie de l'Université de Turin, autrice de ses travaux, afin de caractériser les silanols à la surface des 4 lots d'échantillons que nous avons utilisés.

Discussion Discussion générale

VI.2.2 Comparaison des résultats chez l'Homme et chez la souris exposée à la silice

Les volets PURESNOW-RETRO et PURESNOW-BIO ont pu tous deux étudier les effets sur le poumon en ce qui concerne l'inflammation et le remodelage pulmonaire de façon rétrospective chez l'Homme et de façon expérimentale chez un modèle murin respectivement. Le choix de doses répétées et réalistes dans l'étude expérimentale *in vivo*, est pertinent au vu des résultats de métrologie sur le terrain du volet PURESNOW-METRO. Les résultats obtenus concernant l'inflammation et le remodelage pulmonaire chez la souris peuvent être comparés à ceux retrouvés chez l'Homme.

Que ce soit chez la souris et l'Homme, il existe une inflammation pulmonaire retrouvée notamment avec une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires. Chez l'Homme, celle-ci a consisté à sélectionner 5 champs aléatoires dans la lumière alvéolaire pour déterminer un nombre moyen de macrophages alvéolaires. Chez la souris, cette quantification des macrophages est passée préalablement par un immunomarquage de la protéine MAC-3, exprimée de façon importante à la surface des macrophages, 10 champs aléatoires dans la lumière alvéolaire ont ensuite été sélectionnés pour déterminer un nombre total de macrophages alvéolaires. Si aucune différence significative n'a été observée chez l'Homme, il existe une augmentation statistiquement significative du nombre de macrophages alvéolaires dans le parenchyme pulmonaire des souris exposées aux micro- et nanoparticules de silice cristalline à la dose hebdomadaire de 50 µg aux temps d'exposition chronique de 3 et 6 mois. Par ailleurs, ces deux études ont révélé la présence d'infiltrats inflammatoires péribronchiolaires chez les sujets exposés professionnellement à la silice et chez les sujets témoins, ainsi que chez les souris exposées aux NP Si Cr à la dose hebdomadaire de 50 µg après 6 mois.

En matière de remodelage alvéolaire et bronchiolaire, les résultats retrouvés dans ces deux volets sont en partie cohérents. En effet, l'évaluation du remodelage alvéolaire atteste d'une absence de différence d'emphysème, évaluée en examinant à l'aveugle la présence d'emphysème centro-lobulaire chez l'Homme (77,8% chez les exposés et 77,8% chez les sujets témoins) par la méthode des intersections linéaires MLI dans les études *in vivo*.

Discussion

Discussion générale

Concernant la présence de phénomène fibrosant, il n'existe pas de différence statistiquement significative chez l'Homme concernant la fibrose péribronchiolaire entre les cas exposés et les sujets témoins. Cependant, la fibrose péribronchiolaire est plus sévère chez les cas exposés par rapport aux sujets témoins ($p < 0,01$). Chez la souris, l'évaluation de la fibrose péribronchiolaire a été réalisée par une évaluation semi-automatique de l'épaisseur des parois des bronchioles (ayant un diamètre d'environ 200 μm et une paroi circulaire). Il n'a pas été constaté de différence statistiquement significative entre les souris exposées et les souris non exposées à 3 mois ou 6 mois d'exposition. Chez l'Homme, d'autres lésions pulmonaires ont été évaluées avec notamment la présence de tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT), mais sans différence notable différente entre les cas exposés et les sujets témoins. Ces BALT ont été retrouvés chez les souris exposées aux SRM679 dans l'étude expérimentale « préliminaire » à la dose hebdomadaire de 50 μg après 3 mois d'exposition. Dans la littérature, la présence de BALT a été mise en évidence également mais uniquement à ce jour chez des rongeurs exposés à des NP de silice amorphe (141–143). Dans une de ces études, des rats adultes ont été exposés à des NP de silice colloïdale en chambre d'inhalation durant 4 semaines, les analyses histopathologiques ont alors révélé une co-localisation de ces BALT avec les NP de silice colloïdale en particulier dans zones péribronchiolaires et périvasculaires (143).

In fine, si certains paramètres évalués ont pu comparer l'inflammation et le remodelage pulmonaire dans ces deux volets, une analyse histologique basée sur la même méthode de lecture à l'aveugle en vue d'établir un score semi-quantitatif pour chaque lame sera réalisée ultérieurement pour l'étude PURESNOW-BIO, ainsi que des études immunohistochimiques avec un marquage des cytokines d'intérêt mises en évidence chez les souris exposées à la silice cristalline.

Discussion Discussion générale

VI.2.3 Impacts potentiels des résultats de la thèse sur la réglementation

L'étude expérimentale du volet PURESNOW-BIO est à ce jour une des premières à comparer les potentiels effets toxiques pulmonaires des micro- et nanoparticules de silice cristalline ou amorphe chez l'animal, ceci à des doses répétées jusqu'à 6 mois et réalistes, représentatives des aérosols présents dans le secteur du BTP. En effet, dans notre étude expérimentale, les doses hebdomadaires employées de 5 et 50 μg , représentent respectivement, des concentrations en particules de 0,5 et 5 mg/m^3 , gamme de concentration fréquemment rencontrée pour la silice cristalline d'après les données métrologiques recueillies sur le terrain dans le volet PURESNOW-METRO, malgré la VLEP réglementaire pour le quartz de 0,1 mg/m^3 . De même, des gammes de concentrations aériennes individuelles similaires sont répertoriées dans les bases de données françaises COLCHIC et SCOLA sur la période 1997 à 2016 et 2007 à 2016, respectivement. En effet, ces deux bases de données rapportent pour le secteur du BTP, une valeur médiane sur 8 heures de 0,44 mg/m^3 en moyenne (min : 0,16 et max : 2,42 mg/m^3), et pour les professions du BTP les plus exposées (concentration de quartz dépassant la VLEP de 0,1 mg/m^3), de 5,6 mg/m^3 (min : 0,77 et max : 37,35 mg/m^3) dans le gros œuvre, et de 2,02 mg/m^3 (min : 0,04 et max : 13,78 mg/m^3) pour la fabrication d'éléments en béton pour la construction (travaux sur surfaces bétonnées, notamment bouchardage, rectification, etc) (10).

