

Université de Montréal

Influence de la taille de départ, de l'état d'agglomération et de la dose de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) inhalées sur la réponse pulmonaire chez le rat

par

Alexandra Noël

Département de Santé environnementale et santé au travail, École de Santé publique
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en santé publique
option : toxicologie et analyse du risque

février 2013

© Alexandra Noël, 2013

Résumé

Il est estimé que plus de 10 millions d'emplois associés aux nanotechnologies seront créés mondialement d'ici 2014. Il est donc primordial de se préoccuper des effets des nanoparticules (NP) sur la santé humaine. En raison de leur petite taille, les NP (< 100 nm) peuvent coaguler très rapidement ce qui favorise leur pénétration dans l'organisme sous forme d'agglomérats. Or, peu d'études ont évalué la toxicité pulmonaire en considérant les propriétés physico-chimiques des NP tout comme la taille des agglomérats formés dans les aérosols. L'objectif de cette recherche est d'étudier l'influence de l'état d'agglomération de NP de dioxyde de titane (TiO₂) de trois tailles de départ différentes, 5, 10-30 ou 50 nm sur la toxicité pulmonaire chez le rat mâle (F344) exposé à des aérosols de 2, 7 ou 20 mg/m³ pendant 6 heures.

Dans une chambre d'inhalation, six groupes de rats (n = 6 par groupe) ont été exposés par inhalation aiguë nez-seulement à des aérosols ayant une taille primaire de 5 nm, mais produits sous forme faiblement (< 100 nm) ou fortement (> 100 nm) agglomérée à 2, 7 et 20 mg/m³. De façon similaire, quatre autres groupes de rats ont été exposés à 20 mg/m³ à des aérosols ayant une taille primaire de 10-30 et 50 nm. Les différents aérosols ont été générés par nébulisation à partir de suspensions ou par dispersion à sec. Pour chaque concentration massique, un groupe de rats témoins (n = 6 par groupe) a été exposé à de l'air comprimé dans les mêmes conditions. La taille, la forme, la structure et l'état d'agglomération des NP, dans les poudres de départ et dans les aérosols générés, ont été caractérisés par microscopie électronique à transmission et à l'aide d'un impacteur électrique à basse pression. Les concentrations massiques ont été déterminées par mesures gravimétriques. Les animaux ont été sacrifiés 16

heures après la fin de l'exposition et les lavages broncho-alvéolaires ont permis de doser des marqueurs d'effets inflammatoires (comptes cellulaires totaux et différentiels, ainsi que certaines cytokines : IL-1 α , IL-6, MIP-1 α , MCP-1 et TNF- α), cytotoxiques (lactate déshydrogénase (LDH), alcaline phosphatase et concentration en protéines totales) et de stress oxydant (hème oxygénase-1, glutathion et 8-isoprostane). Des coupes histologiques de poumons ont également été analysées.

L'influence de l'état d'agglomération des NP de TiO₂ n'a pu être discriminée à 2 mg/m³. Aux concentrations massiques de 7 et 20 mg/m³, nos résultats montrent qu'une réponse inflammatoire aiguë (augmentation du nombre de neutrophiles) est induite suite à l'exposition aux aérosols fortement agglomérés. En plus de cette réponse, l'exposition aux aérosols faiblement agglomérés à 20 mg/m³ s'est traduite par une augmentation significative de la 8-isoprostane et de la LDH. À 20 mg/m³, les effets cytotoxiques étaient plus importants suite à l'exposition aux NP de 5 nm faiblement agglomérées. En raison du travail significatif effectué pour générer et caractériser les aérosols, ces travaux ont montré dans l'ensemble que différents mécanismes de toxicité pulmonaire peuvent être empruntés par les NP de TiO₂ en fonction de la taille de départ et de l'état d'agglomération.

Mots-clés : Nanoparticules, dioxyde de titane (TiO₂), inhalation, taille de départ, état d'agglomération, toxicité pulmonaire, inflammation, stress oxydant, cytotoxicité.

Abstract

It is estimated that by 2014 more than 10 million jobs related to the nanotechnology field will be created worldwide. It is therefore important to investigate the possible health effects caused by nanoparticles (NP). Due to their small size, NP (< 100 nm) can coagulate quickly, which promotes their entry into the body in the form of agglomerates. However, few studies have evaluated their pulmonary toxicity, considering the physicochemical properties of NP, as well as the size of the agglomerates formed in the aerosols. The objective of this study is to evaluate the influence of the agglomeration state of three different primary particle sizes (5, 10-30 and 50 nm) of titanium dioxide (TiO₂) NP on the pulmonary toxicity of male rats (F344) exposed to aerosols at 2, 7 or 20 mg/m³ for 6 hours.

In an inhalation chamber, six groups of rats (n = 6 per group) were acutely exposed by nose-only inhalation to aerosols with a 5-nm primary particle size, produced in the form of small agglomerates (< 100 nm) (SA) or large agglomerates (> 100 nm) (LA) at 2, 7 and 20 mg/m³. Similarly, four other groups of rats were exposed to aerosols at 20 mg/m³ with a primary particle size of 10-30 and 50 nm. The different aerosols were generated by nebulization of suspensions or by dry dispersion. For each mass concentration, one group of control rats (n = 6 per group) was exposed to compressed air under the same conditions. The size, shape, structure and agglomeration state of NP in both the bulk powders and the generated aerosols were characterized by transmission electron microscopy and using an electrical low pressure impactor. Mass concentrations were determined by gravimetric measurements. The animals were sacrificed 16 hours after the end of exposure, and analysis of the bronchoalveolar lavage

fluids was used to measure markers of inflammatory (total and differential cell counts, as well as various cytokines: IL-1 α , IL-6, MIP-1 α , MCP-1 and TNF- α), cytotoxicity (lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase and total protein concentration) and oxidative stress (heme oxygenase-1, glutathione and 8-isoprostane) effects. Lung sections were also analyzed for histopathology.

The influence of the agglomeration state of TiO₂ NP (5 nm) could not be determined at 2 mg/m³. For mass concentrations of 7 and 20 mg/m³, our results showed that an acute inflammatory response (increase in the number of neutrophils) was induced following exposure to LA aerosols. In addition to this response, exposure to SA aerosols resulted in a significant increase in 8-isoprostane and LDH. At 20 mg/m³, the cytotoxic effects were greater after exposure to the 5-nm NP in the SA aerosol. Given the significant work done to generate and characterize aerosols, this study showed that TiO₂ NP use different mechanisms to induce their pulmonary toxicity as a function of their primary particle size and their agglomeration state.

Keywords: Nanoparticles, titanium dioxide (TiO₂), inhalation, primary particle size, agglomeration state, pulmonary toxicity, inflammation, oxidative stress, cytotoxicity.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiv
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 CONTEXTE ET DÉFINITIONS	1
1.2 COMPORTEMENT AÉRODYNAMIQUE DES NANOPARTICULES ET PRINCIPES DE BASE DES MÉTHODES DE GÉNÉRATION ET DE CARACTÉRISATION DES NANO-AÉROSOLS.....	6
<i>Agglomération</i>	7
<i>Génération de nano-aérosols</i>	10
<i>Caractérisation de nano-aérosols</i>	12
1.3 TOXICOCINÉTIQUE PULMONAIRE — ÉTUDES PAR INHALATION PORTANT SUR LES NP D’OXYDE MÉTALLIQUE ET REVUE DE LEURS PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES D’INTÉRÊT TOXICOLOGIQUE	14
<i>Absorption/déposition</i>	19
<i>Distribution/translocation</i>	24
<i>Élimination</i>	29
<i>Résumé cinétique pulmonaire</i>	32
1.4 MÉCANISMES D’ACTION DES NP – PARADIGME STRESS OXYDANT ET INFLAMMATION.....	32
1.5 CHOIX DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE.....	37
1.6 TOXICITÉ ET INFLAMMATION PULMONAIRE — ÉTUDES <i>IN VIVO</i> SUR LES NP DE TiO ₂ PAR VOIE D’INHALATION	39
1.7 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	52
<i>Hypothèses</i>	52

<i>Objectif général</i>	53
<i>Objectifs spécifiques</i>	53
Chapitre 2 - Generating nano-aerosols from TiO₂ (5 nm) nanoparticles showing different agglomeration states. Application to toxicological studies	55
2.1 ABSTRACT.....	56
2.2 INTRODUCTION.....	57
2.3 MATERIALS AND METHODS	59
2.4 RESULTS	65
2.5 DISCUSSION	68
2.6 CONCLUSION.....	75
2.7 REFERENCES	77
Chapitre 3 - Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs	91
3.1 ABSTRACT.....	92
3.2 INTRODUCTION.....	93
3.3 MATERIALS AND METHODS	97
3.4 RESULTS	102
3.5 DISCUSSION	105
3.6 CONCLUSION.....	114
3.7 REFERENCES	116
Chapitre 4 - Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO₂: effect of primary particle size and agglomeration state	147
4.1 ABSTRACT.....	148
4.2 INTRODUCTION.....	149
4.3 MATERIALS AND METHODS	154
4.4 RESULTS	161
4.5 DISCUSSION	166
4.6 CONCLUSION.....	175
4.7 REFERENCES	177
Chapitre 5 – Relation dose – réponse et métrique d’exposition pour les NP de TiO₂ de 5 nm	210
Chapitre 6 – Discussion générale	219

6.1 DÉVELOPPEMENT DE SYSTÈMES DE GÉNÉRATION ET DE CARACTÉRISATION DE NANO-AÉROSOLS	219
6.2 TOXICITÉ PULMONAIRE INDUITE PAR DES NANOPARTICULES DE TiO ₂ CHEZ LE RAT	221
6.3 RELATIONS DOSE-RÉPONSES POUR LES NANOPARTICULES DE TiO ₂ DE TAILLE DE DÉPART 5 NM	228
6.4 MÉCANISMES D'ACTION HYPOTHÉTIQUES DES NANOPARTICULES DE TiO ₂	230
6.5 RÉFLEXION SUR LES MÉTRIQUES D'EXPOSITION POUR LES NANOPARTICULES DE TiO ₂ ...	235
Chapitre 7 - Conclusion.....	240
Bibliographie	243

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau I Relation entre la taille de particules sphériques et l'aire de surface calculée pour une masse totale de 523 µg et une densité de 1	16
Tableau IIA Études sur le TiO ₂ <i>in vivo</i> par voie d'inhalation — Expositions aiguës < 24 h ...	46
Tableau IIB Études sur le TiO ₂ <i>in vivo</i> par voie d'inhalation — Expositions sub-aiguës < 4 semaines	47
Tableau IIC Études sur le TiO ₂ <i>in vivo</i> par voie d'inhalation — Expositions sub-chroniques 12 ou 13 semaines et chroniques	49

CHAPITRE 2

Table I Experimental conditions for nano-aerosol generation.....	83
Table II Measurements of nano-aerosols	84

CHAPITRE 3

Table 1 Bulk powder NP characterization of 5 nm TiO ₂	137
Table 2 Measurements and characterization of the nano-aerosols	138

CHAPITRE 4

Table 1 Bulk powder characterization of TiO ₂ NP	197
Table 2 Measurements and characterization of the nano-aerosols	198

CHAPITRE 5

Tableau III Résumé des résultats des 10 expositions aiguës aux NP de TiO ₂	227
---	-----

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1. Prédiction pendant la respiration nasale du dépôt fractionnaire de particules inhalées dans les voies respiratoires.....	20
Figure 2. Mécanismes d'action hypothétiques des NP.....	36

CHAPITRE 2

Figure 1. Experimental setups for the generation of nano-aerosols.....	85
Figure 2. Nano-TiO ₂ bulk powder TEM characterization	86
Figure 3. Size distribution profiles of nano-aerosols measured by the ELPI	87
Figure 4. Cumulative distributions based on number concentration of nano-aerosols measured by the ELPI	88
Figure 5. Nano-TiO ₂ agglomerates collected from the nano-aerosols at 7 mg/m ³	89
Figure 6. Nano-TiO ₂ agglomerates collected from the nano-aerosols at 2 mg/m ³	90

CHAPITRE 3

Figure 1. TEM characterization of the bulk nano-TiO ₂ powder.....	139
Figure 2. Computed fractional deposition of NP agglomerates in the rat respiratory tract	140
Figure 3. Percentage of different leukocytes from BAL.....	141
Figure 4. BALF cytology analyzed by the cytopspin method.	142
Figure 5. Macrophage inflammation markers.....	143
Figure 6. BALF cytotoxicity markers.....	144
Figure 7. BALF oxidative stress markers	145
Figure 8. Cell morphology from BALF cytopreparations of rats	146

CHAPITRE 4

Figure 1. Experimental set-up for the generation of small agglomerate aerosols	199
Figure 2. Cumulative distributions of the nano-aerosols	200

Figure 3. Nano-aerosol agglomerate structure observed by transmission electron microscopy	201
Figure 4. Computed fractional deposition of NP agglomerates in the rat respiratory tract	202
Figure 5. BALF cytology analyzed by the cytopspin method	203
Figure 6. Relative levels of BALF pro-inflammatory cytokines	204
Figure 7. BALF cytotoxicity (LDH) and oxidative stress (8-isoprostane) markers	205
Figure 8. Representative cell morphology from BALF cytopreparations of rats	206
Figure 9. Optical microscopy images of representative caudal right lobe lung sections.....	207
Figure 10. Optical microscopy images of lung tissue sections.....	209

CHAPITRE 5

Figure 1. Cytologie des lavages broncho-alvéolaires	211
Figure 2. Marqueurs de cytotoxicité (LDH) et de stress oxydant (8-isoprostane).....	213
Figure 3. Images obtenues par microscopie optique de cellules recueillies dans les lavages broncho-alvéolaires de rats témoins et exposés aux NP de 5 nm	214
Figure 4. Relation entre les augmentations de niveaux de neutrophiles dans les LBA de rats exposés aux NP de 5 nm et la concentration massique fonction de l'état d'agglomération...	216
Figure 5. Relation entre les augmentations de niveaux de LDH dans les LBA de rats exposés aux NP de 5 nm et la concentration massique fonction de l'état d'agglomération.....	217
Figure 6. Relation entre les augmentations de niveaux de 8-isoprostane dans les LBA de rats exposés aux NP de 5 nm et la concentration massique fonction de l'état d'agglomération...	218

CHAPITRE 6

Figure 1. Mécanismes d'action hypothétiques de NP de TiO ₂ en fonction de la taille des agglomérats.....	234
---	-----

Liste des abréviations

En français

FRSQ : Fonds de la recherche en santé du Québec

GSH : Glutathion

HO-1 : Hème-oxygénase-1

IL-1 α : Interleukine 1 α

IL-1 β : Interleukine 1 β

IL-6 : Interleukine 6

IFN- γ : Interféron gamma (γ)

IRSPUM : Institut de recherche en santé publique de l'Université de Montréal

IRSST : Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

LDH : Lactate déshydrogénase

NP : Nanoparticules

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

RRSE : Réseau de recherche en santé environnementale

RRSSTQ : Réseau de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec

TiO₂ : Dioxyde de titane

En anglais

ALP : Alkaline phosphatase

BAL : Broncho-alveolar lavage

BALF : Broncho-alveolar lavage fluid

CCL2 : Chemokine C-C motif ligand 2 or MCP-1

CCL3 : Chemokine C-C motif ligand 3 or MIP-1 α

CCL5 : Chemokine C-C motif ligand 5 or RANTES

CCL20 : Chemokine C-C motif ligand 20 or MIP-3 α

CD54 : Cluster of differentiation 54 or ICAM 1

CINC-3 : Cytokine induced neutrophil chemoattractant 3
CXCL1 : Chemokine C-X-C motif ligand 1
CXCL7 : Chemokine C-X-C motif ligand 7
EDS : X-ray spectrometric analysis
XRD : X-ray diffraction
D₂₅: Aerodynamic diameters for which 25% of the particles in the aerosol are smaller than this value
D₅₀ : Aerodynamic diameters for which 50% of the particles in the aerosol are smaller than this value
D₇₅ : Aerodynamic diameters for which 75% of the particles in the aerosol are smaller than this value
ELPI : Electrical low pressure impactor
FEG : Field emission gun
ICAM 1 : Intercellular adhesion molecule 1 or CD54
MPPD: Multiple-path dosimetry model
Nano-TiO₂ / nTiO₂: Nanoparticles of TiO₂
NMAD : Number median aerodynamic diameter
NP : Nanoparticles
LA : Large agglomerates (> 100 nm)
MCP-1 : Monocyte chemotactic protein 1 or CCL2
MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein 1 α or CCL3
MIP-3 α : Macrophage inflammatory protein 3 α or CCL20
RANTES : Regulated and normal T cells expressed and secreted or CCL5
RH : Relative humidity
SA : small agglomerates (< 100 nm)
SEM : Standard error on the mean
TEM : Transmission electron microscopy
TiO₂ : Titanium dioxide
TIMP-1 : Tissue inhibitor matrix proteinase 1
TNF- α : Tumor necrosis factor α

Je dédie cette thèse à ma grand-mère Mme Rita Duchemin-Olivier, ainsi qu'à mes parents M. Frantz Noël et Mme Michaëlle Olivier-Noël pour leur soutien.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dre Ginette Truchon de m'avoir accueillie à l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé en et sécurité du travail (IRSST) et d'avoir dirigé mes travaux de thèse. Dr Robert Tardif, de m'avoir accueillie au laboratoire d'inhalation de l'Université de Montréal et d'avoir co-dirigé mes travaux. M. Yves Cloutier, ingénieur et Dre Chantal Dion, pour leurs conseils précieux dans leurs domaines d'expertise respectifs et pour m'avoir guidée tout au long de ma recherche. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Les Drs Karim Maghni du centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal et Michel Charbonneau de l'Institut national de recherche scientifique (INRS) - Institut Armand-Frappier de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires. Tous les chercheurs et collègues avec qui j'ai collaboré dans des projets de recherche, particulièrement les Drs Joseph Zayed, Stéphane Hallé, Kevin James Wilkinson, Andrea Scarino et Julie Boucher.