Ainsi, les résultats de cette thèse confirment, avec l'observation d'effets inflammatoires et pro-fibrosants pulmonaires à des niveaux équivalents à 0,5 mg/m^3 sur 8 heures, la nécessité absolue de bien respecter la VLEP française actuelle pour la silice cristalline sur 8 heures (0,1 mg/m^3 pour le quartz) (10,80). En effet, de façon générale, la VLEP est une valeur évolutive et établie suite à une expertise scientifique basée sur des données scientifiques disponibles, notamment les études expérimentales. Or, les données obtenues chez l'animal ayant contribué à cette VLEP en vigueur avaient employé pour la plupart des doses particulièrement élevées, voire irréalistes. Ainsi, les effets pulmonaires observés avec des doses réalistes dans notre étude PURESNOW-BIO et ceux qui seront apportés à l'avenir par d'autres études toxicologiques à faibles doses répétées, devraient permettre d'abaisser la LOAEL actuelle (lowest observed adverse effect level) et de définir potentiellement une nouvelle VLEP encore plus restrictive. Le but ultime étant d'atteindre dans la mesure du possible une réduction de

Discussion

Discussion générale

l'exposition du travailleur à la silice cristalline à des niveaux d'exposition les plus bas possibles selon le principe ALARA (As Low As Reasonably Achievable), sachant de plus que la silice cristalline est désormais classée comme agent cancérogène certain (46,98). Par ailleurs, il est essentiel d'améliorer autant que possible techniquement la prévention collective (captage à la source, ventilation générale, travail à l'humide par exemple), notamment en ciblant les situations les plus exposantes présentant un risque de dépassements de la VLEP. En complément, si les équipements de protection collective s'avèrent insuffisants, il faut recourir à des équipements de protections individuelles (notamment pour la protection respiratoire des masques respiratoires de type FFP3, des demi-masques filtrants voire des masques complets avec ventilation assistée de classe 3 en fonction des situations d'exposition) (9).

VII Conclusion et perspectives

Ainsi, cette thèse portant sur les effets inflammatoires et sur le remodelage pulmonaire après exposition à des micro- et nanoparticules de silice cristalline ou amorphe chez des travailleurs du bâtiment et des travaux publics permet d'apporter des connaissances importantes sur le sujet avec des perspectives de travaux ultérieurs.

En effet, cette thèse permet d'améliorer les connaissances sur le terrain en vue de répondre à l'action 1.12 du Plan Santé Travail 3 « *Réaliser une campagne de mesurage sur les nanomatériaux en vue d'identifier les filières les plus exposées, comportant un ciblage spécifique dans le secteur du BTP* ». Le volet PURESNOW-METRO a en effet permis d'obtenir des données métrologiques venant compléter les connaissances actuelles grâce à une meilleure caractérisation physico-chimique des aérosols particuliers contenant de la silice, avec la confirmation de la présence de silice cristalline nanométrique (présence de NP au microscope électronique à transmission comportant des éléments silicium à l'EDX avec une structure cristalline en diffraction) dans les aérosols générés à sec lors de la mise en œuvre de matériaux avec des outils rotatifs à haute énergie et la présence à l'inverse de silice amorphe nanométrique (présence de NP au microscope électronique à transmission comportant des éléments silicium à l'EDX sans structure cristalline en diffraction) lors de travaux à l'humide.

Cette thèse permet également de mieux comprendre les effets pulmonaires de la silice cristalline et amorphe à des doses réalistes et répétées grâce à ses volets PURESNOW-RETRO et PURESNOW-BIO avec l'analyse de l'inflammation et du remodelage pulmonaire de façon rétrospective chez l'Homme et de façon expérimentale chez un modèle murin. Chez l'Homme, les résultats mettent en évidence une fibrose péribronchiolaire retrouvée de façon équivalente entre les cas exposés et les sujets témoins, mais avec un score de sévérité plus important chez les sujets exposés à la silice et une co-localisation des éléments Silicium ubiquitaires et des zones de fibrose chez les sujets exposés professionnellement à la silice cristalline et chez les sujets témoins. Chez la souris, les résultats montrent une inflammation neutrophilique et macrophagique pulmonaire aux temps d'exposition chronique (après 3 et 6

Conclusion et perspectives

Discussion générale

mois) chez des souris exposées aux micro- et nanoparticules de silice cristalline à la dose hebdomadaire de 50 µg, avec un processus biologique pro-fibrosant.

Les travaux de cette thèse offrent plusieurs perspectives considérables dans sa continuité. En effet, il s'avère nécessaire de compléter les analyses des effets pulmonaires, inflammation et remodelage, chez l'Homme et chez l'animal. Par ailleurs, une étude approfondie des silanols des 4 lots d'échantillons de silice est importante à réaliser pour mieux interpréter l'ensemble des résultats et confirmer leur implication ou non dans la toxicité de la silice. De plus, il est également fondamental de prévoir de constituer une banque de spectre de référence des minéraux principaux pouvant être retrouvés dans le parenchyme pulmonaire et/ou dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, afin de définir des profils d'exposition entre les travailleurs exposés et les sujets témoins. Enfin, il serait particulièrement intéressant d'étudier dans une nouvelle expérimentation chez l'animal les effets fibrosants de la silice cristalline micrométrique et nanométrique lors d'une exposition chronique (jusqu'à 6 mois) à des doses répétées et réalistes, associée en fin d'expérimentation à l'administration d'un trigger pro-fibrosant à une faible dose, tel que la bléomycine, ceci afin de voir de mimer une exposition humaine prolongée avec un évènement favorisant l'apparition d'une fibrose pulmonaire.

Valorisations de la thèse

Publications issues de la thèse et soumises à des revues à comité de lecture

- **Vanessa Marques Da Silva**, Manon Benjdir, Pierrick Montagne, Jean-Claude Pairon, Sophie Lanone, Pascal Andujar. Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review. *Nanomaterials* **2022**; *12(14)*: 2392.
- **Vanessa Marques Da Silva**, Pierrick Montagne, Jeanne Tran Van Nhieu, Marie-Laure Franco-Montoya, Laurent Martinon, Karine Beugnon, Jorge Boczkowski, Jean-Claude Pairon, Sophie Lanone, Pascal Andujar. Exposure to building materials dust containing crystalline silica micro- and nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary inflammation and lung remodeling in mice. *En finalisation d'écriture*.

Communications scientifiques orales et affichées lors de congrès issues de la thèse

Communications orales

- **Vanessa Marques Da Silva**, Léna Tison, Catherine Hédouin-Langlet, Laurent Martinon, Raphaël De Thoury, Axelle Treiber, Christian Morel, Jamila Boudjema, Stéphanie Pinte, Clémence Martin, Karine Beugnon, Jean-Claude Pairon, Sophie Lanone, Pascal Andujar. Métrologie des aérosols de silice dans le BTP : stratégie multi-étapes, *Congrès National de Médecin & Santé au Travail*, (16 juin 2022). *Strasbourg*.
- **Vanessa Marques Da Silva**, Léna Tison, Catherine Hédouin-Langlet, Laurent Martinon, Raphaël De Thoury, Axelle Treiber, Christian Morel, Jamila Boudjema, Stéphanie Pinte, Clémence Martin, Karine Beugnon, Jean-Claude Pairon, Sophie Lanone, Pascal Andujar. Metrology of silica aerosols characterization in construction activities: multi-step strategy. *International conference on Health and Safety issues related to Nanomaterials for a socially responsible approach (NanoSafe)*, (17 novembre 2020). *Conférence digitale*.
- **Vanessa Marques Da Silva**, Jeanne Tran Van Nhieu, Marie-Laure Franco-Montoya, Laurent Martinon, Karine Beugnon, Sophie Hue, Jean-Claude Pairon, Jorge Boczkowski, Sophie Lanone, Pascal Andujar. Pulmonary and remodeling effects of repeated exposure to low doses of silica dioxide micro- and nanoparticles in mice. *International conference on Health and Safety issues related to Nanomaterials for a socially responsible approach (NanoSafe)*, (6 novembre 2018). *Grenoble*.