Mes remerciements vont aussi à Ginette Charest-Tardif de l'Université de Montréal, Guylaine Lassonde de l'INRS-Institut Armand Frappier, ainsi qu'à Mélanie Welman et Lucero Castellanos du centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, pour le soutien technique. Je veux également remercier tout le personnel de l'IRSST, pour son accueil au sein de cette institution, avec un merci tout spécial à Annie Ouellet, Brigitte Blanchette et Claude Létourneau.

Je termine avec un merci particulier à ma famille, Frantz Sr Noël, Michaëlle O. Noël, Frantz Jr Noël, Natacha Noël, Nicolas Noël, Evens Examé et à tous mes ami(e)s et collègues étudiants, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ma recherche.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Contexte et définitions

La nanotechnologie représente des enjeux économiques et scientifiques majeurs pour l'avenir. Étant en forte croissance et considérée comme le pilier de la prochaine révolution industrielle, elle est un axe de recherche prioritaire pour les pays industrialisés. De 2000 à 2011, les gouvernements mondiaux ont financé la recherche et le développement dans ce domaine novateur à la hauteur de 67,5 milliards de dollars américains. Toutes sources de revenus confondues, on anticipe que ces investissements atteindront environ 250 milliards de dollars en 2015 (Research and Markets, 2011). Au Canada, on dénombre déjà plus d'une centaine d'entreprises qui évoluent dans des secteurs de pointe comme la fabrication ou les services liés aux nanomatériaux et aux nanocomposites (Industries Canada, 2011). Le Québec y est d'ailleurs un pôle stratégique significatif (MDEIE, 2012; NanoQuébec, 2010). En effet, les propriétés quantiques et de surfaces, spécifiques aux nanomatériaux, sont très convoitées dans le secteur industriel et servent à améliorer la qualité et l'efficacité de certains produits de consommation (Gwinn et Vallyathan, 2006; Stone *et coll.* 2007; Ahamed *et coll.* 2008). En 2010, on dénombrait déjà sur le marché plus de 1 200 produits issus des nanotechnologies (McIntyre, 2012), comme des produits pharmaceutiques, cosmétiques, électroniques et des semi-conducteurs (Kurath et Maasen, 2006; Stone *et coll.* 2007; Tetley, 2007; Monteiro-Riviere et Tran, 2007; Warheit, 2008). Selon Lux Research, une firme de recherche et de conseils sur les technologies émergentes, d'ici 2014 plus de 10 millions d'emplois associés aux nanotechnologies seront créés. Ainsi, le nombre de travailleurs potentiellement exposés

aux nanomatériaux par inhalation ou par voie percutanée croît rapidement (Nel *et coll.* 2006; Stone *et coll.* 2007; Tetley, 2007; Donaldson et Borm, 2007; Hester et Harisson, 2007; Warheit, 2008). Il est donc primordial de se préoccuper des effets des particules utilisées ou générées par cette technologie sur la santé humaine.

Domaine multidisciplinaire aux frontières de la physique, la chimie, la biologie et l'ingénierie, la Société Royale et l'Académie Royale d'Ingénierie de la Grande-Bretagne définissent la nanoscience et la nanotechnologie comme suit :

« La nanoscience est l'étude de phénomènes et la manipulation de la matière à l'échelle atomique, moléculaire et macromoléculaire, où les propriétés diffèrent de manière significative de celles à plus grande échelle. Les nanotechnologies sont la conception, la caractérisation, la production et l'application de structures, instruments et systèmes en contrôlant la forme et la taille à l'échelle nanométrique » (Royal Society, 2004).

En général, une particule est un petit élément discret de matière (Morawska, 2001). Bien qu'il existe des nanoparticules (NP) de nature biologique, tels les virus et les endosomes, dans le cadre de cette thèse, on définit une NP comme étant une particule structurée intentionnellement par l'homme et ayant au moins une de ses dimensions plus petite ou égale à 100 nm (Oberdöster *et coll.* 2005a et b). Les nanomatériaux sont classés en différentes catégories : nanotubes de carbone, puits quantiques, dendrimères, fullerènes, ainsi que les NP de nature métallique, d'oxydes de métaux, organiques ou inorganiques. Les particules

ultrafines possèdent également une dimension nanométrique, soit un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 100 nm, mais elles correspondent pour leur part à des produits dérivés de procédés industriels courants, comme ceux utilisés dans la fabrication d'alliages de métaux ou encore celles issues de phénomènes naturels comme les éruptions volcaniques (Oberdörster *et coll.* 2005a). Ces particules peuvent aussi se retrouver sous forme fine, c'est-à-dire de dimension variant entre 100 et 3000 nm (NIOSH, 2011).

La nanotoxicologie vise à caractériser et documenter les effets des NP sur les organismes vivants. Cette sous-discipline de la toxicologie des particules se base sur l'hypothèse qu'à masse égale et pour une même composition chimique, les NP, ayant une dimension inférieure à 100 nm, sont plus toxiques que leurs équivalentes sous forme fine (Donaldson *et coll.* 2004; Oberdörster *et coll.* 2005a et b; Monteiro-Riviere et Tran, 2007; Stone *et coll.* 2007). En effet, des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que certaines NP, comparativement aux particules fines, induisent des effets néfastes sur les cellules et les systèmes biologiques (Oberdörster *et coll.* 1994; Alessandrini *et coll.* 2006; Kaewamatawong *et coll.* 2006; Monteiller *et coll.* 2007; Sager *et coll.* 2008; Jacobsen *et coll.* 2009). En raison de leur petite taille, les NP peuvent se localiser dans des vésicules à l'intérieur des cellules et peuvent également atteindre des cibles cellulaires, telles que les mitochondries, non accessibles aux plus grosses particules (Li *et coll.* 2003; Takenaka *et coll.* 2006; Singh *et coll.* 2007). La taille nanométrique est donc un paramètre fondamental à considérer dans les études toxicologiques (Nel *et coll.* 2006; Mossman *et coll.* 2007; Stone *et coll.* 2007; Yang *et coll.* 2008; Maier *et coll.* 2008; Noël et Truchon, 2009).

La recherche quant aux effets sur la santé des NP pose de nouveaux défis à la communauté scientifique, notamment en raison de la caractérisation des propriétés physico-chimiques des NP aux étapes critiques de l'expérimentation (Nel *et coll.* 2006; Warheit *et coll.* 2007c; Balbus *et coll.* 2007; Ma-Hock *et coll.* 2007; Hervé-Bazin, 2007; Landsiedel *et coll.* 2012). En effet, les NP sont très réactives et elles ont tendance à s'agglomérer très facilement lorsqu'elles entrent en contact les unes avec les autres, que ce soit dans les poudres de départ ou les aérosols générés en milieu de travail ou en laboratoire (Powers *et coll.* 2006). L'agglomération des NP augmente en fonction de la distance. Ainsi, selon la distance qui sépare la source de NP et le travailleur, les expositions aux NP peuvent se produire sous différents états d'agglomération. Ce potentiel des NP à coaguler très rapidement peut donc favoriser leur pénétration dans l'organisme sous forme d'agglomérats (Powers *et coll.* 2006). Par contre, certains traitements de surface appliqués aux NP peuvent réduire, voire limiter cette agglomération. La détermination de l'état d'agglomération des NP dans le vecteur d'exposition est donc essentielle afin de faire une corrélation adéquate entre les caractéristiques de la dose et les effets biologiques (Oberdörster, 2001; Nel *et coll.* 2006; Warheit *et coll.* 2006 et 2007a, b et c; Monteiller *et coll.* 2007; Xia *et coll.* 2008; Jacobsen *et coll.* 2009).

Dans le contexte de la santé au travail, plusieurs auteurs se questionnent sur la meilleure métrique (masse, forme, volume, aire de surface, distribution granulométrique ou nombre) à utiliser pour exprimer la dose des NP et ainsi évaluer le risque professionnel (Ferin *et coll.*

1992; Monteiller *et coll.* 2007; Sager *et coll.* 2008; Jacobsen *et coll.* 2009). Selon plusieurs études, la mesure de l'aire de surface serait l'approche à privilégier (Oberdörster *et coll.* 1994 et 2007; Oberdörster, 2010; Renwick *et coll.* 2001; Dick *et coll.* 2003). Cependant, il n'y a toujours pas d'accord consensuel à ce sujet (Oberdörster *et coll.* 2005a et b; Wittmaack, 2007; Fischer et Chan, 2007; Pauluhn, 2011). En effet, de récents travaux démontrent qu'en plus de l'aire de surface, d'autres caractéristiques associées à l'aérosol inhalé, telles que l'état d'agglomération, la densité des agglomérats et la nature chimique de la NP, comme la phase cristalline, doivent également être considérées (Warheit *et coll.* 2006, 2007a et b; Gojova *et coll.* 2007; Pauluhn 2009a et b, 2010; Ho *et coll.* 2011). Plusieurs de ces mesures sont d'intérêt dans un contexte de recherche, toutefois la mesure de la masse et de la taille des particules, pour une même espèce chimique, pourrait représenter une meilleure alternative pour l'évaluation du risque à la santé associé à l'exposition en milieu professionnel. Ainsi, jusqu'à ce que les mécanismes d'action des NP soient bien documentés, il est souhaitable de mesurer et caractériser l'ensemble des paramètres définissant la dose (Gojova *et coll.* 2007).

Actuellement, on retrouve un nombre important et croissant d'articles scientifiques et de rapports gouvernementaux portant sur les risques appréhendés pour la santé liés aux NP et aux nanotechnologies (Seaton et Donaldson, 2005; Hervé-Bazin, 2007; Afsset, 2008). Cependant, l'état de la recherche i) nous montre qu'il est difficile de tirer des conclusions probantes en raison des lacunes dans la caractérisation et des différentes conditions expérimentales utilisées dans les études et ii) met en évidence la nécessité impérieuse de se doter de méthodologies validées et harmonisées. La réalisation d'études toxicologiques fiables et reproductibles

pouvant mener éventuellement à la mise en place d'actions préventives, pertinentes et efficaces, repose donc non seulement sur une caractérisation rigoureuse des propriétés physico-chimiques des NP, mais aussi sur la caractérisation des aérosols auxquels les sujets sont exposés (Royal Society, 2004; Thomas et Sayre, 2005; Thomas *et coll.* 2006a et b). En effet, peu d'études ont utilisé des méthodologies rigoureuses pour caractériser la dose d'exposition aux NP (Holsapple *et coll.* 2005; Warheit, 2008; Ahamed *et coll.* 2008). Les données disponibles sur la cinétique et la toxicité pulmonaire des NP demeurent donc fragmentaires et incomplètes.

Dans ce contexte, une approche multidisciplinaire est incontournable et à privilégier pour une évaluation et une caractérisation adéquate de la relation exposition – effets des NP. De plus, l'avènement des nanotechnologies crée particulièrement un besoin urgent d'expertise en nanotoxicologie afin i) de prévenir les effets sur les individus exposés, comme le développement de maladies pulmonaires professionnelles, ii) de comprendre les mécanismes de toxicité *in vivo* des NP, et surtout, iii) de documenter les effets systémiques et ceux sur le système respiratoire (Simeonova *et coll.* 2007; Stone *et coll.* 2007).

1.2 Comportement aérodynamique des nanoparticules et principes de base des méthodes de génération et de caractérisation des nano-aérosols

Les voies respiratoires sont la principale porte d'entrée des NP dans l'organisme (Chen *et coll.* 2008; Ladsiedel *et coll.* 2012). Les expositions par instillation intratrachéale résultent en des différences au niveau de la déposition pulmonaire et de la dose rejoignant l'organe cible comparativement à la voie d'inhalation (Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.* 1992; Grassian *et coll.* 2007b; Ladsiedel *et coll.* 2012). Par conséquent, il y a également des différences quant à l'induction d'effets toxiques faisant suite à des expositions par ces deux voies d'administration (Grassian *et coll.* 2007b; Ladsiedel *et coll.* 2012). L'inhalation est la voie la plus représentative de l'exposition réelle humaine en milieu de travail et est donc aussi la plus appropriée pour obtenir des données cinétiques et toxicologiques sur les NP (Pauluhn *et Mohr*, 2000; Pauluhn, 2005 et 2008; Chen *et coll.* 2008; Jacobsen *et coll.* 2009; Ladsiedel *et coll.* 2012). Toutefois, très peu d'études par inhalation ont été conduites jusqu'à maintenant en raison de la complexité à générer et caractériser les aérosols. En effet, la compréhension du comportement aérodynamique des NP est essentielle afin de caractériser la dose d'exposition. Ainsi, la génération de nano-aérosols nécessite la prise en compte de plusieurs paramètres dont la taille de départ, la concentration et l'agglomération des NP.

Agglomération

Du fait de leur petite taille, de leur aire de surface et de leur grande réactivité, les NP qui entrent en collision peuvent se lier entre elles et former des agrégats ou des agglomérats (Afsset, 2006; Grassian *et coll.* 2007b). Un agrégat est constitué de particules fermement liées entre elles par des liens covalents ou chimiques et ne pouvant plus se séparer en éléments individuels. Ceci se produit habituellement lors du processus de synthèse (Afsset, 2006). Par

opposition, un agglomérat est formé d'agrégats ou de particules seules, liées par des forces physiques de Van der Waals, électrostatiques ou de tensions de surface, permettant théoriquement un retour aux éléments de départ (Friedlander, 2000; Afsset, 2006). L'agglomération des NP est un processus rapide qui dépend de plusieurs facteurs, dont la taille et la concentration des NP, la température et le temps de résidence (Powers *et coll.* 2007). Les études actuellement publiées s'entendent sur le fait que le diamètre moyen des particules tend à croître en fonction du temps. De plus, plusieurs variables peuvent influencer l'agencement structurel des agglomérats de NP, entre autres, la taille initiale, la composition chimique, la méthode de production/génération, la concentration et l'espace géométrique (Hinds, 1999). Plus la particule est petite, plus la force d'attraction par unité de masse est importante ce qui favorise leur agglomération (Preining, 1998). Il y a aussi une relation au carré entre l'augmentation de la concentration massique et l'augmentation du taux d'agglomération, car la probabilité de collision entre les NP est fonction de leur nombre par unité de volume et donc la vitesse de formation d'agglomérats est directement influencée par la concentration (Hinds, 1999). Toutefois, selon Hinds (1999), le phénomène d'agglomération est négligeable si la concentration des particules est inférieure à 10^5 particules/cm³ dans le cas d'un aérosol constitué de particules de diamètre identique. Également, l'agglomération diminue la densité des particules résultantes (DeCarlo *et coll.* 2004). Par conséquent, le phénomène d'agglomération mène i) à la formation de particules de plus grande dimension et de différentes formes, entraînant par le fait même une diminution de la concentration en nombre dans les aérosols générés, décalant ainsi la distribution granulométrique vers de plus grandes valeurs et ii) à une augmentation du diamètre nominal des particules (Hinds, 1999; Afsset, 2006).

Tous ces facteurs influencent la structure des agglomérats qui peut être définie comme étant lâche, c'est-à-dire avec des espaces vides entre les NP, ou compacte avec peu ou pas d'espaces vides (Grassian *et coll.* 2007b). Les agglomérats formés dans les aérosols peuvent être de tailles semblables tout en présentant une structure lâche ou compacte et tout en étant constitués de particules dont la taille de départ est différente (Grassian *et coll.* 2007b). Par conséquent, la caractérisation de la structure des agglomérats est absolument nécessaire.

De plus, l'agglomération qui cause une augmentation du diamètre moyen des particules accélère également la sédimentation de l'aérosol en augmentant la force d'attraction gravitationnelle sur les NP. Plusieurs études mentionnent que l'importance de la sédimentation est directement reliée au diamètre aérodynamique de la particule. Selon Lechner et Mächtle (1999), le phénomène de sédimentation est négligeable comparativement à la diffusion brownienne pour des diamètres inférieurs à 50 nm. Dans l'ensemble, l'agglomération des NP est un facteur clé impliqué dans la génération des nano-aérosols, particulièrement pour les oxydes métalliques (Grassian *et coll.* 2007a et b; Ma-Hock *et coll.* 2007 et 2009; Ho *et coll.* 2011; Morimoto *et coll.* 2011; Ogami *et coll.* 2011; Geraets *et coll.* 2012). En effet, selon ces études, l'agglomération peut être importante et les expositions réelles par inhalation sont souvent sous la forme d'agglomérats plutôt qu'à des NP sous forme individuelle (Grassian *et coll.* 2007a et b; Ma-Hock *et coll.* 2007 et 2009; Srinivas *et coll.* 2011).

Génération de nano-aérosols

La génération d'aérosols stables, homogènes et reproductibles est importante afin de s'assurer d'avoir des méthodologies de recherche valides en nanotoxicologie. Le choix de la méthode de génération d'un aérosol dépend essentiellement des caractéristiques que l'on souhaite donner à ce dernier en fonction de l'hypothèse de recherche. Bien qu'il existe un grand nombre de techniques et de procédés, les méthodes de génération de poudres sont habituellement classées en deux grandes catégories : i) la dispersion mécanique et ii) la condensation de vapeurs (Tillery *et coll.* 1976). La dispersion mécanique se fait à partir de la poudre sèche placée directement dans un générateur. Les appareils disponibles commercialement utilisent différentes techniques (brosse en rotation, lit fluidisé, etc.) et un débit d'air pour disperser les particules dans le milieu ambiant (Tillery *et coll.* 1976). De nombreuses études ont montré que l'insertion de nano-poudres dans de tels générateurs produit des aérosols fortement agglomérés (> 100 nm) (Serita *et coll.* 1990; Ma-Hock *et coll.* 2007 et 2009; Nurkiewicz *et coll.* 2008; Myojo *et coll.* 2009; Kondej et Sosnowski, 2010; Rossi *et coll.* 2010). Puisque l'on sait que l'agglomération augmente en fonction de la distance et du temps, la dispersion mécanique de poudre peut être avantageuse dans le cas où l'on cherche à étudier les effets engendrés par des aérosols agglomérés et ainsi tenter de reproduire un possible scénario d'exposition professionnelle. Par contre, il est difficile de maintenir des concentrations massiques et numériques stables sur une longue période de temps avec ces générateurs (Tillery *et coll.* 1976). La technique basée sur la condensation de vapeur disperse des gouttelettes de particules maintenues en suspension dans un liquide. Des générateurs de type nébuliseurs ou atomiseurs sont utilisés à cet effet (Tillery *et coll.* 1976). La distribution granulométrique de l'aérosol produit avec cette technique dépendra principalement du débit d'air passant à travers l'orifice

du nébuliseur. Un plus grand débit d'air génère de plus petites gouttelettes (Tillery *et coll.* 1976; Shimada *et coll.* 2009). Selon la littérature, les aérosols produits à partir de suspensions ont tendance à contenir de plus petits agglomérats (Grassian *et coll.* 2007a et b; Ma-Hock *et coll.* 2007; Wong, 2007; Schmoll *et coll.* 2009; Kim *et coll.* 2010). Dans cette thèse, les termes aérosols faiblement et fortement agglomérés font référence à des aérosols constitués d'agglomérats dont les diamètres médians sont respectivement inférieurs ou supérieurs à 100 nm.

Puisque les NP s'agglomèrent très facilement, le principal défi est de favoriser la génération d'aérosols faiblement agglomérés (< 100 nm), ayant une concentration massique stable et assez élevée pour répondre aux besoins des études toxicologiques. Pour relever ce défi, on peut utiliser les avantages qu'offrent les différentes techniques de génération des particules actuellement disponibles commercialement. Les techniques privilégiées pour contrôler le phénomène d'agglomération impliquent, entre autres, l'utilisation de nébuliseurs à très haut débit, la dispersion rapide de l'aérosol par dispersion directe dans la chambre d'inhalation, l'ajout d'un débit de dilution plus ou moins élevé à celui du débit de génération et l'ajout d'instrument de type Venturi dispersant les aérosols. Cependant, jusqu'à maintenant, peu d'études semblent avoir appliqué ces techniques, notamment en raison des coûts et de l'expertise qui y sont associés. La combinaison de différents générateurs en parallèle est donc une approche prometteuse qui peut être modulée en fonction des caractéristiques recherchées de l'aérosol (Tillery *et coll.* 1976; Schmoll *et coll.* 2009; Shimada *et coll.* 2009; Kim *et coll.* 2010).

Caractérisation de nano-aérosols

Les caractéristiques d'intérêt de l'aérosol généré doivent être mesurées, notamment la concentration en masse et en nombre, l'aire de surface ainsi que la distribution granulométrique (Tillery *et coll.* 1976). Il est nécessaire de différencier deux types d'aérosol, soit monodisperse et polydisperse (ou hétérodisperse). Le premier type est un aérosol composé de particules de diamètre identique, devant pour certains auteurs avoir un écart-type géométrique (GSD) $\leq 1,22$. Le second implique une distribution plus grande du diamètre des particules dans l'aérosol (GSD $> 1,22$) (Fuchs et Sutugin, 1966; Tillery *et coll.* 1976). Il faut préciser que plusieurs types de diamètres peuvent être utilisés pour définir un même aérosol et que de nombreux instruments, basés sur différents principes de fonctionnement (image à deux dimensions, densité, vitesse de sédimentation, mobilité électrique, diffusion de la lumière, etc.), peuvent être utilisés à cet effet (Tillery *et coll.* 1976; Willeke et Baron, 1993; Dekati, 2003; Powers *et coll.* 2007).

Dans sa plus simple expression, une particule ayant une morphologie parfaitement sphérique de densité standard (1 g/cm^3) peut être caractérisée à l'aide du diamètre géométrique ou physique (d_p). Ce type de diamètre peut être mesuré, entre autres, par microscopie électronique. Cependant, lorsque la densité et la forme des particules s'éloignent des valeurs standards, la mesure physique des diamètres est significativement influencée. Dans ce cas, on utilise des diamètres équivalents, comme le diamètre aérodynamique (d_a), qui peut être mesuré à l'aide d'impacteurs ou le diamètre de mobilité électrique (d_m), mesuré à l'aide d'un calibre à balayage de la mobilité des particules (scanning mobility particle sizer, SMPS, en anglais)

(DeCarlo *et coll.* 2004). Le diamètre aérodynamique est le diamètre d'une particule sphérique ayant une masse volumique de 1 g/cm^3 qui a les mêmes propriétés d'inertie dans un gaz (ou tout autre fluide tel que l'air) que la particule d'intérêt (Hinds, 1999). Ce type de diamètre prend en compte à la fois la densité et la vitesse de sédimentation des particules. Par conséquent, il est utilisé pour classer des particules par taille, même si elles ont des formes et des densités différentes (Hinds, 1999; De Carlo *et coll.* 2004). Étant donné que le diamètre aérodynamique est celui utilisé pour prédire les sites de dépôt et la clairance pulmonaire des particules (Tillery *et coll.* 1976), les impacteurs en cascade sont indispensables lors d'expositions par inhalation (Brouwer *et coll.* 2004; Ma-Hock *et coll.* 2007; Gligorouski *et coll.* 2008; Coudray *et coll.* 2009; McMurry *et coll.* 2009). Quant au diamètre de mobilité d'une particule, il est équivalent à celui d'une sphère ayant la même mobilité (vitesse de migration) dans un champ électrique constant que la particule d'intérêt (DeCarlo *et coll.* 2004).

En conséquence, le diamètre aérodynamique obtenu par impaction, le diamètre de mobilité mesuré avec un SMPS et le diamètre physique acquis par microscopie, sont trois différents types de diamètres présentant un intérêt en toxicologie des particules (Willeke et Baron, 1993; Powers *et coll.* 2006 et 2007). N'étant pas directement comparables, ces différents diamètres sont toutefois interreliés par des équations mathématiques complexes (DeCarlo *et coll.* 2004). Il faut également souligner que plus la densité de la particule augmente, plus le diamètre aérodynamique sera grand, alors que le diamètre de mobilité n'est pas influencé par ce facteur (DeCarlo *et coll.* 2004). La microscopie électronique vient en plus compléter la caractérisation

en déterminant la forme et la structure des particules afin de comprendre l'influence de leurs propriétés physiques sur l'environnement physiologique.

En fonction de la théorie décrite précédemment, on constate qu'il existe des principes de base à respecter concernant la génération et la caractérisation de nano-aérosols. Toutefois, une analyse détaillée de la littérature montre que le développement de méthodes standards et harmonisées de prélèvement et de caractérisation des NP présentes dans l'air ambiant des milieux de travail et dans les laboratoires d'inhalation pour les expérimentations animales est toujours requis (Brouwer *et coll.* 2004; Peters *et coll.* 2009; Jankovic *et coll.* 2010; Majestic *et coll.* 2010; Methner *et coll.* 2010a et b; Ostraat *et coll.* 2010).

1.3 Toxicocinétique pulmonaire — Études par inhalation portant sur les NP d'oxyde métallique et revue de leurs propriétés physico-chimiques d'intérêt toxicologique

La caractérisation homogène et harmonisée des propriétés des NP ainsi que la mesure des nano-aérosols sont incontournables tant pour l'évaluation de l'exposition que pour l'analyse du risque (Warheit *et coll.* 2007a, Warheit, 2008 et 2010). En effet, plusieurs propriétés des NP, telles que : l'espèce chimique, la taille (distribution granulométrique et diamètre moyen ou médian), la densité, la charge, la porosité, l'aire de surface et la surface spécifique, sont à considérer dans les études toxicologiques (Hoet *et coll.* 2004; Balbus *et coll.* 2007; Ma-Hock

et coll. 2007; Hervé-Bazin 2007; Jiang, J. *et coll.* 2008; Jiang, W. *et coll.* 2008; Mühlfeld *et coll.* 2008; Marquis *et coll.* 2009).

À l'échelle nanométrique, les effets quantiques confèrent aux NP de nouvelles propriétés de surface. On note, pour une même masse, que plus la taille des particules diminue i) plus l'aire de surface augmente (voir tableau I) et ii) plus la proportion d'atomes en surface augmente par rapport à l'intérieur. Donc, une diminution de la taille des particules implique une augmentation de la surface par unité de masse et conduit à un ratio surface-volume élevé, conférant ainsi aux NP une réactivité de surface et un potentiel oxydant supérieurs (Oberdörster *et coll.* 2005b). L'agencement structural des atomes à la surface des NP peut créer des pores rehaussant aussi leur réactivité (Dutta *et coll.* 2007; Kim *et coll.* 2007; Hervé-Bazin 2007). De plus, l'interaction NP – cellule produit des radicaux libres (Donaldson *et coll.* 1996; Dick *et coll.* 2003; Hervé-Bazin 2007). Ces radicaux libres peuvent faire partie de la famille des espèces réactives de l'oxygène. Le radical hydroxyle (OH[•]) et le radical superoxyde (O₂[•]) en sont des exemples. Ayant des éléments non appariés sur leur couche de valence, ils sont très réactifs et peuvent ainsi induire, lorsqu'en interaction avec le matériel biologique, des dommages à caractère oxydant (Kanj *et coll.* 2005). Pour toutes ces raisons, les propriétés de surface des NP sont cruciales dans la détermination des effets toxiques. Bien que ne faisant pas l'unanimité, la surface a largement été étudiée comme métrique exprimant le mieux la dose des NP pour la réponse inflammatoire (Oberdörster *et coll.* 1992; Brown *et coll.* 2001; Moss et Wong, 2006; Stoeger *et coll.* 2006; Monteiller *et coll.* 2007; Hervé-Bazin 2007).

Tableau I

Relation entre la taille de particules sphériques et l'aire de surface calculée pour une masse totale de 523 μg et une densité de 1

Taille de la particule (nm)	Nombre de particules (n)	Aire de surface totale (μm^2)
10 000	1	314
1 000	1 000	3 140
100	1 000 000	31 400
10	1 000 000 000	314 000

Source : Maier *et coll.* 2008.

Il existe une différence entre l'aire et la surface spécifique des NP. La première désigne la surface calculée en se basant sur les paramètres de la particule, son unité de mesure est le cm^2 . Elle se mesure à la fois sur les NP de départ et *in situ* dans le vecteur d'exposition, sur les NP agglomérées. La seconde représente la surface calculée à l'aide de la méthode Brauner-Emmett-Teller (BET) via l'adsorption de molécules d'azote à la surface et son unité de mesure est le m^2/g . À ce jour, elle se mesure presque exclusivement dans les poudres de départ. Ces deux mesures de surface peuvent ne pas avoir la même valeur pour une particule donnée, puisque la surface spécifique intègre la mesure de la porosité (Hervé-Bazin 2007). Cette dernière reflète donc mieux la surface biologiquement active de la NP. Par contre, puisque l'agglomération

des NP évolue dans le vecteur d'exposition, la surface spécifique peut changer de valeur dans les aérosols. De fait, dans les études toxicologiques, on peut rapporter les deux mesures de surface pour la caractérisation des poudres de départ, mais dans les aérosols, il est difficile d'évaluer la surface spécifique, contrairement à l'aire de surface des agglomérats qui se mesure aisément et sert à alimenter les discussions portant sur la meilleure métrique (Ho *et coll.* 2011).

Comme il a été mentionné précédemment, un bon nombre d'études *in vivo* ont noté des effets pulmonaires plus importants suite à l'exposition à des particules ultrafines en comparaison avec des particules fines de même composition chimique (Oberdörster *et coll.* 1994; Brown *et coll.* 2001; Bermudez *et coll.* 2004; Elder *et coll.* 2006a et b). Les auteurs expliquent ces résultats, entre autres, par la plus grande aire de surface et donc, la réactivité plus importante des particules ultrafines. Ils ont montré une meilleure corrélation entre l'aire de surface et certaines réponses biologiques, notamment de nature inflammatoire.

En plus de la surface, le nombre de particules en tant que métrique démontre aussi un grand potentiel en analyse du risque. La concentration en nombre est basée à la fois sur les nanoparticules individuelles et les agglomérats. En raison de leur petite taille, comparativement aux particules fines et pour des masses identiques, un plus grand nombre de NP peuvent occuper le même espace et ainsi, en théorie, multiplier les interactions avec le matériel biologique (Oberdörster *et coll.* 2005b; Bérubé *et coll.* 2007). Cependant, l'étude de

Ho *et coll.* (2011) n'a pas réussi à établir de relation entre la concentration en nombre de NP d'oxyde de zinc et des marqueurs d'inflammation (compte cellulaire total, nombre et pourcentage de neutrophiles retrouvés dans les lavages broncho-alvéolaires de rats exposés par inhalation), alors qu'une très bonne corrélation a pu être établie avec la masse et l'aire de surface. Ainsi, d'autres études portant sur la relation dose – réponse basée sur la concentration en nombre sont requises.

Par ailleurs, peu d'études traitent de l'effet de la toxicité intrinsèque de différentes NP sur la toxicocinétique pulmonaire (Hagens *et coll.* 2007). En contraste, au niveau de la toxicité pulmonaire, plusieurs études démontrent que malgré la similitude de taille, des NP de compositions chimiques différentes (Au, Ag, TiO₂, Cu, noir de carbone, etc.) vont engendrer des réponses biologiques distinctes. Ces travaux montrent qu'une gradation de la toxicité en fonction de l'espèce chimique des NP est possible (Oberdörster *et coll.* 1992; Dick *et coll.* 2003; Renwick *et coll.* 2004; Gojova *et coll.* 2007; Hervé-Bazin 2007; Park *et coll.* 2007).

Les propriétés physico-chimiques des NP ont donc une influence sur la toxicocinétique pulmonaire et sont responsables du devenir dans les tissus biologiques. Par conséquent, il est difficile de généraliser un comportement cinétique (c'est-à-dire absorption, distribution, biotransformation et élimination) commun pour toutes les NP (Geiser *et coll.* 2003; Hagens *et coll.* 2007). Par exemple, l'évolution des NP dans les voies respiratoires est tributaire, entre

autres, de leur taille (incluant l'agglomération), de leur morphologie de surface et de leur composition chimique.

Absorption/déposition

La déposition des NP s'effectue via la diffusion ou le mouvement brownien et ce, dans les trois grandes régions de l'arbre respiratoire, soit : les régions naso-pharyngée, trachéo-bronchique et alvéolaire. En raison de leur caractère diffusible, plus les NP sont petites et plus elles iront se loger dans la région naso-pharyngée, alors que plus les NP sont grandes, plus facilement elles pourront rejoindre la région alvéolaire. Les mécanismes de sédimentation et d'impaction ont peu d'effet sur le lieu de déposition des NP. En se référant à la Figure 1 et aux travaux d'Oberdörster *et coll.* (2005a), on note que la quasi-totalité des NP de 1 nm se dépose au niveau naso-pharyngée, alors qu'environ cinquante pour cent des NP de taille de 10 nm se retrouvent au niveau alvéolaire. Certains auteurs croient que la taille optimale pour qu'une NP rejoigne la région alvéolaire se situe autour de 10 à 20 nm avec un taux de déposition d'environ 50 % (Oberdörster *et coll.* 2005a; Hervé-Bazin 2007; Geiser *et coll.* 2008; Asgharian et Price, 2007). Toutefois, il est important de mentionner que la taille résultante des agglomérats et la charge présente sur la surface des NP auront également des impacts sur leur comportement cinétique.