Valorisations de la thèse Discussion générale

Présentations affichées sous forme de posters

- **Vanessa Marques Da Silva**, Pierrick Montagne, Alice Da Silva, Jeanne Tran Van Nhieu, Corinne Chaneac, Jean-Claude Pairon, Sophie Lanone, Pascal Andujar Pulmonary inflammation and remodelling after repeated exposure to silica micro- and nanoparticles: mimicking building construction exposition in mice model. *Journée Sciences de la vie de Créteil*, (16 février 2022). *Créteil*.
- **Vanessa Marques Da Silva**, Jeanne Tran Van Nhieu, Marie-Laure Franco-Montoya, Laurent Martinon, Karine Beugnon, Sophie Hue, Mathieu Surenaud, Jean-Claude Pairon, Jorge Boczkowski, Sophie Lanone, Pascal Andujar Exposure to building materials dusts containing silica dioxide micro- and nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary effects in mice. *Journée Sciences de la vie de Créteil*, (27 septembre 2019). *Paris*.

Publications issues de collaborations (hors thèse) et soumises à des revues à comité de lecture

- Maeva Zysman, Bruno Ribeiro Baptista, Thibaud Soumagne, **Vanessa Marques Da Silva**, Clémence Martin, Charlotte Thibault de Menonville, Laurent Boyer, Bruno Degano, Pierre-Régis Burgel, Thierry Perez, Arnaud Bourdin, Chantal Raheison, Hervé Pégliasco, Daniel Piperno, Christophe Zanetti, Hughes Morel, Bertrand Delclaux, Christian Delafosse, Nicolas Roche. Position paper of the French Society of Respiratory Diseases regarding pharmacological treatment optimization for stable COPD in 2021. *Respir Med Res*. **2022**;81:100889.
- Julien Ancel, Marina Guecamburu, **Vanessa Marques Da Silva**, Pierre Schilfarth, Laurent Boyer, Charles Pilette, Clémence Martin, Philippe Devillier, Patrick Berger, Maeva Zysman, Olivier Le Rouzic, Jesus Gonzalez-Bermejo, Bruno Degano, Pierre-Régis Burgel, Engi Ahmed, Nicolas Roche, Gaetan Deslee. Principaux messages de la première Biennale BPCO 2021 de la SPLF. Mieux comprendre pour innover. *Rev Mal Respir*. **2022**;39(5): 427–41.
- Balasubramanyam Annangi, Zhuyi Lu, Jonathan Bruniaux, Audrey Ridoux, **Vanessa Marques Da Silva**, Delphine Vantelon, Jorge Boczkowski, Sophie Lanone (2021). Macrophage autophagy protects mice from cerium oxide nanoparticle-induced lung fibrosis. *Part Fibre Toxicol*. **2021** ;18(1):6.
- Maeva Zysman, Bruno Ribeiro Baptista, Thibaud Soumagne, **Vanessa Marques Da Silva**, Clémence Martin, Charlotte Thibault de Menonville, Laurent Boyer, Bruno Degano, Pierre-Régis Burgel, Thierry Perez, Arnaud Bourdin, Chantal Raheison, Hervé Pégliasco, Daniel Piperno, Christophe Zanetti, Hughes Morel, Bertrand Delclaux, Christian Delafosse, Nicolas Roche. Optimisation du traitement médicamenteux des patients atteints de BPCO en état stable. Position de la Société de pneumologie de langue française. Actualisation 2021. *Rev Mal Respir*. **2021**;38(5): 539–61.

Références bibliographiques

1. ISO/TS 80004-1:2015(fr) [Internet]. [cited 2022 May 5]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:fr>
2. RECOMMANDATION DE LA COMMISSION du 10 juin 2022 relative à la définition des nanomatériaux (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)(2022/C 229/01) [Internet]. [cited 2022 Jun 11]. Available from: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32022H0614\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32022H0614(01))
3. Krug HF, Wick P. Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge. *Angew Chemie - Int Ed.* 2011;50(6):1260–78.
4. Witschger O, Ricaud M. Les nanomatériaux manufacturés - Brochure - INRS [Internet]. [cited 2022 May 5]. Available from: <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED 6050>
5. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (80-)*. 2006;311(5761):622–7.
6. Prabha S, Durgalakshmi D, Rajendran S, Lichtfouse E. Plant-derived silica nanoparticles and composites for biosensors, bioimaging, drug delivery and supercapacitors: a review. *Environ Chem Lett.* 2021 Apr 12;19(2):1667–91.
7. Guthrie GD, Heaney PJ. Mineralogical characteristics of silica polymorphs in relation to their biological activities. *Scand J Work Environ Heal.* 1995;21(SUPPL. 2):5–8.
8. Overview of Silica Polymorphs - The Quartz Page [Internet]. [cited 2022 May 19]. Available from: http://thequartzpagewww.quartzpage.de/gen_mod.html
9. Silice cristalline (FT 232). Généralités - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cited 2022 May 19]. Available from: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_232
10. AVIS et RAPPORT de l'Anses relatif à la mise à jour des connaissances concernant les dangers, expositions et risques relatifs à la silice cristalline [Internet]. [cited 2022 May 19]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-lanses-relatif-au-danger-salmonella-spp-en-alimentation-animale>
11. A. Boubault. Le silicium : un élément chimique très abondant, un affinage stratégique [Internet]. Vol. 69, Jom. 2020 [cited 2022 May 19]. Available from: <https://www.mineralinfo.fr/fr/ecomine/silicium-un-element-chimique-tres-abondant-un-affinage-strategique>

Références bibliographiques

Discussion générale

12. Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci.* 1968;26(1):62–9.
13. Les silices amorphes - Brochure - INRS [Internet]. [cited 2022 May 19]. Available from: <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED 5033>
14. JACC Report 51 - Synthetic Amorphous Silica - ECETOC [Internet]. [cited 2022 May 19]. Available from: <https://www.ecetoc.org/publication/jacc-report-51-synthetic-amorphous-silica/>
15. Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv Mater.* 2012;24(12):1504–34.
16. Li C, Sheng X, Li N, Ping Q, Lu P, Zhang J. Insecticidal characteristics and mechanism of a promising natural insecticide against saw-toothed grain beetle. *RSC Adv.* 2022;12(12):7066–74.
17. Bajaj P, Harris JF, Huang JH, Nath P, Iyer R. Advances and Challenges in Recapitulating Human Pulmonary Systems: At the Cusp of Biology and Materials. *ACS Biomater Sci Eng.* 2016;2(4):473–88.
18. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, et al. The Number of Alveoli in the Human Lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Jan 1;169(1):120–4.
19. Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax.* 2015 Dec 1;70(12):1189–96.
20. Shi T, Denney L, An H, Ho L, Zheng Y. Alveolar and lung interstitial macrophages: Definitions, functions, and roles in lung fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2021 Jul 6;110(1):107–14.
21. Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Apr 1;9(4):a028241.
22. Andujar P, Nemery B. Pathologies respiratoires aiguës et subaiguës d'origine toxique. *Rev Mal Respir.* 2009 Oct;26(8):867–85.
23. Fröhlich E, Salar-Behzadi S. Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *Int J Mol Sci.* 2014 Mar 18;15(3):4795–822.
24. University of Florida. Respiratory Deposition » Section 2d.pdf [Internet]. [cited 2022 Jun 2]. Available from: <https://aerosol.ees.ufl.edu/respiratory/section01.html>
25. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity.

Références bibliographiques

Discussion générale

- Biointerphases. 2007;2(4):MR17–71.
26. Bals R, Weiner DJ, Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*. 1999 Feb 1;103(3):303–7.
27. Low PMP, Luk CK, Dulfano MM, Finch PJP. Ciliary beat frequency of human respiratory tract by different sampling techniques. *Am Rev Respir Dis*. 1984;130(3):497–8.
28. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect*. 2005 Jul;113(7):823–39.
29. Riediker M, Zink D, Kreyling W, Oberdörster G, Elder A, Graham U, et al. Particle toxicology and health - Where are we? Vol. 16, Particle and Fibre Toxicology. *Particle and Fibre Toxicology*; 2019. 1–33 p.
30. Rosental PA, Rosner D, Blanc PD. From silicosis to silica hazards: An experiment in medicine, history, and the social sciences. *Am J Ind Med*. 2015;58:3–5.
31. Bonnetterre V, Le Barbier M. Silicozes graves liées à l'usage des pierres reconstituées. *Références en Santé Au Trav*. 2016;147:5.
32. The Lancet Respiratory Medicine. The world is failing on silicosis. *Lancet Respir Med*. 2019 Apr;7(4):283.
33. Cavalin C, Lescoat A, Ballerie A, Belhomme N, Jégo P, Jouneau S, et al. Beyond silicosis, is the world failing on silica hazards? *Lancet Respir Med*. 2019;7(8):649–50.
34. Leung CC, Yu ITS, Chen W. Silicosis. *Lancet*. 2012 May 26;379(9830):2008–18.
35. Cox-Ganser JM, Burchfiel CM, Fekedulegn D, Andrew ME, Ducatman BS. Silicosis in lymph nodes: the canary in the miner? *J Occup Environ Med*. 2009 Feb;51(2):164–9.
36. Brochard P, Begueret H, Thumerel M, Bakhiyi R, Leclerc I, Audoin C, et al. Mediastinal Lymph Node Silicotic Nodules and Occupational Exposure to Respirable Crystalline Silica: A Controlled Study in Patients with Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022 Aug 1;206(3):356–8.
37. Caplan-Shaw CE, Yee H, Rogers L, Abraham JL, Parsia SS, Naidich DP, et al. Lung Pathologic Findings in a Local Residential and Working Community Exposed to World Trade Center Dust, Gas, and Fumes. *J Occup Environ Med*. 2011 Sep;53(9):981–91.
38. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [Internet]. [cited 2022 Jun 2]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))

Références bibliographiques

Discussion générale

39. BPCO et insuffisance respiratoire chronique – Santé publique France [Internet]. [cited 2022 Jun 2]. Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/bpco-et-insuffisance-respiratoire-chronique>
40. Mokdad AH, Ballestros K, Echko M, Glenn S, Olsen HE, Mullany E, et al. The State of US Health, 1990-2016. *JAMA*. 2018 Apr 10;319(14):1444.
41. Blanc PD, Torén K. Occupation in chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: An update. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11(3):251–7.
42. Reynolds CJ, MacNeill SJ, Williams J, Hodges NG, Campbell MJ, Newman Taylor AJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in Welsh slate miners. *Occup Med (Chic Ill)*. 2017 Jan 1;67(1):20–5.
43. Rennard SI, Drummond MB. Early chronic obstructive pulmonary disease: definition, assessment, and prevention. *Lancet*. 2015 May 2;385(9979):1778–88.
44. teWaterNaude JM. Tuberculosis and silica exposure in South African gold miners. *Occup Environ Med*. 2006 Mar 1;63(3):187–92.
45. Shtraichman O. Outbreak of autoimmune disease in silicosis linked to artificial stone. 2015;(June):444–50.
46. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Silica, Some Silicates, Coal Dust and Para-Aramid Fibrils. Lyon, 15-22 October 1996. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1997;68:1–475.
47. J.O.U.E. Directive (UE) 2019/983 du Parlement européen et du Conseil du 5 juin 2019 modifiant la directive 2004/37/CE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents cancérigènes ou mutagènes au travail [Internet]. L 164. 2019 [cited 2022 Jun 2]. p. 23–9. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32017L2398>
48. Ge C, Peters S, Olsson A, Portengen L, Schüz J, Almansa J, et al. Respirable Crystalline Silica Exposure, Smoking, and Lung Cancer Subtype Risks. A Pooled Analysis of Case-Control Studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Aug 1;202(3):412–21.
49. Kumasaka T, Akaike Y, Nakamura O, Yamazaki K, Moriyama H, Takemura T. Rare pneumoconiosis induced by long-term amorphous silica exposure: The histological characteristics and expression of cyclooxygenase-2 as an antifibrogenic mediator in macrophages. *Pathol Int*. 2011 Nov;61(11):667–71.