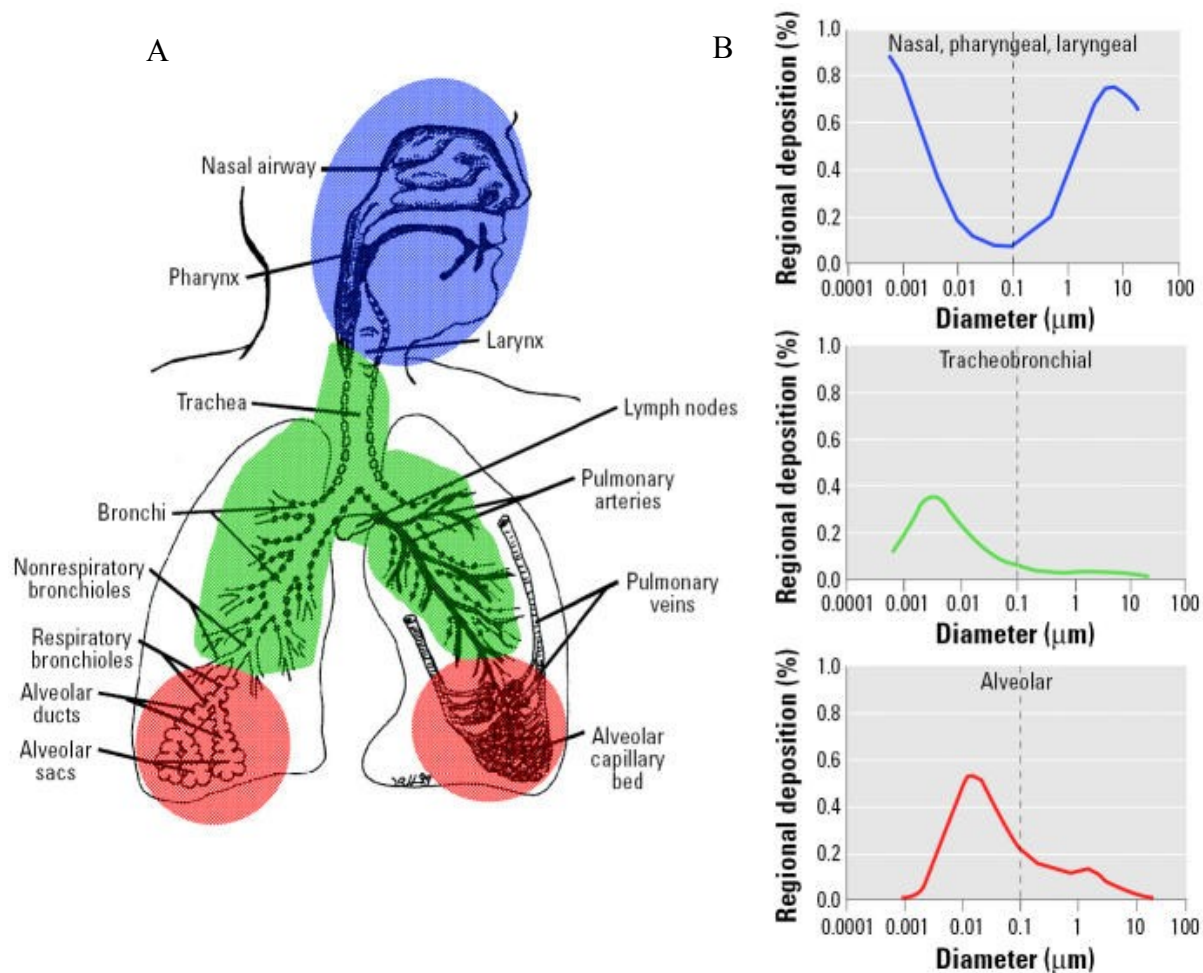


Figure 1. Prédiction pendant la respiration nasale du dépôt fractionnaire de particules inhalées dans les voies respiratoires

Cette figure illustre en A l'anatomie des voies respiratoires de la région nasale au poumon profond. Les graphiques en B montrent le dépôt fractionnaire en fonction de la taille primaire des NP inhalées dans les trois grandes régions des voies respiratoires, soit la région naso-pharyngée, trachéo-bronchique et alvéolaire.

Source : Oberdörster *et coll.* 2005a. doi : 10.1289/ehp.7339

Reproduced with permission from *Environmental Health Perspectives*. Copyright : verbatim copyright and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original DOI.

La charge exerce une influence sur la capacité de la NP à s'adsorber sur des protéines ou des macromolécules lors du passage dans les voies respiratoires (Höhr *et coll.* 2002; Hervé-Bazin 2007). En général, on observe dans la littérature qu'une NP ayant une surface cationique est plus susceptible d'interagir avec le matériel biologique qu'une NP ayant une surface anionique ou neutre (Nemmar *et coll.* 2003; Foged *et coll.* 2005; Hervé-Bazin 2007; Lewinski *et coll.* 2008). On explique ce phénomène par le fait qu'il existerait une affinité plus grande entre les particules ayant une surface cationique et la membrane cellulaire, chargée négativement. De plus, l'effet électrostatique peut favoriser la précipitation des NP de charge positive sur le revêtement muco-ciliaire, aussi chargé négativement (Nemmar *et coll.* 2003; Foged *et coll.* 2005; Hervé-Bazin 2007; Lewinski *et coll.* 2008).

Comme il a été mentionné précédemment, la taille des NP est déterminante quant au lieu de dépôt dans les voies respiratoires, mais elle l'est aussi quant à la capacité à traverser les tissus et les membranes biologiques (Nemmar *et coll.* 2003; Foged *et coll.* 2005; Koike et Kobayashi, 2006; Donaldson et Seaton, 2007). L'internalisation de particules ou d'autres substances à l'intérieur d'une cellule se fait par endocytose. Les différents mécanismes d'endocytose dépendent de la taille et de la nature de la substance. La pinocytose se fait à l'aide de récepteurs tels que la clathrine et la cavéoline et est utilisée pour les macromolécules, les virus ou les petites particules (≈ 60 à 120 nm), alors que la phagocytose est utilisée pour les pathogènes ou les plus grosses particules (> 500 nm) (Aderem et Underhill, 1999; Conner et Schmid, 2003). L'activation de la phagocytose mène au déclenchement de réponses inflammatoires et immunitaires innées. La taille seuil nécessaire pour activer la phagocytose

ou la pinocytose ne fait pas encore consensus. Toutefois, bien que la taille y joue un rôle inévitable, l'espèce chimique, la forme, la rigidité et le revêtement des particules sont aussi des facteurs à prendre en compte (Rabinovitch, 1995; Geiser, 2010).

L'état d'agglomération des NP exerce également une influence toxicocinétique. Certaines NP, notamment celles d'oxyde métallique, ont tendance à s'agglomérer dans les aérosols. Une fois déposées dans le poumon, les NP peuvent interagir avec le surfactant pulmonaire. Cependant, l'évolution de l'état d'agglomération des NP dans les milieux biologiques demeure toujours incertaine. En effet, des auteurs ont émis l'hypothèse qu'un processus de désagglomération pouvait se produire après déposition pulmonaire (Ferin *et coll.* 1992; Warheit *et coll.* 2006; Grassian *et coll.* 2007b). Les travaux de Ferin *et coll.* (1992) ont montré que malgré des diamètres aérodynamiques médians basés sur la masse (MMAD) comparables dans les aérosols (780 et 710 nm), et donc se déposant théoriquement dans des sites similaires dans le poumon, des particules ultrafines (21 nm) et fines (250 nm) de TiO₂ induisaient des effets pulmonaires différents chez le rat. Ils ont observé une réaction inflammatoire, mesurée par le nombre de neutrophiles, et une concentration pulmonaire plus importante avec les particules ultrafines. Puisque les MMAD des particules fines et ultrafines étaient similaires dans les aérosols, ces auteurs suggèrent qu'une fois les particules déposées dans le poumon, la taille de départ devait avoir une influence. Bien que la structure des agglomérats n'ait pas été documentée dans cette étude, certains auteurs suggèrent qu'une structure lâche pourrait plus facilement se désagglomérer en milieu physiologique qu'une structure compacte (Grassian *et coll.* 2007b). Par ailleurs, et même si ce paramètre n'a pas été évalué, il se peut aussi que la

fraction faiblement agglomérée (< 100 nm) de l'aérosol composé des particules ultrafines de 21 nm soit responsable des effets mesurés. Donc, l'état d'agglomération, la structure des agglomérats de NP et la distribution granulométrique des nano-aérosols, au même titre que la taille, doivent être pris en compte dans l'évaluation de la dose réelle à laquelle le système biologique est exposé (Takenaka *et coll.* 1986; Ferin *et coll.* 1992; Grassian *et coll.* 2007b; Hussain *et coll.* 2009; Zook *et coll.* 2011). Il est donc essentiel de caractériser l'état d'agglomération puisque ce dernier influence le lieu de dépôt des particules dans les voies respiratoires et affecte les mécanismes de clairance pulmonaire, dont l'endocytose (Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.* 1997; Hervé-Bazin 2007; Grassian *et coll.* 2007a et b; Sager *et coll.* 2008; Mühlfeld *et coll.* 2008; Seipenbusch *et coll.* 2008).

En raison des difficultés associées à la génération d'aérosols faiblement agglomérés, seulement quelques études ont évalué les lieux de dépôt des NP dans les voies respiratoires de rongeurs exposés par inhalation (Takenaka *et coll.* 2001 et 2006; Geiser *et coll.* 2005 et 2008). Ces études ont utilisé des NP de TiO₂ (taille de départ 4 nm, 20 nm dans l'aérosol à 0,1 mg/m³) (Geiser *et coll.* 2005 et 2008), d'argent (taille de départ 4 - 10 nm, 17 nm dans l'aérosol à 0,13 mg/m³) (Takenaka *et coll.* 2001) et d'or (taille de départ 5 – 8 nm, 16 nm dans l'aérosol à 0,088 mg/m³) (Takenaka *et coll.* 2006) et ont montré que ces NP pouvaient pénétrer à l'intérieur de plusieurs entités constituant l'architecture pulmonaire, telle que : les cellules endothéliales, les cellules épithéliales de type I et II, les fibroblastes, les tissus conjonctifs et les capillaires. Les particules pouvaient également être observées dans le cytoplasme et quelquefois dans le nucléole, toutefois sans liaison à la membrane plasmatique.

À ce jour, les études mettent en évidence que i) l'absorption des NP se produit tout au long des voies respiratoires, de la région nasale au poumon profond et ii) les NP sous forme faiblement agglomérée (diamètre moyen < 20 nm) arrivent à se localiser à l'intérieur de différents types de cellules pulmonaires. Toutefois, il n'est pas encore clair si les NP se retrouvent libres ou internalisées dans des vésicules à l'intérieur de la cellule (Oberdörster *et coll.* 1992 et 2005a; Donaldson *et coll.* 1998; Takenaka *et coll.* 2001 et 2006; Geiser *et coll.* 2005 et 2008; Hervé-Bazin 2007; Asgharian et Price, 2007).

Distribution/translocation

La translocation des NP insolubles se retrouve à mi-chemin entre les processus d'absorption et de distribution (Hagens *et coll.* 2007). Étant donné leur petite taille, les NP ne sont pas efficacement phagocytées par les macrophages et peuvent alors interagir avec l'épithélium et avoir accès à la fine membrane alvéolo-capillaire (Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.* 2002 et 2004). La proximité de l'épithélium alvéolaire avec l'endothélium capillaire peut ainsi aider à la translocation des NP inhalées vers des compartiments extra-pulmonaires (Oberdörster *et coll.* 2004; Takenaka *et coll.* 2004; Elder *et coll.* 2006a et b; Shimada *et coll.* 2006; Semmler-Behnke *et coll.* 2007; Tetley, 2007).

Des études chez le rat portant sur la translocation de NP de TiO₂ inhalées (taille de départ 4 nm, 22 nm dans l'aérosol à 0,11 mg/m³) (Geiser *et coll.* 2005; Mühlfeld *et coll.* 2007) et d'iridium (¹⁹²Ir taille de départ non rapportée, 17 – 20 nm dans l'aérosol à 0,7 mg/m³) (Semmler-Behnke *et coll.* 2007) ont été effectuées. Mühlfeld *et coll.* (2007) ont observé qu'en majorité, les NP se retrouvaient dans le tissu conjonctif une heure post-exposition, alors que vingt-quatre heures post-exposition elles se retrouvaient dans la lumière des capillaires (Geiser *et coll.* 2005; Mühlfeld *et coll.* 2007). Dans l'étude de Semmler-Behnke *et coll.* (2007), deux et six mois après l'exposition aux NP d'iridium, il y avait toujours présence de NP à l'intérieur de macrophages alvéolaires. Ces auteurs ont également observé qu'il n'y avait pas d'accumulation de NP décelable dans les ganglions lymphatiques de la trachée. Ils suggèrent donc que la clairance de NP faiblement agglomérées (< 100 nm) pourrait se faire via de petits vaisseaux, comme les capillaires et qu'il y aurait possiblement ré-entraînement des NP vers la surface de l'épithélium, après un certain nombre de mois. Par conséquent, la translocation des NP à partir i) de l'épithélium vers l'interstitium et ii) des capillaires vers la circulation sanguine systémique serait possible, mais ne serait pas un processus important (Kreyling *et coll.* 2002; Semmler *et coll.* 2004; Geiser *et coll.* 2005; Semmler-Behnke *et coll.* 2007; Mühlfeld *et coll.* 2007).

La translocation ou l'élimination par drainage lymphatique a peu été documentée suite à l'inhalation de NP d'oxyde métallique. Cette voie de translocation a été étudiée par instillation chez le rat. Ainsi, les travaux de Choi *et coll.* (2010) ont montré que la translocation de NP de polystyrène du poumon vers les ganglions lymphatiques médiastinaux était rapide (< 1 heure)

et dépendait de la taille et de la charge (< 34 nm, charge de surface non cationique) des NP dans le milieu aqueux.

Contrairement à la translocation lymphatique, la translocation extra-pulmonaire a fait l'objet d'un plus grand nombre d'études. Les travaux d'Oberdörster *et coll.* (2002) ont montré que, suite à l'exposition à des NP de carbone par inhalation chez le rat (^{13}C taille de départ non rapportée, 22 et 30 nm dans les aérosols à 0,08 et 0,180 mg/m³, respectivement), les NP pouvaient rejoindre la circulation sanguine et, parmi les organes extra-pulmonaires étudiés, l'accumulation dans le foie était significative. De plus, les travaux de Takenaka *et coll.* (2004) ont montré qu'à la suite d'exposition aiguë par inhalation (taille de départ 20 – 40 nm, 50 et 51 nm dans les aérosols à 0,07 et 0,55 mg/m³, respectivement) la translocation de NP d'oxyde de cadmium pouvait se produire vers le foie et les reins. Ainsi, les données semblent être en contradiction, cependant les différentes études n'utilisaient pas les mêmes conditions expérimentales ni la même NP. Ces résultats divergents pourraient aussi partiellement être expliqués par le fait que les nano-aérosols ne présentaient possiblement pas la même distribution granulométrique.

Pour leur part, les travaux de Kreyling *et coll.* (2009) ont porté une attention particulière à la nature et la taille des NP en ce qui a trait au processus de translocation. Dans cette étude, des rats ont été exposés pendant 1 heure à des aérosols de NP d'iridium et de carbone par intubation endotrachéale. Les chercheurs ont observé que les NP Ir (^{192}Ir taille de départ 2 – 4 nm, 20 et 80 nm pour deux aérosols différents, concentration non rapportée) et de carbone

marqué à l'Ir (taille de départ 5 -10 nm, 25 nm dans l'aérosol, concentration non rapportée) pouvaient s'accumuler à des niveaux significativement différents dans des organes extra-pulmonaires. De fait, l'accumulation extra-pulmonaire était significativement plus faible pour l'aérosol d'Ir à 80 nm comparativement à celui à 20 nm. De plus, bien que la taille dans les aérosols était similaire pour les NP Ir et de carbone, l'accumulation dans les organes, mis à part pour le foie, était significativement différente. Ces travaux montrent donc que la translocation de NP pourrait dépendre de l'espèce chimique et de la taille des agglomérats dans les aérosols.

D'autres travaux ont évalué chez le rat exposé par inhalation, la translocation au niveau du bulbe olfactif de NP de carbone (¹³C taille de départ non rapportée, 35 et 37 nm dans les aérosols à 0,15 et 0,17 mg/m³, respectivement) (Oberdörster *et coll.* 2004) et d'oxyde de manganèse (taille de départ 3 – 8 nm, 30 nm dans les aérosols à 0,5 mg/m³) (Elder *et coll.* 2006a). Pour expliquer la présence de NP dans le cerveau, malgré la protection qu'offre la barrière hémato-encéphalique de la circulation sanguine, ces auteurs se basent sur la théorie de dépôt des NP dans les voies respiratoires. Puisqu'on sait que les NP de 1 nm se déposent dans la région naso-pharyngée à environ 90 %, ces études ont montré qu'à partir de la muqueuse nasale les NP pouvaient rejoindre le nerf olfactif et se déplacer le long de l'axone vers le bulbe olfactif et ainsi rejoindre le système nerveux central. Ils ont montré que la quantité de carbone et d'oxyde de manganèse retrouvée dans le bulbe olfactif des rats exposés était significativement plus élevée que chez les groupes témoins et ce, à tous les temps post-exposition. De plus, ces auteurs avancent l'hypothèse que la dimension de la NP est un facteur

critique, voire limitant, pour cette voie de translocation (Oberdörster *et coll.* 2004; Elder *et coll.* 2006a).

Il ressort clairement de la littérature que la translocation des NP, entre les processus d'absorption et de distribution, est possible pour des particules solides insolubles. Trois voies majeures de translocation sont envisagées : i) la voie épithéliale, c'est-à-dire de l'épithélium bronchique et alvéolaire vers l'interstitium; ii) celle dans la circulation sanguine qui est en fait la continuité de la précédente, en d'autres termes de l'interstitium vers le sang et iii) celle via les axones neuronaux des nerfs olfactifs à partir de la muqueuse nasale vers le système nerveux central. Bien que la translocation lymphatique n'ait pas été documentée suite à l'inhalation de NP d'oxyde métallique, elle a été observée à la suite d'instillation de NP de polystyrène et, représente donc une autre voie pouvant être empruntée par les NP. Dans l'ensemble, on remarque que la translocation semble se produire lors d'exposition à des NP faiblement agglomérées (diamètre moyen < 80 nm). Ainsi, la translocation des NP serait largement dépendante de leurs propriétés physico-chimiques, notamment celles de surface, des caractéristiques de l'aérosol, particulièrement la taille des agglomérats et à leur habilité à se lier à des protéines (Kreyling *et coll.* 2009 et 2012). En raison des contradictions entre certaines études, l'étendue de l'importance de la translocation n'est pas encore clairement documentée (Kreyling *et coll.* 2012).

Élimination

Il existe différents mécanismes d'élimination des corps étrangers au niveau des voies respiratoires. La clairance muco-ciliaire est le mécanisme principal pour les particules qui se déposent au niveau de la région naso-pharyngée et trachéo-bronchique, alors que la prise en charge phagocytaire est la voie d'élimination majeure pour la région alvéolaire (Klaassen, 2001). Les macrophages alvéolaires sont donc grandement sollicités lors de la phagocytose et l'élimination des substances étrangères inhalables. De fait, ils représentent un élément central associé à la toxicité pulmonaire induite par les NP (Takenaka *et coll.* 2001 et 2006).

Plusieurs études ont mis en évidence que la surcharge pulmonaire, caractérisée par une dysfonction de la clairance des particules par les macrophages, résultait en une charge pulmonaire persistante (Morrow, 1988; Oberdörster, 1995; Bermudez *et coll.* 2004). En effet, selon les travaux de Morrow (1988), pour qu'il y ait inhibition des mécanismes de clairance, plus spécifiquement de la motilité des macrophages alvéolaires et pas nécessairement une diminution ou une inhibition de la fonction phagocytaire, il faut que le volume de particules phagocytées soit en moyenne de $60 \mu\text{m}^3$ /macrophage alvéolaire (Morrow, 1988; Renwick *et coll.* 2001). Les macrophages alvéolaires activés ayant excédé leur capacité de phagocytose sécrètent des espèces réactives d'oxygène et autres protéases induisant de la toxicité pulmonaire. Certaines études sub-aiguës (5 jours) et sub-chroniques (13 semaines) exposant des rats par inhalation aux NP de TiO_2 ont observé ce phénomène à des concentrations supérieures à 10 mg/m^3 (Bermudez *et coll.* 2004; Ma-Hock *et coll.* 2009; Van *et coll.* 2009). Il faut donc prendre en considération la possibilité de mécanismes différents à forte dose lors de

longues périodes d'exposition (Morrow, 1988; Lenhert *et coll.* 1990; Dorries et Valberg, 1992; Oberdörster, 1995; Landsiedel *et coll.* 2012).

Par ailleurs, de nombreuses études ont noté que l'activité phagocytaire était optimale pour des particules plus grandes que 500 nm et moins efficace, sporadique et non spécifique pour des particules de gamme nanométrique (Kanapilly *et coll.* 1982; Pratten et Lloyd, 1986; Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.* 2000; Kreyling *et coll.* 2002; Semmler *et coll.* 2004; Semmler-Behnke *et coll.* 2007). Certains chercheurs avancent même une dimension seuil d'environ 250 – 260 nm pour qu'il y ait une phagocytose optimale ou efficace par les macrophages alvéolaires (Oberdörster, 1988; Yang *et coll.* 2008; Mansour *et coll.* 2009; Geiser 2010). Les travaux de Geiser *et coll.* (2008) ont montré que la phagocytose de NP de TiO₂ était faible. Pour parvenir à cette conclusion, ils ont évalué la capacité phagocytaire de macrophages de rats exposés par inhalation à des particules de TiO₂ dont la taille de départ était de 4 nm (20 nm dans l'aérosol). Une heure et vingt-quatre heures post-exposition, ils ont observé que seulement 0,2 % et 1,7 % des macrophages évalués contenaient des NP. La taille moyenne des particules retrouvées dans les macrophages était de 31 ± 8 nm et 34 ± 10 nm dans le premier et deuxième groupe, respectivement.

De récents travaux de Takenaka *et coll.* (2012) montrent que les macrophages alvéolaires phagocytent les NP d'Or (exposition aiguë par inhalation, taille de départ 5 – 8 nm, 16 nm dans l'aérosol à 0,088 mg/m³) se retrouvant dans leur voisinage immédiat. Cependant, en

raison du nombre important de NP présent dans l'aérosol, les NP qui se déposent loin des macrophages peuvent échapper à ce mécanisme d'élimination (Takenaka *et coll.* 2012). En effet, on pense qu'en raison de leur petite taille, les NP n'arriveraient pas à induire des signaux assez puissants pour stimuler le chimiotactisme des macrophages vers leur cible (Simeonova *et coll.* 2007; Geiser, 2010; Landsiedel *et coll.* 2012).

Ainsi, l'ensemble des travaux de la littérature (Morrow, 1988; Ferin *et coll.* 1992; Kreyling *et coll.* 2002; Semmler *et coll.* 2004; Geiser *et coll.* 2008) soutiennent le fait que la phagocytose par les macrophages alvéolaires est un processus saturable et limité par la taille des corps étrangers. De plus, l'état de la recherche montre que le mécanisme d'élimination principal des NP ayant atteint les alvéoles ne serait pas la phagocytose par les macrophages.

Cette faible clairance phagocytaire des NP favoriserait donc leur bioaccumulation et leur bio-persistance dans les tissus pulmonaires et extra-pulmonaires, comme le montre l'étude d'Oberdörster *et coll.* (1994). À l'aide d'expérimentation par inhalation chez le rat, ils ont évalué la persistance pulmonaire de particules de TiO₂, à la fois sous forme nanométrique (20 nm) et sous forme fine (250 nm). Ils ont démontré que la persistance pulmonaire au niveau de l'interstitium était plus importante pour les NP et ce, sur une période post-exposition allant jusqu'à un an. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Ferin *et coll.* (1992) et de Semmler-Behnke *et coll.* (2007) qui ont également observé que l'interstitium pulmonaire est un lieu de rétention privilégié pour les NP.

Résumé cinétique pulmonaire

La caractérisation joue un rôle crucial dans l'évaluation du devenir pulmonaire des NP qui semble, *a priori*, être différent de celui des microparticules. Prises dans leur ensemble, les données suggèrent que la toxicocinétique des NP ne serait pas associée à une seule propriété physico-chimique, mais à un sous-ensemble défini (Hervé-Bazin 2007). Les connaissances en lien avec l'ampleur des effets dus à certaines propriétés physico-chimiques restent à être documentées. Cependant, la taille des NP semble influencer leur cinétique pulmonaire, car des études de référence permettent de faire des constats : i) la déposition des NP, fonction de la taille et de l'état d'agglomération, se fait tout au long de l'arbre respiratoire, résultant en une possibilité d'absorption plus élevée de ces particules; ii) le mécanisme d'élimination pulmonaire principal de ces particules ne serait pas la clairance phagocytaire, ainsi la taille des NP favoriserait la bio-persistence pulmonaire et l'interaction avec les cellules épithéliales et endothéliales et iii) la translocation ou la bio-distribution de ces particules inhalées vers des compartiments extra-pulmonaires est possible, à la fois à partir du poumon profond vers la circulation sanguine systémique, tout comme à partir de la muqueuse nasale vers le système nerveux central (Oberdörster *et coll.* 2005a; Simeonova *et coll.* 2007; Hervé-Bazin 2007).

1.4 Mécanismes d'action des NP – Paradigme stress oxydant et inflammation

Les mécanismes de toxicité des NP menant à des effets néfastes sont liés aux phénomènes de l'inflammation et du stress oxydant (Oberdörster *et coll.* 2005a; Xia *et coll.* 2006a et b). Ce

paradigme est donc au cœur des mécanismes d'action hypothétiques actuels des NP. En conséquence, il est essentiel de cibler l'inflammation pulmonaire et ses effets sous-jacents dans les études nanotoxicologiques (Cho *et coll.* 2010). L'inflammation pulmonaire est un mécanisme normal de défense de l'hôte, mais peut entraîner des effets néfastes s'il est promu et soutenu de manière récurrente (Cho *et coll.* 2010). Le type d'inflammation pulmonaire, le degré de sévérité et le potentiel à se résorber dépendent de plusieurs facteurs, présents autant chez l'agent agresseur (caractéristiques physico-chimiques) que chez l'hôte (tissus et cellules cibles) (Cho *et coll.* 2010). Le macrophage joue un rôle pivot dans le développement de toute réponse immunitaire. De nombreuses cytokines de même que des interactions entre ces cytokines peuvent être nécessaires à l'activation des macrophages (Zwilling et Eisenstein, 1994). L'inflammation pulmonaire est donc un phénomène complexe qui implique différents acteurs (Cho *et coll.* 2010; Yazdi *et coll.* 2010). Ainsi, les facteurs énumérés ci-dessous à titre d'exemple sont ceux considérés les plus pertinents pour cette thèse et ne constituent donc pas une liste exhaustive.

La caractérisation différenciée des phénomènes inflammatoires peut se faire notamment au travers de : i) la présence d'une infiltration de différents types de cellules immunitaires et ii) la présence de médiateurs inflammatoires. De plus, il est à noter que des réponses cytotoxiques et oxydantes secondaires à la réaction inflammatoire peuvent également être observées (Cho *et coll.* 2010). Ainsi, dans le but d'établir des relations dose – réponse, la caractérisation de la toxicité pulmonaire induite à la suite d'une exposition aux NP inhalées doit déterminer les effets inflammatoires, cytotoxiques ou à caractère oxydant au regard de l'intensité avec

laquelle ils se produisent. Différents paramètres peuvent être étudiés par le biais de l'analyse des composantes du liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA), cellulaire et acellulaire et l'évaluation histopathologique des tissus pulmonaires. L'évaluation histologique des tissus pulmonaires pour sa part permet d'identifier des signes de réaction inflammatoire, de formation de granulomes, de développement de fibrose et permet aussi de soutenir ou de confirmer les résultats observés dans les LBA. Les paramètres pertinents à doser sont donc fonction de l'hypothèse de recherche.

En nanotoxicologie, les mécanismes d'action hypothétiques des NP peuvent s'expliquer par différentes voies de signalisation de toxicité cellulaire (voir Figure 2) (Oberdörster *et coll.* 2005a; Xia *et coll.* 2006b; Li *et coll.* 2010; Scherbart *et coll.* 2011). En l'occurrence, dans une cellule pulmonaire, une première voie de toxicité peut être induite à travers la phagocytose des macrophages. Bien qu'un processus normal d'élimination, la phagocytose peut initier la réponse inflammatoire et celle du système immunitaire inné. Les macrophages alvéolaires activés produisent et sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires tels que des facteurs chimiotactiques (MIP-1, MIP-3, IL-8), des interleukines (IL-1, IL-6) et des cytokines (TNF- α , IFN- γ) (Oberdörster, 1988; Aderem et Underhill, 1999). Cette réponse, lorsque soutenue dans le temps, peut mener à de la toxicité. Une seconde voie de toxicité peut être causée par les interactions de surface entre les NP et les cellules pulmonaires, produisant du stress oxydant. Enfin, la libération de métaux de transition de certaines NP, en interagissant directement avec les cellules ou des récepteurs, représente une autre voie. Ces trois voies de signalisation de toxicité cellulaire induisent dans une cellule pulmonaire une augmentation, entre autres, i) des

concentrations en calcium cytosolique et ii) du stress oxydant, conduisant à un accroissement de la transcription de facteurs comme le NF-kB et la protéine activatrice 1 (AP-1) dans le noyau de la cellule. En conséquence, ceci mène à la libération de médiateurs pro-inflammatoires, tels que les interleukines IL-6 et IL-8, ce qui initie la réaction inflammatoire dans le tissu pulmonaire décelée, entre autres, par une augmentation du nombre de cellules total, du nombre de macrophages et de neutrophiles. De plus, des réponses cytotoxiques et oxydantes peuvent être discernées, entre autres, par une perte d'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire, notée par une augmentation de la concentration en protéines totales, par une perte d'intégrité des membranes cellulaires, observée, par exemple, par une augmentation de la concentration de la lactate déshydrogénase (LDH), ainsi que par une peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires, notée, entre autres, par une augmentation de la concentration en 8-isoprostane, produite suite à la peroxydation de l'acide arachidonique par des radicaux libres (Donaldson *et coll.* 1996, 1998, 2001, 2003; Donaldson et MacNee, 2001; Donaldson et Stone, 2003; Dick *et coll.* 2003; Oberdörster *et coll.* 2005a; Nel *et coll.* 2006; Scherbart *et coll.* 2011) (voir Figure 2).

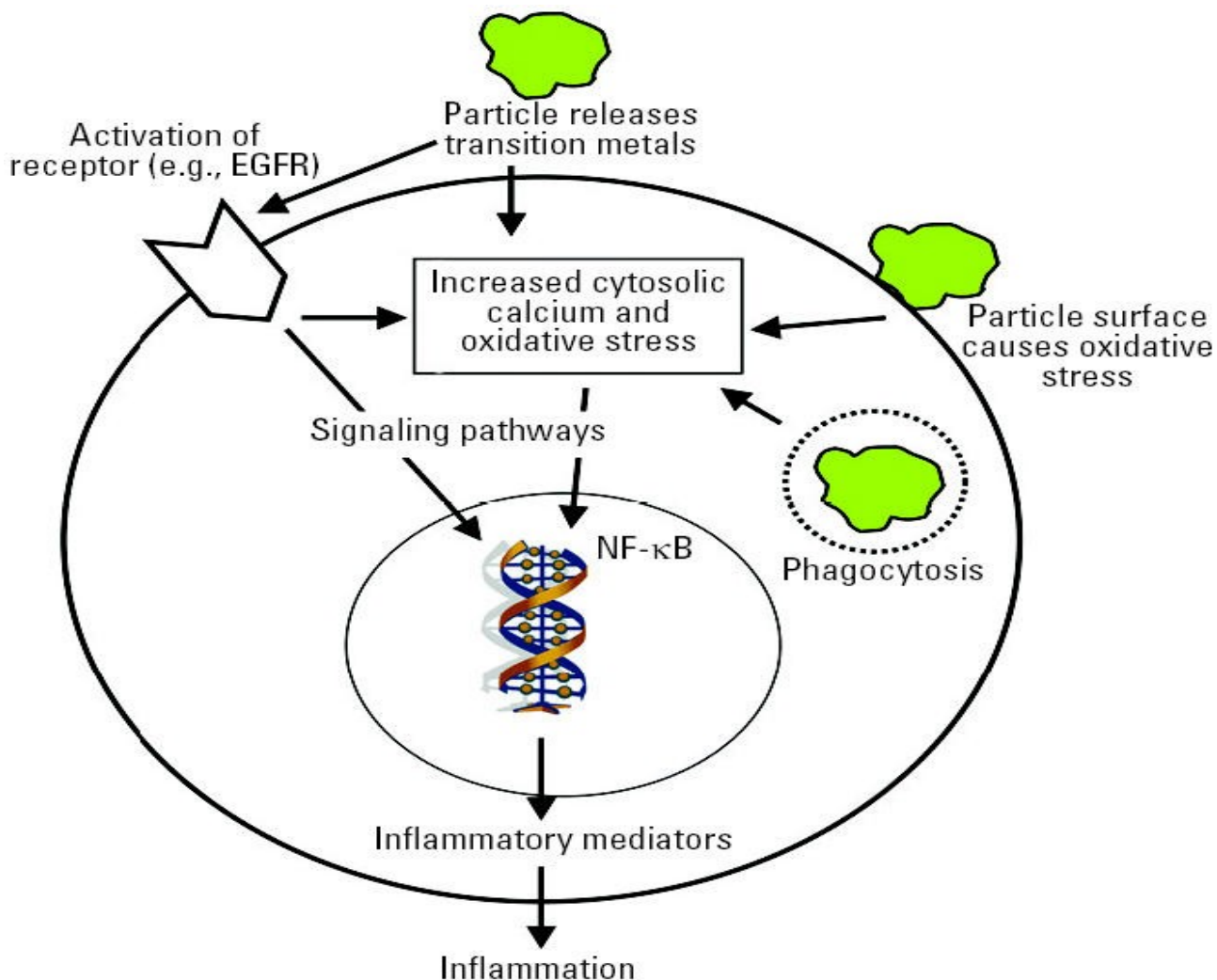


Figure 2. Mécanismes d'action hypothétiques des NP

Cette figure illustre les mécanismes d'action hypothétiques des NP lors de leur interaction avec une cellule. L'interaction NP – cellule peut se faire via trois principales voies de signalisation, soient : la phagocytose, les interactions de surface et la libération de métaux de transition agissant directement sur la cellule ou via des récepteurs. Ces interactions produisent une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de gènes, qui peuvent ultimement mener à des réactions inflammatoires et du stress oxydant.

Source : Oberdörster *et coll.* 2005a doi 10.1289/ehp.7339

Reproduced with permission from *Environmental Health Perspectives*. Copyright : *Verbatim copyright and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original DOI.*

Il y a donc un intérêt scientifique lié à la validation des mécanismes de toxicité pulmonaire *in vivo* induits par les NP, puisque la meilleure compréhension de ces mécanismes sera une importante contribution à l'analyse du risque nanotoxicologique (Scherbart *et coll.* 2011).

1.5 Choix des nanoparticules de dioxyde de titane

Le dioxyde de titane (TiO_2) est une substance ayant une densité de $4,3 \text{ g/cm}^3$. On le retrouve sous différentes formes qui varie i) en granulométrie, il est offert en poudres grossières, fines et ultrafines, ii) en aire de surface, iii) en propriétés de surface, soit hydrophile ou hydrophobe, et iv) en phase cristalline : anatase, rutile et brookite (Bermudez *et coll.* 2002; Behnajady *et coll.* 2008; Liao *et coll.* 2008). On le retrouve également sous forme de mélange. Les trois différentes structures cristallines du TiO_2 sont reliées à trois paramètres de mailles distincts, c'est-à-dire, la répétition périodique d'un motif atomique ou moléculaire (Diebold, 2003). La structure allotropique cristalline des particules de TiO_2 est, entre autres, tributaire de leur granulométrie. Il y a donc des différences au niveau de la chimie de surface des trois types cristallins du TiO_2 . La surface des NP de TiO_2 anatase aurait un plus grand potentiel oxydant, ce qui leur permettrait de produire plus facilement des espèces réactives de l'oxygène (Diebold, 2003). En effet, la forme anatase serait plus toxique que la forme rutile (Gurr *et coll.* 2005; Sayes *et coll.* 2006; Warheit *et coll.* 2006 et 2007a; Hervé-Bazin 2007).