Références bibliographiques

Discussion générale

50. Mazziotti S, Gaeta M, Costa C, Ascenti G, Barbaro Martino L, Spatari G, et al. Computed tomography features of liparitis: a pneumoconiosis due to amorphous silica. *Eur Respir J*. 2004 Feb;23(2):208–13.
51. Costa C, Ascenti G, Scribano E, D'Angelo T, Gaeta M, Fenga C, et al. CT patterns of pleuro-pulmonary damage caused by inhalation of pumice as a model of pneumoconiosis from non-fibrous amorphous silicates. *Radiol Med*. 2016 Jan 1;121(1):19–26.
52. Liou S-H, Tsou T-C, Wang S-L, Li L-A, Chiang H-C, Li W-F, et al. Epidemiological study of health hazards among workers handling engineered nanomaterials. *J Nanoparticle Res*. 2012 Aug 4;14(8):878.
53. Liao H-Y, Chung Y-T, Lai C-H, Wang S-L, Chiang H-C, Li L-A, et al. Six-month follow-up study of health markers of nanomaterials among workers handling engineered nanomaterials. *Nanotoxicology*. 2014 Aug 31;8 Suppl 1(sup1):100–10.
54. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut derived nitrosamines. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans*. 2004;85:1–334.
55. Taeger D, McCunney R, Bailer U, Barthel K, Küpper U, Brüning T, et al. Cross-Sectional Study on Nonmalignant Respiratory Morbidity due to Exposure to Synthetic Amorphous Silica. *J Occup Environ Med*. 2016 Apr;58(4):376–84.
56. Zhang H, Dunphy DR, Jiang X, Meng H, Sun B, Tarn D, et al. Processing Pathway Dependence of Amorphous Silica Nanoparticle Toxicity: Colloidal vs Pyrolytic. *J Am Chem Soc*. 2012 Sep 26;134(38):15790–804.
57. Marques Da Silva V, Benjdir M, Montagne P, Pairon J-C, Lanone S, Andujar P. Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review. *Nanomaterials*. 2022 Jul 13;12(14):2392.
58. Napierska D, Thomassen LCJ, Lison D, Martens JA, Hoet PH. The nanosilica hazard: another variable entity. *Part Fibre Toxicol*. 2010 Dec 3;7(1):39.
59. Murugadoss S, Lison D, Godderis L, Van Den Brule S, Mast J, Brassinne F, et al. Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Archives of Toxicology*. 2017.
60. Sharma N, Jha S. Amorphous nanosilica induced toxicity, inflammation and innate immune responses: A critical review. Vol. 441, *Toxicology*. Elsevier Ireland Ltd; 2020.
61. Turci F, Pavan C, Leinardi R, Tomatis M, Pastero L, Garry D, et al. Revisiting the paradigm

Références bibliographiques

Discussion générale

- of silica pathogenicity with synthetic quartz crystals: The role of crystallinity and surface disorder. *Part Fibre Toxicol.* 2016 Jun;13(1).
62. Pavan C, Fubini B. Unveiling the Variability of “Quartz Hazard” in Light of Recent Toxicological Findings. *Chem Res Toxicol.* 2017 Jan 17;30(1):469–85.
 63. Pavan C, Santalucia R, Leinardi R, Fabbiani M, Yakoub Y, Uwambayinema F, et al. Nearly free surface silanols are the critical molecular moieties that initiate the toxicity of silica particles. *Proc Natl Acad Sci.* 2020 Nov 10;117(45):27836–46.
 64. Porter DW, Barger M, Robinson VA, Leonard SS, Landsittel D, Castranova V. Comparison of low doses of aged and freshly fractured silica on pulmonary inflammation and damage in the rat. *Toxicology.* 2002 Jun 14;175(1–3):63–71.
 65. Les valeurs limites d'exposition professionnelle - Brochure - INRS [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED 6443>
 66. Guide méthodologique MétroPol - Publications et outils - Mesure en temps réel de la concentration en nombre d'un aérosol submicronique au moyen d'un compteur de noyaux de condensation - INRS [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-tempsreel-aerosolsubmicronique/metropol-tempsreel-aerosolsubmicronique.pdf>
 67. testo DiSCmini | Nanoparticules | Analyse de combustion, gaz et particules | Paramètres | Testo S.à.r.l. [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.testo.com/fr-FR/testo-discmini/p/133>
 68. Guide méthodologique MétroPol - Publications et outils - Stratégie de prélèvement - INRS [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <http://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-strategie-principe.pdf>
 69. Guide méthodologique MétroPol - Publications et outils - Prélèvement des aérosols, Généralités - INRS [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-generalite-aerosol/metropol-prelevement-generalite-aerosol.pdf>
 70. Guide méthodologique MétroPol - Publications et outils - Les dispositifs de prélèvement MétroPol - INRS [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-dispositifs/metropol-prelevement-dispositifs.pdf>
 71. Guide méthodologique MétroPol - Publications et outils - Prélèvement des aérosols par

Références bibliographiques

Discussion générale

- cassette fermée - INRS [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-cassette/metropol-prelevement-cassette.pdf>
72. Guide méthodologique MétroPol - Publications et outils - Prélèvement des aérosols par cyclone - INRS [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-cyclone/metropol-prelevement-cyclone.pdf>
73. Description détaillée de l'échantillonneur PARTICLEVER | PARTICLEVER [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.particlever.com/fr/comment-ca-marche/echantillonneur-particlever-en-detail>
74. Article R4412-4 - Code du travail - Légifrance [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000018530948/
75. Article R4412-149 - Code du travail - Légifrance [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000044637328
76. Article R4412-150 - Code du travail - Légifrance [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000018530556/
77. Mesure des expositions aux agents chimiques et biologiques. Réglementation - Risques - INRS [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.inrs.fr/risques/mesure-expositions-agents-chimiques-biologiques/reglementation.html>
78. Article R4412-27 - Code du travail - Légifrance [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000021490885/
79. Article R4412-76 - Code du travail - Légifrance [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000021490916/
80. Liste des VLEP françaises - Outil - INRS [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=outil65>
81. Décret n°84-1094 du 7 décembre 1984 complétant le code du travail (deuxième partie) et fixant les règles relatives à l'aération et l'assainissement des locaux de travail auxquelles doivent se conformer les maîtres d'ouvrage entreprenant la construction ou [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000006064321/>
82. AVIS et RAPPORT de l'Anses relatif à la mise à proposition de valeurs limites

Références bibliographiques

Discussion générale

- d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel - Evaluation des effets sur la santé sur le lieu de travail pour les poussières dites sans effet spécifique [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/VSR2017SA0148Ra.pdf>
83. Décret n° 2021-1763 du 23 décembre 2021 portant modification des concentrations moyennes en poussières totales et alvéolaires dans les locaux à pollution spécifique - Légifrance [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000044554086>
84. AVIS et RAPPORT de l'Anses à la proposition de valeurs limites d'exposition en milieu professionnel pour le dioxyde de titane sous forme nanométrique [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/content/dioxyde-de-titane-sous-forme-nanoparticulaire-recommandation-de-valeurs-limites-d'exposition>
85. Dioxyde de titane nanométrique : de la nécessité d'une valeur limite d'exposition professionnelle - Article de revue - INRS [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=NT 36>
86. Noir de carbone nanostructuré : vers une valeur limite d'exposition professionnelle - Article de revue - INRS [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=TC 168>
87. Les chiffres Clés du BTP - Observatoire des métiers du BTP [Internet]. [cited 2022 Jul 29]. Available from: <https://dataviz.metiers-btp.fr/>
88. (FFB) FF du B. Techniques du bâtiment [Internet]. [cited 2022 Jul 29]. Available from: <https://www.ffbatiment.fr/techniques-batiment>
89. (FNTP) FN des TP. Qu'est ce que les TP ? | FNTP [Internet]. [cited 2022 Jul 29]. Available from: <https://www.fntp.fr/metiers/metiers-tp/qu-est-ce-que-les-tp/a-quoi-servent>
90. PST - Plan santé au travail [Internet]. [cited 2022 Jul 29]. Available from: <https://travail-emploi.gouv.fr/sante-au-travail/plans-gouvernementaux-sante-au-travail/article/plans-sante-au-travail-pst>
91. Xiang M, Morgeneyer M, Aguerre-Chariol O, Philippe F, Bressot C. Airborne nanoparticle collection efficiency of a TEM grid-equipped sampling system. *Aerosol Sci Technol.* 2021 May 4;55(5):526–38.
92. R'mili B, Le Bihan OLC, Dutouquet C, Aguerre-Charriol O, Frejafon E. Particle Sampling by TEM Grid Filtration. *Aerosol Sci Technol.* 2013 Jul 15;47(7):767–75.