Compte tenu de leurs propriétés physico-chimiques d'intérêt, les NP de TiO_2 occupent une place de choix dans le marché des nanomatériaux (Boutou-Kempf *et coll.* 2011). Elles arrivent au troisième rang, derrière les NP d'argent et les nanomatériaux à base de carbone (McIntyre, 2012). En 2009, la nano-poudre de TiO_2 a produit sur le marché mondial des revenus de 360 millions de dollars et on projette qu'ils seront de 1,4 milliard pour 2017 (McIntyre, 2012). En effet, le TiO_2 représente 70 % de la production totale de pigment dans le monde entier (Liao *et coll.* 2008). On l'utilise dans des secteurs comme la peinture, le traitement des eaux usées, la stérilisation, le papier, l'industrie alimentaire, la pâte dentifrice, et les prothèses dentaires, pour n'en nommer que quelques un (Baan *et coll.* 2006; Liao *et coll.* 2008). Le TiO_2 est aussi une composante des crèmes solaires et du plastique en raison de sa capacité à bloquer les rayons ultra-violet. Outre les propriétés absorbantes du TiO_2 dans les longueurs d'ondes ultraviolettes, le fait qu'il n'absorbe que très peu dans le visible le rend très intéressant pour l'utilisation dans les cosmétiques. Il est donc incorporé dans la formulation de nombreux produits de consommation.

Les caractéristiques des NP de TiO_2 tant convoitées par le milieu industriel soulèvent des inquiétudes en lien avec les effets biologiques potentiels suite à une exposition chez l'homme (Wang *et coll.* 2008; Iavicoli *et coll.* 2012). De fait, en 2006 le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé le TiO_2 comme étant possiblement cancérigène pour l'humain, groupe 2B (IARC, 2006;). Également, en 2011, le NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) a recommandé, pour les milieux de travail, que la limite d'exposition pour le TiO_2 tienne compte de la taille de départ des particules. Ainsi, des valeurs

limites d'exposition de 2,4 mg/m³ et de 0,3 mg/m³ ont été proposées respectivement pour le TiO₂ fin (100 à 3000 nm) et pour les particules ultrafines (< 100 nm) (NIOSH, 2011), alors qu'une valeur de 15 mg/m³ a été adoptée pour le TiO₂ sous la forme de poussières totales (OSHA, 2006).

Compte tenu de leur production industrielle importante, plusieurs pays utilisent le TiO₂ comme nanomatériel de référence pour la recherche et l'évaluation de l'exposition en milieu de travail (US EPA, 2009; OECD, 2010; Boutou-Kempf *et coll.* 2011; NIOSH, 2011). L'exposition des travailleurs à ces particules est donc en forte croissance et peu de données probantes sur les effets à la santé humaine possibles à la suite d'une exposition sont disponibles. Par conséquent, ceci justifie le choix et le besoin de recherche fondamentale sur ce type de NP.

1.6 Toxicité et inflammation pulmonaire — Études *in vivo* sur les NP de TiO₂ par voie d'inhalation

Il a été démontré, que même sous une forme agglomérée (> 100 nm), les aérosols de NP de TiO₂ étaient plus toxiques chez les rongeurs que les aérosols composés de particules dont la taille initiale était de l'ordre micrométrique (Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.* 1994; Bermudez *et coll.* 2004). Ce potentiel toxique différentiel des NP de TiO₂ est associé, entre autres, à la taille de départ nanométrique, à l'aire de surface élevée, à la réactivité de surface et au temps de rétention prolongée dans les poumons (Warheit *et coll.* 2005, 2007b et c; Warheit,

2008; Pauluhn, 2009a; Schmid *et coll.* 2009). Plusieurs auteurs ont donc étudié les effets toxiques associés à l'exposition aux NP en considérant les propriétés physico-chimiques des particules seules, c'est-à-dire leur taille de départ sous forme non agglomérée. Étant donné la complexité méthodologique, très peu d'études toxicologiques ont évalué les effets associés spécifiquement à la forme physico-chimique des NP telles qu'absorbées par l'organisme, notamment en considérant l'état d'agglomération (Grassian *et coll.* 2007a). Les relations dose — réponse associées à l'exposition aux NP doivent être établies à partir de la forme en contact avec le sujet ou le milieu biologique et non exclusivement à partir des caractéristiques de départ des NP (Landsiedel *et coll.* 2012). En conséquence, des particules ayant les mêmes caractéristiques de départ, mais inhalées sous différentes formes pourraient induire des effets distincts. Ainsi, une forme plus fortement agglomérée des NP pourrait se déposer au niveau du poumon profond et favoriser la clairance pulmonaire via la phagocytose par les macrophages alvéolaires (Grassian *et coll.* 2007a et b; Ma-Hock *et coll.* 2009). Pour sa part, une forme moins agglomérée pourrait échapper à ce mécanisme de défense et résulter en réponses cytotoxiques et oxydantes dues à des interactions NP — cellules pulmonaires plus importantes (Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.* 2000). Collectivement, différentes formes d'agglomération pourraient produire des effets toxiques pulmonaires différentiels (Maynard, 2002; Maier *et coll.* 2006; Hervé-Bazin, 2007; Grassian *et coll.* 2007a et b; Skebo *et coll.* 2007; Soto *et coll.* 2007).

À ce jour, dix-neuf études ont évalué par inhalation les effets pulmonaires induits par les NP de TiO₂ chez les rongeurs (Takenaka *et coll.* 1986; Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.*

1994, Janssen *et coll.* 1994; Heinrich *et coll.* 1995; Baggs *et coll.* 1997; Bermudez *et coll.* 2004; Grassian *et coll.* 2007a et b; Geiser *et coll.* 2008; Nurkiewicz *et coll.* 2008; Ma-Hock *et coll.* 2009; Van *et coll.* 2009; Rossi *et coll.* 2010; Halappanavar *et coll.* 2011; Leppänen *et coll.* 2011; Morimoto *et coll.* 2011; Lindberg *et coll.* 2012; McKinney *et coll.* 2012). Les éléments cruciaux de ces études sont brièvement décrits dans le Tableau IIA, B et C. Ces études sont classées en fonction de la durée d'exposition : A) aiguë (< 24 heures); B) subaiguë (\leq 4 semaines) et C) sub-chronique (12 ou 13 semaines) de même que chronique (2 ans) et présentées de façon à mettre en évidence les tendances en lien avec les effets toxiques pulmonaires précoces et la dose d'exposition (concentration en masse, en nombre et la taille des agglomérats dans les aérosols). Parmi toutes ces études, on constate que seulement cinq ont réussi à générer des aérosols ayant un diamètre médian inférieur à 100 nm (Geiser *et coll.* 2008; Rossi *et coll.* 2010; Leppänen *et coll.* 2011; Morimoto *et coll.* 2011; Lindberg *et coll.* 2012).

Pour les expositions aiguës, seulement trois groupes de chercheurs ont exposé des rongeurs à un aérosol faiblement aggloméré (< 100 nm) de 0,1, 8 et 10 mg/m³ durant des périodes de 0,5 à 2 heures (Geiser *et coll.* 2008; Rossi *et coll.* 2010; Leppänen *et coll.* 2011). Ces études n'ont montré aucun changement significatif au niveau du compte cellulaire total et différentiel. De plus, l'étude de Rossi *et coll.* (2010) n'a remarqué aucun changement au niveau de l'ARNm des cytokines CXCL1 (*chimiokine attirant les neutrophiles*) et TNF- α dans les LBA des rongeurs exposés (Tableau IIA). Puisqu'aucun changement dans la cytologie des LBA n'avait été décelé dans ces trois études, aucune analyse supplémentaire de cytotoxicité et de stress

oxydant n'a été effectuée. Donc, pour des aérosols de TiO₂ faiblement agglomérés (< 100 nm) les réponses pulmonaires, autres que la réaction inflammatoire, n'ont pas ou peu été documentées.

Pour des raisons essentiellement techniques, la majorité des études ont documenté les effets associés aux NP de TiO₂ sous forme agglomérée dépassant les 100 nm. Bien que les concentrations massiques variaient de 0,6 à 30 mg/m³ on remarque, pour ces 11 expositions aiguës (Tableau IIA), que les NP n'induisent aucun signe caractéristique de l'inflammation pulmonaire. Ces signes étant habituellement dénotés par une augmentation du nombre de neutrophiles ou d'éosinophiles, évalué par l'analyse des LBA et l'histopathologie, par exemple. Les auteurs ont observé que l'exposition à ces aérosols induisait d'autres types de réponses pulmonaires. En effet, à 7 mg/m³ l'exposition à des NP agglomérées (138 nm) a augmenté significativement le compte cellulaire total et le nombre de macrophages chez la souris, sans changement au niveau de la concentration en protéines totales et en LDH, lorsque le sacrifice a été effectué immédiatement après l'exposition (Grassian *et coll.* 2007a et b). Les auteurs de cette étude ne considèrent pas ces effets comme une réaction inflammatoire, puisqu'ils représentent plutôt une réponse normale faisant suite à l'inhalation de particules. De fait, pour ce même type d'aérosol, aucun effet n'est noté 20 heures après l'exposition (Grassian *et coll.* 2007b). En somme, pour des expositions aiguës (généralement d'une durée de 4 heures ou moins) à des aérosols agglomérés, peu d'effets toxiques pulmonaires ont été rapportés.

Seulement trois équipes de chercheurs (Rossi *et coll.* 2010; Morimoto *et coll.* 2011; Lindberg *et coll.* 2012) ont exposé des rongeurs à des aérosols inférieurs à 100 nm lors d'études subaiguës à des doses de 0,8, 7 et 10 mg/m³ (Tableau IIB). De façon similaire aux expositions aiguës, ces aérosols faiblement agglomérés (< 100 nm) n'ont pas induit de réaction inflammatoire ni d'autres effets, mais les paramètres de cytotoxicité et de stress oxydant n'ont pas été dosés.

Les expositions subaiguës aux aérosols agglomérés (> 100 nm) ont montré des effets pulmonaires précoces comme la réplication cellulaire au niveau des bronches et des bronchioles terminales qui pouvaient être décelées à partir d'une concentration de 2 mg/m³ au terme de 5 jours d'exposition. À cette concentration, aucun changement significatif au niveau des populations cellulaires n'a été observé (Ma-Hock *et coll.* 2009). Par ailleurs, des réactions inflammatoires légères à modérées sont observées à des concentrations de l'ordre de 9 à 12 mg/m³ (Grassian *et coll.* 2007a; Ma-Hock *et coll.* 2009; Rossi *et coll.* 2010). De plus, Ma-Hock *et coll.* (2009) ont observé des réponses pulmonaires significatives 3 jours post-exposition, alors qu'aucun effet n'a été décelé immédiatement après l'exposition de 5 jours. Aucune étude sub-chronique ou chronique n'a exposé des rongeurs à des aérosols sous les 100 nm (Tableau IIC). Les expositions aux aérosols agglomérés ont montré une réplication cellulaire des bronchioles terminales induite à 2 mg/m³. Pour des concentrations supérieures à 10 mg/m³, Ferin *et coll.* (1992) ainsi que Bermudez *et coll.* (2004) ont noté des réactions inflammatoires qui, après quelques semaines de récupération, se sont résorbées au même niveau que les groupes témoins.

La taille des agglomérats de NP représente la taille effective interagissant avec le matériel biologique et de ce fait, est l'un des facteurs pouvant influencer les mécanismes d'action des NP (Castranova, 2011). Par conséquent, l'interprétation des données toxicologiques ne considérant pas l'état d'agglomération dans les aérosols pourrait en partie expliquer les différents résultats de la littérature scientifique portant sur les NP de TiO₂. Ces études mettent ainsi en évidence le besoin urgent d'harmoniser les protocoles de recherche. L'ensemble des études répertoriées dans le Tableau II montre que les réponses biologiques aux NP de TiO₂ pourraient ne pas dépendre uniquement de la taille primaire des NP, mais aussi de leur phase cristalline, de la concentration massique, de la taille des agglomérats de NP et de la durée de l'exposition. On constate ainsi que le choix des conditions d'exposition (dose, temps, espèce animale) et les caractéristiques des NP de TiO₂ influencent les réponses toxicologiques. En effet, il a déjà été démontré que le rat est une espèce plus sensible que la souris quant aux effets pulmonaires toxiques induits par les NP de TiO₂ (Bermudez *et coll.* 2004). Le choix du moment du sacrifice semble également être un facteur clé associé à l'observation d'effets toxicologiques (Grassian *et coll.* 2007a; Ma-Hock *et coll.* 2009). De plus, prises collectivement les études ayant exposé des rongeurs à des aérosols agglomérés (> 100 nm) mettent en évidence un dénominateur commun relié au profil de réaction inflammatoire pulmonaire, qui est caractérisé par une infiltration de neutrophiles et une augmentation du nombre de macrophages. Ces réponses étaient cependant réversibles et se résorbaient en quelques jours ou semaines (Ferin *et coll.* 1992; Grassian *et coll.* 2007a et b; Johnston *et coll.* 2009; Ma-Hock *et coll.* 2009; Rossi *et coll.* 2010). Globalement, on remarque aussi qu'en absence d'une caractérisation appropriée des propriétés physico-chimiques des NP et des

aérosols générés, il est difficile de comparer les résultats provenant de différentes études toxicologiques. Par conséquent, il est complexe d'établir des conclusions probantes ainsi que des relations claires entre les propriétés physico-chimiques des NP de TiO₂ et l'induction de réponses pulmonaires toxiques (voir Tableau II) (Murr *et coll.* 2004; Johnston *et coll.* 2009; Kobayashi *et coll.* 2009).

Tableau IIA

Études sur le TiO₂ *in vivo* par voie d'inhalation — Expositions aiguës < 24 h

Concentration massique (mg/m ³)	Concentration en nombre (/cm ³)	Taille de départ des NP (nm)	Taille des agglomérats (nm)	Aire de surface	Phase cristalline	Temps d'exposition	Moment du sacrifice	Espèce animale	Réponses pulmonaires (LBA et histopathologie)	Article
0,1	7,2 x 10 ⁶	4	20	330 m ² /g	NR*	1 h	1 et 24 h après l'exposition	Rats mâles WKY	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel 0,2 et 1,7 % des macrophages contenaient des NP Taille des agglomérats dans les macrophages 31±8 et 34±10 nm	Geiser <i>et coll.</i> 2008
0,62	NR*	17,8 ± 4,0	152,9 (1,4)	41 ± 1,1 m ² /g	anatase / rutile	4 h	À la fin de l'exposition	Souris mâles	Augmentation significative du compte cellulaire total Aucun changement protéines totales et LDH Aucun effet histopathologique	Grassian <i>et coll.</i> 2007b
0,77	NR*	3,5 ± 1	123 (1,6)	219 ± 3 m ² /g	anatase	4 h	À la fin de l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, protéines totales et LDH Aucun effet histopathologique	Grassian <i>et coll.</i> 2007a
2,62	NR*	NR*	110	NR*	NR*	2 h	24 h après l'exposition	Rats mâles Sprague Dawley	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, ainsi que pour l'activité de la LDH et la concentration en albumine.	McKinney <i>et coll.</i> 2012
7,03	NR*	17,8 ± 4,0	138,8 (1,4)	41 ± 1,1 m ² /g	anatase / rutile	4 h	20 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, protéines totales et LDH Aucun effet histopathologique	Grassian <i>et coll.</i> 2007b
7,16	NR*	17,8 ± 4,0	138,8 (1,4)	41 ± 1,1 m ² /g	anatase / rutile	4 h	À la fin de l'exposition	Souris mâles	Augmentation significative du compte cellulaire total et du nombre de macrophages Aucun changement protéines totales et LDH Aucun effet histopathologique	Grassian <i>et coll.</i> 2007b
7,22	NR*	3,5 ± 1	120 (1,6)	219 ± 3 m ² /g	anatase	4 h	À la fin de l'exposition	Souris mâles	Augmentation significative du compte cellulaire total et du nombre de macrophages Aucun changement protéines totales et LDH Aucun effet histopathologique	Grassian <i>et coll.</i> 2007a
7,35	NR*	3,5 ± 1	119,5 (1,6)	219 ± 3 m ² /g	anatase	4 h	20 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, protéines totales et LDH Aucun effet histopathologique	Grassian <i>et coll.</i> 2007b
10	6,4 x 10 ⁴	30 - 40	100 et +	23 m ² /g	rutile / anatase (9:1)	2 h	4 et 24 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, ainsi que pour l'ARNm des cytokines CXCL1 et TNF-α	Rossi <i>et coll.</i> 2010
10	3,6 x 10 ⁴	< 25 nm	100 et +	222 m ² /g	anatase	2 h	4 et 24 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, ainsi que pour l'ARNm des cytokines CXCL1 et TNF-α	Rossi <i>et coll.</i> 2010
10	7,7 x 10 ⁶	21	82 et -	61 m ² /g	anatase / brookite (3:1)	2 h	4 et 24 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, ainsi que pour l'ARNm des cytokines CXCL1 et TNF-α	Rossi <i>et coll.</i> 2010
1,5; 3; 6; 10 et 12	NR*	21	138	NR*	NR*	4 et 12 h	24 h après l'exposition	Rats mâles Sprague Dawley	Aucun signe d'inflammation pulmonaire évalué par histopathologie Effets au niveau de la microvasculature systémique Constriction des artérioles ou dysfonction de la réponse vasodilatatrice	Nurkiewicz <i>et coll.</i> 2008
8, 20 et 30	NR*	20	91, 113 et 130	NR*	anatase / brookite (3:1)	0,5 h	24 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel NP retrouvées dans les macrophages Petite quantité de NP dans les cellules épithéliales de type I Aucun effet histopathologie	Leppänen <i>et coll.</i> 2011

NR* = non rapporté

Tableau IIB

 Études sur le TiO₂ *in vivo* par voie d'inhalation — Expositions sub-aiguës < 4 semaines

Concentration massique (mg/m ³)	Concentration en nombre (/cm ³)	Taille de départ des NP (nm)	Taille des agglomérats (nm)	Aire de surface	Phase cristalline	Temps d'exposition	Moment du sacrifice	Espèce animale	Réponses pulmonaires (LBA et histopathologie)	Article
0,8 (0,2)	4 x 10 ⁵	21	84,5	0,049 m ² /m ³	anatase / rutile (74 %/26 %)	4 h x 5 jrs	Immédiatement et 3 jours après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel Aucun dommage à l'ADN des cellules pulmonaires ou des érythrocytes du sang	Lindberg <i>et coll.</i> 2012
1,72	NR*	NR*	110	NR*	NR*	4 h x 2 jrs	24 h après l'exposition	Rats mâles Sprague Dawley	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, ainsi que pour l'activité de la LDH et la concentration en albumine	McKinney <i>et coll.</i> 2012
2,4 (0,5)	1,5 x 10 ⁴	25,1 ± 8,2	250	51,1 ± 0,2 m ² /g	anatase / rutile (86 %/14 %)	6 h x 5 jrs	Immédiatement, 3 et 16 jours après l'exposition	Rats mâles Wistar	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel Augmentation des cytokines clusterin et haptoglobine 3 jours après la fin de l'exposition Histiocytes avec un pigment or-brun dans leur cytoplasme Réplication cellulaire significative au niveau des bronches larges et moyennes ainsi que les bronchioles terminales	Ma-Hock <i>et coll.</i> 2009
3,79	NR*	NR*	110	NR*	NR*	4 h x 4 jrs	24 h après l'exposition	Rats mâles Sprague Dawley	Augmentation significative du nombre de neutrophiles et de l'activité de la LDH. Aucun changement au niveau de la concentration en l'albumine	McKinney <i>et coll.</i> 2012
7,2 (0,7)	6,5 x 10 ⁶	21	102	0,44 m ² /m ³	anatase / rutile (74 %/26 %)	4 h x 5 jrs	Immédiatement et 3 jours après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel Aucun dommage à l'ADN des cellules pulmonaires ou des érythrocytes du sang	Lindberg <i>et coll.</i> 2012
8,88 ± 1,98	NR*	3,5 ± 1	128 (1,7)	219 ± 3 m ² /g	anatase	4 h x 10 jrs	Immédiatement, 1, 2 et 3 semaines après l'exposition	Souris mâles	Augmentation significative du nombre de macrophages Aucun changement significatif au niveau de la concentration en protéines totales, de la LDH et des cytokines IFN-γ, IL-6 et IL-1β Aucun effet histopathologique	Grassian <i>et coll.</i> 2007a
10	6,4 x 10 ⁴	30 - 40	100 et +	23 m ² /g	rutile / anatase (9:1)	2 h x 4 jrs et 2 h x 4 jrs x 4 sem	4 et 24 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, ainsi que pour l'ARNm des cytokines CXCL1 et TNF-α NP agglomérées retrouvées dans les macrophages	Rossi <i>et coll.</i> 2010
10	3,6 x 10 ⁴	< 25 nm	100 et +	222 m ² /g	anatase	2 h x 4 jrs et 2 h x 4 jrs x 4 sem	4 et 24 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, ainsi que pour l'ARNm des cytokines CXCL1 et TNF-α NP agglomérées retrouvées dans les macrophages	Rossi <i>et coll.</i> 2010
10	7,7 x 10 ⁶	21	82 et -	61 m ² /g	anatase / brookite (3:1)	2 h x 4 jrs et 2 h x 4 jrs x 4 sem	4 et 24 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel, ainsi que pour l'ARNm des cytokines CXCL1 et TNF-α NP agglomérées retrouvées dans les macrophages	Rossi <i>et coll.</i> 2010
10	4,8 x 10 ⁴	Bâtonnet 10 x 40 (avec silice)	100 et +	132 m ² /g	rutile	2 h x 4 jrs et 2 h x 4 jrs x 4 sem	4 et 24 h après l'exposition	Souris mâles	Augmentation significative du nombre de neutrophiles Augmentation de l'ARNm des cytokines CXCL1 et TNF-α NP agglomérées retrouvées les macrophages	Rossi <i>et coll.</i> 2010

Concentration massique (mg/m ³)	Concentration en nombre (/cm ³)	Taille de départ des NP (nm)	Taille des agglomérats (nm)	Aire de surface	Phase cristalline	Temps d'exposition	Moment du sacrifice	Espèce animale	Réponses pulmonaires (LBA et histopathologie)	Article
12,1 (0,5)	1,80 x 10 ⁵	25,1 ± 8,2	200	51,1 ± 0,2 m ² /g	anatase / rutile (86 %/14 %)	6 h x 5 jrs	Immédiatement, 3 et 16 jours après l'exposition	Rats mâles Wistar	Augmentation significative du nombre de neutrophiles Augmentation significative des cytokines: MCP-1, MCP-3, M-CSF, MDC, MIP-2, myeloperoxidase et osteopontin Infiltration alvéolaire diffuse minimale avec des histiocytes Réplication cellulaire significative au niveau des bronches larges et moyennes ainsi que les bronchioles terminales	Ma-Hock <i>et coll.</i> 2009
28,5 (0,9)	2,36 x 10 ⁷	21	144	1,74 m ² /m ³	anatase / rutile (74 %/26 %)	4 h x 5 jrs	Immédiatement et 3 jours après l'exposition	Souris mâles	Augmentation statistiquement significative du pourcentage de neutrophiles Aucun dommage à l'ADN des cellules pulmonaires ou des érythrocytes du sang	Lindberg <i>et coll.</i> 2012
29 ± 2,8	NR*	20	130	NR*	anatase / brookite (3:1)	1 h x 4 jrs x 4 sem	24 h après l'exposition	Souris mâles	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel NP retrouvées dans les macrophages Petite quantité de NP dans les cellules épithéliales de type I Aucun effet histopathologique	Leppänen <i>et coll.</i> 2011
42,4 ± 2,9	1,70 x 10 ⁶	20,6 ± 0,3	80% entre 40 et 200	107,7 m ² /g	rutile	1 h x 11 jrs	5 jours après l'exposition	Souris femelles	Augmentation significative du pourcentage de neutrophiles Induction de gènes impliqués dans le système immunitaire et de défense Induction de microARN dans les poumons	Halappanavar <i>et coll.</i> 2011
50,0 (1,6)	1,02 x 10 ⁶	25,1 ± 8,2	250	51,1 ± 0,2 m ² /g	anatase / rutile (86 %/14 %)	6 h x 5 jrs	Immédiatement, 3 et 16 jours après l'exposition	Rats mâles Wistar	Augmentation significative du compte cellulaire total et des neutrophiles Augmentation significative des cytokines: MCP-1, MCP-3, M-CSF, MDC, MIP-2, myeloperoxidase, osteopontin, clusterin et haptoglobine Infiltration alvéolaire diffuse minimale à moyenne avec des histiocytes Réplication cellulaire significative au niveau des bronches larges et moyennes ainsi que les bronchioles terminales	Ma-Hock <i>et coll.</i> 2009
88 ± 6,4	8,8 x 10 ⁵	20 - 30	200	48,6 m ² /g	anatase / rutile (70/30)	6 h x 5 jrs	3 et 14 jours après l'exposition	Rats mâles Wistar	Augmentation significative du compte cellulaire total et des neutrophiles Augmentation des protéines totales, LDH, ALP, glutamyltransferase et NAC-b-glucosaminidase Histiocytosis (histocytes, activation des macrophages)	van Ravenzwaay <i>et coll.</i> 2009
NR*	2,8 x 10 ⁵	35	51 ± 9	NR*	Rutile	6 h x 5 jrs x 4 sem	4 jours, 1 et 3 mois après l'exposition	Rats mâles Wistar	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel Aucun changement au niveau de l'expression génique de MMP-2 et TIMP-2	Morimoto <i>et coll.</i> 2011

NR* = non rapporté

Tableau IIC

Études sur le TiO₂ *in vivo* par voie d'inhalation — Expositions sub-chroniques 12 ou 13 semaines et chroniques

Concentration massique (mg/m ³)	Concentration en nombre (/cm ³)	Taille de départ des NP (nm)	Taille des agglomérats (nm)	Aire de surface	Phase cristalline	Temps d'exposition	Moment du sacrifice	Espèce animale	Réponses pulmonaires (LBA et histopathologie)	Article
0,52 ± 0,03	NR*	21	MMAD = 1,44 µm (0,57)	NR*	NR*	13 semaines	Immédiatement 4, 13, 26 et 52 semaines après l'exposition	Rats femelles F344	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel NP à l'intérieur de macrophages	Bermudez <i>et coll.</i> 2004
2,1 ± 0,1	NR*	21	MMAD = 1,44 µm (0,57)	NR*	NR*	13 semaines	Immédiatement 4, 13, 26 et 52 semaines après l'exposition	Rats femelles F344	Aucun changement compte cellulaire total et différentiel Réplication cellulaire significative des bronchioles terminales et des cellules alvéolaires Agrégation de macrophages, hypertrophie et hyperplasie des cellules alvéolaires épithéliales de type II	Bermudez <i>et coll.</i> 2004
8,6	NR*	15 - 40	MMAD = 4,8 µm	NR*	anatase	1 an	Immédiatement après l'exposition	Rats femelles Wistar	NP retrouvées dans des macrophages et dans l'espace périvasculaire de petits vaisseaux sanguins Formation de petits granulomes	Takenaka <i>et coll.</i> 1986
10	NR*	15 - 40	MMAD = 0,80 µm (1,8)	NR*	anatase (80 %) / rutile (20 %)	Jusqu'à 2 ans	3, 6, 12, 18 et 24 mois après le début de l'exposition	Rats mâles Wistar	Différence statistiquement significative pour le compte cellulaire différentiel, LDH, β-glucuronidase, OH-proline et concentration en protéines totale À 3 mois, T1/2 clairance alvéolaire 208 jours Premières tumeurs pulmonaires après 18 mois d'exposition	Heinrich <i>et coll.</i> 1995
10,5 ± 0,7	NR*	21	MMAD = 1,44 µm (0,57)	NR*	NR*	13 semaines	Immédiatement 4, 13, 26 et 52 semaines après l'exposition	Rats femelles F344	Augmentation significative du compte cellulaire total, du nombre de macrophages, neutrophiles et lymphocytes Augmentation significative de la LDH et de la concentration en protéines totales Réplication cellulaire significative des bronchioles terminales et des cellules alvéolaires Changement prolifératif épithélial (métaplasie)	Bermudez <i>et coll.</i> 2004
22,3	NR*	20	NR*	NR*	anatase	4, 8 et 12 semaines	Immédiatement et 29 semaines après l'exposition	Rats mâles Fisher	Augmentation significative du compte cellulaire total, du pourcentage de macrophages et de neutrophiles à tous les temps d'exposition Augmentation de l'expression de MnSOD dans les poumons	Janssen <i>et coll.</i> 1994
23,5	NR*	20	NR*	NR*	NR*	12 semaines	6 et 12 mois après l'exposition	Rats mâles Fisher	Après 6 mois, peu de fibrose et retour au niveau contrôle après 1 an Réplication des cellules alvéolaires après 1 an	Baggs <i>et coll.</i> 1997
23,5 ± 3,2	NR*	20	MMAD = 0,78 µm (1,7)	50 m ² /g	anatase	12 semaines	4, 8, 12, 41 et 64 semaines après l'exposition	Rats mâles Fisher	NP retrouvées dans l'interstitium pulmonaire T1/2 clairance pulmonaire 501 jours Augmentation statistiquement significative du nombre de neutrophiles Après 41 semaines début de réactions fibrotiques	Ferin <i>et coll.</i> 1992
23,5 ± 2,9	NR*	20	MMAD = 0,71 µm (1,9)	50 m ² /g	anatase	12 semaines	4, 8 et 12 semaines après le début de l'exposition	Rats mâles Fisher	Fraction significative de NP retenue dans le poumon Fraction significativement plus grande de NP transférées aux nodules lymphatiques --> montre une capacité plus grande des NP à se retrouver dans l'espace interstitiel (44 %) après déposition alvéolaire Hyperplasie des cellules de type II, particulièrement dans les macrophages contenant des agrégats de NP	Oberdörster <i>et coll.</i> 1994

NR* = non rapporté

On peut conclure que la toxicodynamique des NP de TiO₂ est un phénomène complexe (Garnett et Kallinteri 2006; Ayres *et coll.* 2008). En effet, les études *in vivo* par voie d'inhalation permettent de constater, en fonction des paramètres mesurés, que les NP de TiO₂ faiblement agglomérées dans les aérosols (< 100 nm) lors d'expositions aiguës ne semblent pas recruter et activer les cellules du système immunitaire inné comme les macrophages et les neutrophiles. De plus, dans ces études les réponses cytotoxiques et oxydantes n'ont pas été mesurées (Geiser *et coll.* 2008; Rossi *et coll.* 2010; Leppänen *et coll.* 2011; Morimoto *et coll.* 2011; Lindberg *et coll.* 2012). En faisant un parallèle avec les études toxicocinétiques, on remarque que la pénétration dans le tissu pulmonaire (cellules endothéliales et épithéliales, fibroblastes, tissus conjonctifs) et la translocation dans des compartiments extra-pulmonaires est possible pour les NP faiblement agglomérées dans des aérosols (diamètre moyen < 80 nm) à de faibles concentrations massiques (< 0,7 mg/m³) (Takenaka *et coll.* 2001 et 2006; Oberdörster *et coll.* 2002 et 2004; Geiser *et coll.* 2005 et 2008; Elder *et coll.* 2006a). Ainsi, il est d'un grand intérêt de chercher à évaluer les effets toxicologiques induits par les NP de TiO₂ faiblement agglomérées (< 100 nm) dans des aérosols à plus fortes concentrations massiques, en ciblant des biomarqueurs de cytotoxicité (concentration en protéines totales, LDH et phosphatase alcaline) et de stress oxydant (glutathion, hème oxygénase 1 et 8-isoprostane) reflétant la toxicocinétique pulmonaire des NP déjà documentée par voie d'inhalation (voir la section précédente sur la toxicocinétique). En effet, à notre connaissance, ceci n'a jamais été effectué, puisque les études toxicologiques ayant généré des aérosols de TiO₂ faiblement agglomérés n'ont pas évalué les réponses cytotoxiques et oxydantes. D'autre part, les effets toxiques pulmonaires rapportés à ce jour font suite à une exposition à des NP de TiO₂ agglomérées, dont la taille dans les aérosols dépasse les cent nanomètres (Ferin *et coll.*

1992; Grassian *et coll.* 2007a et b; Ma-Hock *et coll.* 2009; Bermudez *et coll.* 2004). Puisqu'on associe à ces NP agglomérées un certain potentiel inflammatoire, qui semble être réversible et d'intensité légère à modérée à la suite d'expositions subaiguës ou sub-chroniques, il est essentiel d'établir le compte cellulaire total et différentiel avec une attention particulière pour les neutrophiles et les macrophages et de cibler les bio-marqueurs d'inflammation associés à l'activation de la phagocytose par les macrophages alvéolaires, tels que les interleukines et les chimiokines suivantes : IL-6, TNF- α , IFN- γ , MIP-1, MIP-2 et MIP-3 pour déceler des effets pulmonaires. Par ailleurs, l'évolution de la réaction inflammatoire dans le temps est bien documentée. En effet, le neutrophile est le premier type cellulaire à se retrouver au site de la réaction inflammatoire (Goldsby, 2000). Suite à une agression, l'infiltration de neutrophiles survient habituellement à l'intérieur de 6 heures et l'élimination des particules par les macrophages se fait généralement à l'intérieur de 12 à 16 heures post-exposition (Goldsby, 2000; Andujar *et coll.* 2011). De plus, la demi-vie des neutrophiles dans le sang est relativement courte, de l'ordre de 6 à 8 heures, alors que certains auteurs avancent une durée de 8 heures dans les poumons (MacNee et Selby, 1990; Chopra *et coll.* 2009; Summers *et coll.* 2010). Ainsi, le moment du sacrifice doit être choisi en considérant la cinétique de la réaction inflammatoire aiguë qui dépend notamment de la dose et de la durée d'exposition.

Bien que l'état d'agglomération semble être un facteur crucial à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats toxicologiques, peu d'études sont actuellement disponibles quant à la comparaison de la toxicité découlant d'une exposition à une même NP de départ, mais générée en aérosols ayant des états d'agglomération distincts à concentration massique égale dans un modèle *in vivo*. On constate clairement que d'autres travaux sont nécessaires i)

pour documenter les effets associés aux expositions à des nano-aérosols inférieurs à 100 nm; ii) pour éclaircir *in vivo*, les mécanismes par lesquels les NP induisent leurs effets néfastes sur la santé et iii) les propriétés physico-chimiques des NP (taille de départ, phase cristalline) ou des aérosols générés (concentrations surfaciques, massiques et numériques, diamètre moyen des agglomérats et étendue de la distribution granulométrique) responsables de la nanotoxicité.

1.7 Hypothèses et objectifs de recherche

Hypothèses

En raison du lieu de dépôt des NP dans les voies respiratoires et de leur capacité à être détectées ou à échapper à la phagocytose, différentes formes d'agglomération d'une même NP pourraient produire des effets toxiques pulmonaires différentiels. Il est donc impératif d'évaluer l'influence de l'état d'agglomération des NP de TiO₂ sur la toxicité pulmonaire.

Les hypothèses émises sont que les aérosols composés de NP dont l'état d'agglomération est supérieur à 100 nm généreront un profil de toxicité et une cinétique différents des aérosols dont l'agglomération est inférieure à 100 nm, et ce, pour une même NP, taille de départ et concentration massique dans les aérosols. De plus, à l'intérieur de l'ordre de grandeur du nanomètre, les NP de différentes tailles de départ auront un comportement différent quant à leur capacité à induire des effets toxiques.

Objectif général

L'objectif général de cette thèse est d'étudier l'influence de l'état d'agglomération des NP de TiO₂ de différentes tailles de départ sur la toxicité pulmonaire chez le rat.

Objectifs spécifiques

Développer des méthodes de génération de nano-aérosols de TiO₂ à trois différentes concentrations massiques soit 2, 7 et 20 mg/m³ tout en ayant des distributions granulométriques où le diamètre aérodynamique médian est soit inférieur ou supérieur à 100 nm.