Références bibliographiques

Discussion générale

93. SILICE - SiO₂ - Forsapre [Internet]. [cited 2022 Aug 15]. Available from: https://www.forsapre.fr/fiches_fan/silice-sio2
94. LUCIA | Centre de rayonnement synchrotron français [Internet]. [cited 2022 Aug 15]. Available from: <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/lignes-de-lumiere/lucia>
95. Weissgerber TL, Milic NM, Winham SJ, Garovic VD. Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. *PLoS Biol.* 2015 Apr 22;13(4).
96. Construction sector according to Eurostat [Internet]. [cited 2022 Aug 15]. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/cache/digpub/housing/bloc-3a.html?lang=en>
97. Calvert GM. Occupational silica exposure and risk of various diseases: an analysis using death certificates from 27 states of the United States. *Occup Environ Med.* 2003 Feb 1;60(2):122–9.
98. Directive (EU) 2017/2398 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2017 amending Directive 2004/37/EC on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens or mutagens at work (Text with EEA relevance) [Internet]. [cited 2022 Aug 15]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32017L2398>
99. Antonini JM, Badding MA, Meighan TG, Keane M, Leonard SS, Roberts JR. Evaluation of the Pulmonary Toxicity of a Fume Generated from a Nickel-, Copper-Based Electrode to be Used as a Substitute in Stainless Steel Welding. *Environ Health Insights.* 2014 Jan 15;8(Suppl 1):11–20.
100. Prémumé M, Simon-Deckers A, Tomkiewicz-Raulet C, Le Grand B, Tran Van Nhieu J, Beaune G, et al. Exposure to metal oxide nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary effects in mice. *Nanotoxicology.* 2016 Nov 25;10(10):1535–44.
101. Daubeuf F, Becker J, Aguilar-Pimentel JA, Ebel C, Hrabě de Angelis M, Hérault Y, et al. A Fast, Easy, and Customizable Eight-Color Flow Cytometric Method for Analysis of the Cellular Content of Bronchoalveolar Lavage Fluid in the Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017;
102. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966 Jul 1;30(1):23–38.
103. Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER, ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American

Références bibliographiques

Discussion générale

- Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 15;181(4):394–418.
104. Carrieri M, Guzzardo C, Farcas D, Cena LG. Characterization of Silica Exposure during Manufacturing of Artificial Stone Countertops. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jun 22;17(12):4489.
105. Ramkissoon C, Gaskin S, Thredgold L, Hall T, Rowett S, Gun R. Characterisation of dust emissions from machined engineered stones to understand the hazard for accelerated silicosis. *Sci Rep*. 2022 Dec 14;12(1):4351.
106. de Leeuw NH, Higgins FM, Parker SC. Modeling the Surface Structure and Stability of α -Quartz. *J Phys Chem B*. 1999 Feb 1;103(8):1270–7.
107. Warheit DB, Webb TR, Colvin VL, Reed KL, Sayes CM. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci*. 2007 Jan 1;95(1):270–80.
108. Andujar P, Simon-Deckers A, Galateau-Sallé F, Fayard B, Beaune G, Clin B, et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. *Part Fibre Toxicol*. 2014 May 13;11(1):23.
109. Craighead JE, Emerson RJ, Stanley DE. Slateworker's pneumoconiosis. *Hum Pathol*. 1992 Oct 1;23(10):1098–105.
110. Krefft S, Wolff J, Rose C. Silicosis: An Update and Guide for Clinicians. *Clin Chest Med*. 2020 Dec 1;41(4):709–22.
111. Paireon JC, Billon-Galland MA, Iwatsubo Y, Bernstein M, Gaudichet A, Bignon J, et al. Biopersistence of nonfibrous mineral particles in the respiratory tracts of subjects following occupational exposure. *Environ Health Perspect*. 1994 Oct;102(suppl 5):269–75.
112. Mo S-D, Ching WY. X-ray absorption near-edge structure in alpha-quartz and stishovite: Ab initio calculation with core-hole interaction. *Appl Phys Lett*. 2001 Jun 11;78(24):3809–11.
113. Gilbert B, Frazer BH, Naab F, Fournelle J, Valley JW, De Stasio G. X-ray absorption spectroscopy of silicates for in situ, sub-micrometer mineral identification. *Am Mineral*. 2003 May 1;88(5–6):763–9.
114. Ligny D de, Neuville DR, Cormier L, Roux J, Henderson GS, Panczer G, et al. Silica polymorphs, glass and melt: An in situ high temperature XAS study at the Si K-edge. *J*

Références bibliographiques

Discussion générale

- Non Cryst Solids. 2009 Jul 1;355(18–21):1099–102.
115. Han Y, Lu Z, Teng Z, Liang J, Guo Z, Wang D, et al. Unraveling the Growth Mechanism of Silica Particles in the Stöber Method: In Situ Seeded Growth Model. *Langmuir*. 2017 Jun 13;33(23):5879–90.
116. Yanagisawa K, Zhu Y, Onda A, Kajiyoshi K. Hydrothermal synthesis of mono-dispersed quartz powders. *J Mater Sci*. 2004 Apr;39(8):2931–4.
117. Chauhan PS, Wagner JG, Benninghoff AD, Lewandowski RP, Favor OK, Wierenga KA, et al. Rapid Induction of Pulmonary Inflammation, Autoimmune Gene Expression, and Ectopic Lymphoid Neogenesis Following Acute Silica Exposure in Lupus-Prone Mice. *Front Immunol*. 2021 Feb 23;12.
118. Zhao Q, Li Y, Chai X, Geng Y, Cao Y, Xu L, et al. Interaction of pulmonary surfactant with silica and polycyclic aromatic hydrocarbons: Implications for respiratory health. *Chemosphere*. 2019 May;222:603–10.
119. Ray JL, Holian A. Sex differences in the inflammatory immune response to multi-walled carbon nanotubes and crystalline silica. *Inhal Toxicol*. 2019 Jun;31(7):285–97.
120. Benmerzoug S, Rose S, Bounab B, Gosset D, Duneau L, Chenuet P, et al. STING-dependent sensing of self-DNA drives silica-induced lung inflammation. *Nat Commun*. 2018 Dec;9(1).
121. Thakur SA, Beamer CA, Migliaccio CT, Holian A. Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation. *Toxicol Sci*. 2009;108(2):462–71.
122. Rabolli V, Lo Re S, Uwambayinema F, Yakoub Y, Lison D, Huaux F. Lung fibrosis induced by crystalline silica particles is uncoupled from lung inflammation in NMRI mice. *Toxicol Lett*. 2011 Jun;203(2):127–34.
123. Sutunkova MP, Solovyeva SN, Katsnelson BA, Gurvich VB, Privalova LI, Minigalieva IA, et al. A paradoxical response of the rat organism to long-term inhalation of silica-containing submicron (predominantly nanoscale) particles of a collected industrial aerosol at realistic exposure levels. *Toxicology*. 2017 Jun;384:59–68.
124. Rabolli V, Badissi AA, Devosse R, Uwambayinema F, Yakoub Y, Palmi-Pallag M, et al. The alarmin IL-1 α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2014 Dec;11(1).
125. Lam M, Mansell A, Tate MD. Another One Fights the Dust: Targeting the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2022 Jun

Références bibliographiques
Discussion générale

- 1;66(6):601–11.
126. Jessop F, Hamilton RF, Rhoderick JF, Fletcher P, Holian A. Phagolysosome acidification is required for silica and engineered nanoparticle-induced lysosome membrane permeabilization and resultant NLRP3 inflammasome activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 Mar;318:58–68.
127. Peeters PM, Eurlings IMJ, Perkins TN, Wouters EF, Schins RPF, Borm PJA, et al. Silica-induced NLRP3 inflammasome activation in vitro and in rat lungs. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11(1).
128. Peeters PM, Perkins TN, Wouters EFM, Mossman BT, Reynaert NL. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2013 Feb;10(1).
129. Li N, Shi F, Wang X, Yang P, Sun K, Zhang L, et al. Silica dust exposure induces pulmonary fibrosis through autophagy signaling. *Environ Toxicol.* 2021 Jul 15;36(7):1269–77.
130. Lo Re S, Yakoub Y, Devosse R, Uwambayinema F, Couillin I, Ryffel B, et al. Uncoupling between inflammatory and fibrotic responses to silica: Evidence from MyD88 knockout mice. *PLoS One.* 2014 Jul;9(7).
131. van den Brûle S, Misson P, Bühling F, Lison D, Huaux F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF- β . *Respir Res.* 2005 Jul;6.
132. Paul E, Franco-Montoya M-L, Paineau E, Angeletti B, Vibhushan S, Ridoux A, et al. Pulmonary exposure to metallic nanomaterials during pregnancy irreversibly impairs lung development of the offspring. *Nanotoxicology.* 2017 May 21;11(4):484–95.
133. Van den Broeck W, Derore A, Simoens P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J Immunol Methods.* 2006 May 30;312(1–2):12–9.
134. Fritsch-Decker S, Marquardt C, Stoeger T, Diabaté S, Weiss C. Revisiting the stress paradigm for silica nanoparticles: decoupling of the anti-oxidative defense, pro-inflammatory response and cytotoxicity. *Arch Toxicol.* 2018 Jul;92(7):2163–74.
135. Guichard Y, Fontana C, Chavinier E, Terzetti F, Gaté L, Binet S, et al. Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line. *Toxicol Ind Health.* 2016 Sep;32(9):1639–50.
136. Sandberg WJ, Låg M, Holme JA, Friede B, Gualtieri M, Kruszewski M, et al. Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 β release from macrophages. *Part Fibre*

Références bibliographiques

Discussion générale

- Toxicol. 2012 Aug;9.
137. Singal M, Finkelstein JN. Amorphous silica particles promote inflammatory gene expression through the redox sensitive transcription factor, AP-1, in alveolar epithelial cells. *Exp Lung Res.* 2005 Jul;31(6):581–97.
 138. Pavan C, Sydor MJ, Bellomo C, Leinardi R, Cananà S, Kendall RL, et al. Molecular recognition between membrane epitopes and nearly free surface silanols explains silica membranolytic activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2022 Sep 1;217:112625.
 139. Pavan C, Delle Piane M, Gullo M, Filippi F, Fubini B, Hoet P, et al. The puzzling issue of silica toxicity: are silanols bridging the gaps between surface states and pathogenicity? *Part Fibre Toxicol.* 2019 Dec 16;16(1):32.
 140. Pavan C, Turci F, Tomatis M, Ghiazza M, Lison D, Fubini B. Z potential evidences silanol heterogeneity induced by metal contaminants at the quartz surface: Implications in membrane damage. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017 Sep 1;157:449–55.
 141. Coccini T, Roda E, Barni S, Signorini C, Manzo L. Long-lasting oxidative pulmonary insult in rat after intratracheal instillation of silica nanoparticles doped with cadmium. *Toxicology.* 2012 Dec 16;302(2–3):203–11.
 142. Kaewamatawong T, Shimada A, Okajima M, Inoue H, Morita T, Inoue K, et al. Acute and Subacute Pulmonary Toxicity of Low Dose of Ultrafine Colloidal Silica Particles in Mice after Intratracheal Instillation. *Toxicol Pathol.* 2006;34(7):958–65.
 143. Lee KP, Kelly DP. Translocation of particle-laden alveolar macrophages and intra-alveolar granuloma formation in rats exposed to Ludox colloidal amorphous silica by inhalation. *Toxicology.* 1993;77(3):205–22.

Annexes
Discussion générale

Annexes

Annexe 1 : Formulaire de recueil de données élaboré pour étayer le contexte de chaque prélèvement métrologique réalisé sur le terrain

FORMULAIRE DE METROLOGIE

Date : ___/___/___ Lieu :

N° opérateur (anonymisé) : ___ N° situation : ___

DONNEES CONCERNANT LE CHANTIER		
N° entreprise (anonymisé)		
Type du chantier		
Métier concerné	<input type="checkbox"/> Maçon <input type="checkbox"/> Maçon finisseur	<input type="checkbox"/> Couvreur <input type="checkbox"/> Carreleur <input type="checkbox"/> Cuisiniste <input type="checkbox"/> Marbrier <input type="checkbox"/> Granitier <input type="checkbox"/> Terrassier
	<input type="checkbox"/> Autre, préciser : _____	
Type de tâche concernée	<input type="checkbox"/> Préparation des mortiers/bétons <input type="checkbox"/> Ponçage des dalles en béton <input type="checkbox"/> Piochage/burinage de murs Pulvérisation de béton projeté par : <input type="checkbox"/> voie humide <input type="checkbox"/> voie sèche	<input type="checkbox"/> Découpe de tuiles « oranges » ou en ardoise <input type="checkbox"/> Découpe de carrelage à la disqueuse <input type="checkbox"/> Découpe à la scie circulaire <input type="checkbox"/> Finition de plan de travail en pierre reconstituée <input type="checkbox"/> Découpe de bordures à la scie circulaire
	<input type="checkbox"/> Autre, préciser : _____	
Durée de la tâche actuelle	___ heure ___ minutes	
Durée cumulée quotidienne de la tâche (cocher 1 seule case)	<input type="checkbox"/> > 3h30	<input type="checkbox"/> 20 minutes à 3h30 <input type="checkbox"/> < 20 minutes
Protection collective	<input type="checkbox"/> à l'humide <input type="checkbox"/> à sec <input type="checkbox"/> Aspiration à la source <input type="checkbox"/> Ventilation <input type="checkbox"/> Dispositif d'extraction	
Protection individuelle	<input type="checkbox"/> Demi-Masque <input type="checkbox"/> Masque complet <input type="checkbox"/> Casque/cagoule	Protection : <input type="checkbox"/> FFP1/P1 <input type="checkbox"/> FFP2/P2 <input type="checkbox"/> FFP3/P3 Si ventilation assistée : <input type="checkbox"/> TM1P <input type="checkbox"/> TM2P <input type="checkbox"/> TM3 P Protection : <input type="checkbox"/> TH1 P <input type="checkbox"/> TH2 P <input type="checkbox"/> TH3 P
CONDITIONS DE REALISATION DE LA METROLOGIE		
Nom de l'instrument de mesure		
Atmosphère	<input type="checkbox"/> Intérieur	<input type="checkbox"/> Extérieur
Hygrométrie et température	___, ___ % d'humidité	___, ___ °C
Distance par rapport à la source	___, ___ mètre	
Co-activité à proximité	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui : si oui, laquelle ?	

Annexes

Discussion générale

DONNEES CONCERNANT L'OUTIL ET SON EMPLOI			
Type d'outil employé	<input type="checkbox"/> Ponceuse <input type="checkbox"/> Burineuse <input type="checkbox"/> Disqueuse <input type="checkbox"/> Scie circulaire Autre, préciser : _____		
Marque et référence exactes	<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>		
Nature (cocher une seule case)	<input type="checkbox"/> Disque <input type="checkbox"/> Lame <input type="checkbox"/> Foret <input type="checkbox"/> Autre : si oui, lequel ?		
Marque et référence exactes	<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>		
Caractéristiques (au moins 2 données sur 3 si disponible)	Puissance : _____ W	Vitesse de rotation : _____ tours/min	Couple : _____ Nm
Estimation qualitative de la puissance employée	<input type="checkbox"/> Mini <input type="checkbox"/> Peu importante <input type="checkbox"/> Assez importante <input type="checkbox"/> Très importante <input type="checkbox"/> Max		
Lors de l'échauffement du dispositif (disque, lame, foret...)	<input type="checkbox"/> Fumée		<input type="checkbox"/> Etincelles
Collecte du matériau	N° échantillon : _____ Coller une étiquette sur l'échantillon – Indiquer : date / lieu / tâche / n° situation		
Enregistrement vidéo	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui, si oui : Recueil fiche « droit à l'image » <input type="checkbox"/>		
Remarques :	<div style="border: 1px solid black; height: 40px; width: 100%;"></div>		

Annexes Discussion générale

Annexe 2 : Lettre d'information destinée à l'employeur et les salariés de la visée des prélèvements effectués lors des campagnes de mesures dans les Hauts-de-France et en Ile-de-France

LOGO

SST

ADRESSE

CODE POSTAL

ENTREPRISE XXXX

ADRESSE

CODE POSTAL

XX, le Jour Mois Année

OBJET : Campagnes de mesures dans les Hauts de France et en Ile de France

Madame/ Monsieur,

Afin de compléter l'état des connaissances sur l'exposition des salariés du bâtiment et des travaux publics (BTP) aux particules de silice, votre service de Médecine et Santé au travail, **l'Action Santé Travail (AST) ou le Pôle Santé Travail (PST) Métropole Nord**, mène actuellement une campagne de mesures sur le terrain en lien avec un programme partenarial associant : **l'Action Santé Travail (AST) ou le Pôle Santé Travail (PST) Métropole Nord**, le Laboratoire de Toxicologie Industrielle de la Caisse régionale d'assurance maladie d'Ile de France (CRAMIF), l'unité INSERM U955, le service de Pathologies Professionnelles et de l'Environnement du Centre hospitalier intercommunal de Créteil, le laboratoire de métrologie Particlever® et le Laboratoire Amiante, Fibres et Particules du Service Parisien de Santé Environnementale (SPSE) de la ville de Paris.

Cette campagne de mesures cible en particulier les situations d'exposition aux particules de silice les plus exposantes dans le secteur du BTP. Les laboratoires impliqués dans cette campagne effectueront une caractérisation chimique et physique de ces particules de silice dans les aérosols prélevés sur le terrain. Cette action permettra notamment de répondre à l'action 1.12 « Mieux connaître et mieux prévenir les risques émergents » du Plan Santé Travail 3 (2016-2020) avec pour objectifs de :

1. « Réaliser une campagne de mesurage sur les nanomatériaux en vue d'identifier les filières les plus exposées, comportant un ciblage spécifique dans le secteur du bâtiment travaux publics (BTP) »
2. « Dans les secteurs d'activités les plus concernés par les expositions aux nanomatériaux, informer les entreprises et les acteurs de prévention sur les mesures de gestion des risques adaptées existantes, et notamment les moyens de protection collective ».

Annexes

Discussion générale

En pratique, la collecte des données est effectuée en réalisant des mesures de concentrations dans la zone respiratoire des salariés au cours de leurs journées de travail, qui seront effectuées par le personnel de votre service de Médecine et Santé au travail et du laboratoire de métrologie. Nous vous contacterons prochainement afin de convenir des modalités d'intervention.

Les résultats de cette campagne relatifs à votre entreprise, attendus pour 2020, vous seront communiqués. Ils permettront de vous proposer si nécessaire d'éventuelles actions de prévention adaptées à votre entreprise afin de mieux maîtriser ce risque.

Par ailleurs, nous vous informons que toutes les données recueillies durant cette campagne seront traitées anonymement et que seuls les résultats exploités statistiquement feront l'objet d'une diffusion.

Je reste à votre disposition pour toutes informations complémentaires.

Je vous prie d'agréer, Madame/Monsieur, l'assurance de ma considération distinguée.

Signature