Implanter des méthodes de quantification et de caractérisation des nano-aérosols générés en utilisant, entre autres, un impacteur électrique à basse pression (ELPI) et la microscopie électronique à transmission (MET).

Caractériser et documenter rigoureusement (masse, nombre, taille de départ, état d'agglomération) les NP dans les poudres de départ et dans les aérosols générés.

Exposer des rats aux nano-aérosols générés et documenter les réponses pulmonaires.

Discuter des réponses pulmonaires induites chez le rat en fonction des caractéristiques des différents nano-aérosols et des mécanismes d'action possibles des NP.

Cette thèse est essentiellement présentée sous forme d'articles publiés ou soumis pour publication. Ces articles sont suivis d'un chapitre présentant une analyse complémentaire des résultats pour les nano-aérosols de NP de TiO₂ (5 nm) aux concentrations de 2, 7 et 20 mg/m³.

→ ARTICLE 1 : Generating nano-aerosols showing different agglomeration states from TiO₂ (5 nm) nanoparticles. Application to Toxicological studies, publié dans *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*.

Noël *et coll.* J Occup Environ Hyg 2013, **10**: 86-96.

→ ARTICLE 2 : Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs, publié dans *Toxicology Letters*.

Noël *et coll.* Toxicol Lett 2012, **214**: 109-119.

→ L'ARTICLE 3 : Influence of primary particle size and agglomeration state of inhaled nano-TiO₂ on rat's pulmonary responses, soumis dans *Particle and Fibre Toxicology*.

Chapitre 2 - Generating nano-aerosols from TiO₂ (5 nm) nanoparticles showing different agglomeration states. Application to toxicological studies

Article published in the Journal of Occupational and Environmental Hygiene.

Authors: Noël Alexandra¹, Cloutier Yves², Wilkinson Kevin James³, Dion Chantal², Hallé Stéphane⁴, Maghni Karim⁵, Tardif Robert¹ and Truchon Ginette².

¹ Département de santé environnementale et de santé au travail, Institut de recherche en santé publique, Université de Montréal. ² Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). ³ Département de chimie, Université de Montréal. ⁴ Département de génie mécanique, École de Technologie Supérieure (ÉTS). ⁵ Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Université de Montréal.

2.1 Abstract

Agglomeration of nanoparticles (NP) is a key factor in the generation of aerosols from nanopowders and may represent an important parameter to consider in toxicological studies. For this reason, the characterization of NP aerosols (e.g., concentration, size and structure of agglomerates) is a critical step in the determination of the relationship between exposure and effects. The aim of this study was to generate and characterize aerosols composed of TiO₂ (5 nm) NP showing different agglomeration states. Two concentrations were tested: 2 and 7 mg/m³. Stable mass concentrations over 6 hours were successfully generated by a wet method using Collison and Delavan nebulizers which resulted in aerosols composed of smaller agglomerates (< 100 nm), while aerosols composed of larger agglomerates (> 100 nm) were obtained by dry generation techniques using either a Palas dust feeder or a Fluidized Bed. Particle size distributions in the aerosols were determined by an electrical low pressure impactor. Median number aerodynamic diameters corresponding to the aerosol with smaller and larger agglomerates were 30 and 185 nm respectively for the 2 mg/m³ concentration, and 31 and 194 nm for the 7 mg/m³ experiment. Image analysis by transmission electron microscopy allowed noticing the presence of compact or agglomerates with void spaces in the different nano-aerosols. These characterized nano-aerosols will be used in further experiments to study the influence of agglomerate size on NP toxicity.

Keywords: TiO₂ nanoparticles; nano-aerosol generation; characterization; nanotoxicology; inhalation.

2.2 Introduction

Manufactured nanoparticles (NP) are known for their exceptional physicochemical properties, resulting from their nanoscale structure. It is anticipated that the nanometric properties will influence the biological behavior of these substances⁽¹⁾ and consequently, there is increasing concern associated with the growing use of nanostructured materials in the industrial workplace. NP inhalation is an important route of human exposure. Data on pulmonary effects related to human NP exposure are currently rare but some useful information can be obtained from animal inhalation studies, which are more numerous.

Since the characteristics and properties of the NP present in the nano-aerosol can differ greatly from those of the bulk substances, a rigorous characterization of the inhaled aerosol is necessary.^(2,3,4,5,6,7) Significant efforts must be made to document the structure and size of the agglomerates formed in the aerosols, just like for other exposure metrics such as mass, number, volume and surface.^(6,8) Consequently, research is required on the development and implementation of standardized methods for NP exposure assessments in the workplace and in experimental settings.

To our knowledge sixteen studies have addressed the pulmonary effects of TiO₂ NP during inhalation experiments in rodents. Several used dry powder dispersion techniques^(9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19), NP generator/reactor^(20,21) or nebulization of TiO₂ suspensions^(22,23,24). Only three of these studies have reported generating aerosols with a count

median diameter situated in the nanoscale (< 100 nm). However, time exposure of these experiments were relatively short: 30 minutes⁽²¹⁾, one hour⁽¹⁶⁾ or two hours⁽¹⁷⁾.

NP are very reactive and tend to agglomerate easily when in contact with each other, whether in the starting powder or in the generated aerosols.^(6,25) Agglomeration of NP is a quick process that depends on a number of factors including concentration and primary particle size.⁽⁷⁾ As particle size decreases, the attractive force per unit mass becomes important, which favors agglomeration.⁽²⁵⁾ It is also difficult to re-disperse agglomerates consisting of small particles.⁽⁷⁾ Hence, it is actually a challenge to generate stable and reproducible aerosols composed of NP agglomerates (< 100 nm) at concentrations and exposure times suitable for toxicological studies.

Thus, the purpose of this study was to develop four different exposure scenarios using the same primary TiO₂ NP, to generate consistently nano-aerosols over 6 hours and to produce nano-aerosols composed mainly of nanoscale (< 100 nm) agglomerates. The two exposure concentrations selected for our study, 2 and 7 mg/m³, are based on previous animal inhalation studies.^(15,18,22,23) Hence, the originality of our study is derived from the first time reporting the parameters associated with the sustained generation of TiO₂ nano-aerosols at relatively high concentrations mainly composed of NP agglomerates having an aerodynamic diameter smaller than 100 nm. These nano-aerosols will be used in an animal inhalation experiment to eventually compare their relative toxicity.

2.3 Materials and methods

General experimental study design

This study combined the use of current aerosol generation devices to obtain four exposure conditions from the same nano-powder. Nano-aerosols composed of large agglomerates (LA) (> 100 nm) or small agglomerates (SA) (< 100 nm) at 2 and 7 mg/m³, were produced, measured and characterized for shape and structure. Nano-aerosol generation was performed for 6 hours in a cubic stainless steel 500 L rodent inhalation chamber adapted for nose-only exposures (Unifab, Kalamazoo, MI).

Nanoparticles

TiO₂ NP, anatase, 5 nm, 200 - 220 m²/g specific surface area with a near spherical morphology (Nanostructured and Amorphous Materials Inc., Texas, USA) were stored in a desiccator placed in a fume hood prior to use. These NP were characterized by transmission electron microscopy (TEM) (field emission gun (FEG) JEOL JEM-2100F) and X-ray diffraction (XRD) (Philips, model: X'Pert, Lelyweg, The Netherlands).

Nebulization of 5 nm TiO₂

Generation of nano-aerosols composed of SA was achieved using a six-jet Collison device (BGI Inc.) placed in parallel with a Delavan siphon spray nebulizer (Part number 30609-2 used with an adapter, part number DLN 17147, Delavan Spray Technologies, Goodrich

Corporation, Montreal, Canada) (Figure 1A). A 5 g/L NP suspension in distilled water (Milli-Q reference A+ system, water purification system with total oxidizable carbon indicator, Millipore Corporation) was filtered on Whatman 41 filter paper (Piscataway, NJ, USA) to remove large agglomerates and sonicated for 10 minutes (Bransonic tabletop ultrasonic cleaner, model 5510, Branson, Danbury, CT, USA). This suspension was poured in the Collison and Delavan devices. Since the filtered suspension didn't allow reaching the targeted mass concentration, 2 g (2 mg/m³ experiment) or 7 g (7 mg/m³ experiment) of the TiO₂ powder were added in the Collison device, which contained 450 ml of the original suspension. This new suspension was not sonicated. The suspension was agitated for the entire generation period using magnetic stirring plates placed under each nebulizer. A syringe pump was used at a rate between 5.1 and 8.4 ml/h to gradually add suspension in the Collison device. Dual-element heating tapes (624 watts, 120 VAC, Cole-Parmer, Canada) wrapped around a copper tube were used to dry the aerosol, prior to its dispersion in the inhalation chamber.

The suspension used to generate the aerosol composed of SA at 2 mg/m³ was characterized by transmission electron microscopy (TEM) and Nanoparticle tracking analysis (NTA). For TEM, the suspension samples were first allowed to settle for 1 hour. A droplet of sample was then placed on a 400 mesh TEM copper grid covered by a carbon film and left to dry under laminar flow conditions for 30 minutes. The electron microscope was operated at an accelerating voltage of 80 kV, (JEOL JEM 1200 EX, Peabody, MA, USA). Analysis was also performed using a NTA (NanoSight NTA 2.0, LM20) with a laser output of 30 mW at 650

nm, also on diluted (10/50) samples. Further information on the characterization techniques that were employed to characterize the NP can be found in Domingos *et al.*⁽²⁶⁾.

Powder dispersion of 5 nm TiO₂

The 2 mg/m³ nano-aerosol composed of LA was generated using a Palas RBG-1000 device (Palas GmbH) placed on line with a homemade Venturi flow ejector which disperses the aerosol (Figure 1B). The 7 mg/m³ nano-aerosol was produced using a Fluidized Bed 3400A device (TSI Inc., Shoreview, MN, USA) (Figure 1C). Exposure concentrations were achieved by adjusting the various feed rates of the respective generators. No charge neutralization was performed.

All four aerosols were generated using compressed air. The compressed air going through the system first passed through a Donaldson high-efficiency industrial filter equipped with a coalescing filter (Donaldson DFSP, Series Model-DF 0070 ZU, Ultra-Filter Superplus, Donaldson Company, Inc., Norcross, GA, USA). The average temperature and relative humidity in the inhalation chamber were $23.1 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ and $37.5 \pm 21\%$ RH. For the 7 mg/m³ experiments, a fan was placed in the inhalation chamber. More details on air flow, generator pressure and other experimental conditions related to the generation of nano-aerosols are found in Table I.

TiO₂ aerosol sampling and characterization

Air samples were collected throughout the experiment (6 hours) on cassettes (Sure Seal, SKC Inc.) using 37-mm polyvinyl chloride (PVC) filters at a flow rate of 4 L/min for gravimetric analysis. Filters were weighted on a Mettler Toledo microbalance, model MX5 (Mettler Toledo, Mississauga, Canada). The mass concentrations were followed and adjusted in real time using a Model 8520 Dust Trak Aerosol Monitor (TSI Inc., Shoreview, MN, USA) previously calibrated with TiO₂ by comparison with the gravimetric method. The Dust Trak recorded the mass concentration every minute and reported the min and max for each 6 hours experiment. Air samples were also collected at a flow rate of 1 L/minute on pre-carbon coated formvar copper grids glued onto 25-mm polycarbonate filters. The glue used was a current cyanoacrylate (Loctite superglue gel, Henkel, Boucherville, Canada) and applied only on a small spot at the periphery of the grid to prevent damage on removal. The sampling durations were 10 and 20 min for 7 and 2 mg/m³ nano-aerosols, respectively. Characterization (shape, agglomeration degree and structure) of the nano-aerosols sampled on these grids was performed by TEM (Philips CM200 equipped with a digital camera: Corel Corp. AMTV600 2Kx2K, 80 kV). Numbers and particle size distributions were monitored in real time with an electrical low pressure impactor (ELPI) (Dekati Ltd., Tampere, Finland) which was operated at a flow rate of 10 L/minute in the filter stage configuration. The sintered impaction substrates were oiled to prevent or reduce particle bounce. NP/agglomerates were classified according to their aerodynamic diameter (7 to 10000 nm). Cumulative size distributions were acquired for the entire aerosol generation period (6 hours). Since the density and the shape of agglomerates change from an impactor stage to another, establishing a unique particle density for the entire aerosol was complex.⁽²⁷⁾ For this reason a density of 3.5 g/cm³ was used. It was

the closest value to TiO₂ bulk density, which is between 3.1 and 4.3 g/cm³.⁽²⁸⁾ The ELPI was also used to determine the median aerodynamic diameter based on the number concentration (NMAD). Air samples were all collected in the area of the inhalation chamber corresponding to the breathing zone of the animals.

NP transport and diffusion in the exposure chamber were modeled in order to verify aerosol spatial uniformity as described and reported in Morency and Hallé.⁽²⁹⁾ Briefly, based on the assumption that NP behave as a passive contaminant, the aerosol dispersion in a velocity field (air flow) was solved with an Eulerian model governed by the Reynolds averaged mass transport equation for the contaminant. Diffusional losses of airborne NP were taken into account by imposing a zero mass fraction at solid walls, and the Brownian diffusion coefficient was determined with the Friedlander model. Air flow was modeled by the three-dimensional Reynolds-averaged Navier-Stokes equations coupled to the k- ω turbulence model.

Both Brownian and turbulent diffusion are considered in the numerical model. Turbulence in the exposure chamber generates diffusion effects which are larger than Brownian diffusion. These turbulent diffusion effects are characterized by the turbulent Schmidt number in the concentration equation. However, the intensity of turbulence becomes negligible near solid walls and the Brownian diffusion is the dominant mechanism in that region. The zero mass

fractions imposed at solid walls assume that nanoparticles are trapped at the walls and neglect their rebound.

The diffusive boundary layer is thinner than the momentum boundary layer, because of the low diffusion coefficient values. Particular attention has been paid to node spacing near walls to make sure the diffusive boundary layer is captured correctly. The inhalation chamber use in this study can be separated into two distinct zones. A mixing zone, where two air jets (filtered air and the aerosol) from the supply vents collide, providing significant turbulence and mixing, and a breathing zone where the nanoparticle mass fraction is fairly uniform with no stagnant areas. The Reynolds number and the flow regime in the breathing zone are shown in Table I.

2.4 Results

Characterization of initial bulk NP

TEM analysis showed that the powder was mainly composed of 5 nm particles essentially present in the form of small agglomerates of 10 to 30 nm. Particles had a spherical or rod-shaped morphology (Figure 2). TEM also revealed the presence of very large agglomerates, composed of multiple primary NP, reaching few nanometers to microns (Figure 2). Analysis by XRD revealed that the TiO₂ NP were predominantly in the anatase form and to a lesser degree (< 10% volume) in the rutile form.

Characterization of NP suspension

The NP suspension used to generate the nano-aerosol composed of SA via nebulization at 2 mg/m³ was analyzed using two techniques. TEM analysis showed that the NP are present in the suspension as small agglomerates. For two samples of 50 particles analyzed, the average size of agglomerates was $n_1 = 116 \pm 46$ nm and $n_2 = 134 \pm 45$ nm. Analysis by NTA showed that the sample was fairly polydisperse, with sizes of agglomerates in the same order of magnitude as shown by TEM, 180 ± 98 nm and 135 ± 78 nm, for samples that had been diluted 10 fold. A slightly larger sample dilution (50 fold) also gave similar values: 166 ± 90 nm and 177 ± 79 nm.

Characterization of nano-aerosols

Details on the size distributions of the four nano-aerosols generated are shown in Table II. The mass concentrations measured gravimetrically were within 2.1% of the targeted exposure concentrations of 2 and 7 mg/m³. As measured with the ELPI, total particle number was higher in the aerosols composed of SA compared to the aerosols composed of LA for the same mass concentration. Total particle number would also be expected to increase with mass concentration for the same aerosol size distribution, which is observed for the aerosols composed of SA generated at 2 and 7 mg/m³, using a wet generation system, but not for the aerosols composed of LA, produced by dry dispersion techniques. As will be discussed below, size distribution profiles of the nano-aerosols (Figure 1) can explain this difference. NMAD (D₅₀) represents the aerodynamic diameter for which 50% of the particles present in the aerosol are smaller than this value. D₂₅, D₅₀ and D₇₅ were calculated from the cumulative size distributions based on the number concentrations (Figure 4) acquired by the ELPI for the four aerosols. The D₅₀ obtained for the nano-aerosols generated by nebulization were 30 and 31 nm for the 2 and 7 mg/m³ exposure concentrations respectively, whereas the D₅₀ values of 185 (2 mg/m³) and 194 nm (7 mg/m³) were obtained for the nano-aerosols generated by powder dispersion techniques (Table II). D₇₅ – D₂₅ is the interquartile range and represents the size range where 50% of the particles are found. The interquartile ranges for the nano-aerosols composed of SA or LA did not overlap for a given concentration. In this study, the nanometric size range has been defined as being between 1 and 100 nm. As shown in Table II, the percentage of agglomerates showing an aerodynamic diameter < 100 nm was also estimated for each aerosol. For nano-aerosols generated by nebulization, a majority of the agglomerates, determined by number concentration, were in the nanometric size range, i.e., 86% (2 mg/m³)

and 91% (7 mg/m^3) whereas only 22% (2 mg/m^3) and 35% (7 mg/m^3) of the agglomerates were smaller than 100 nm for the powder dispersion technique. For this latter technique, agglomerates were mainly in the submicron range (100 - 1000 nm). Figure 5 shows representative TEM images of particle deposition patterns for the 7 mg/m^3 nano-aerosols composed of SA or LA, which are consistent with the aerosols' size distribution determined with the ELPI, as will be discussed below. In addition, TEM images allowed the observation of qualitative differences in the structure of the agglomerates present in both nano-aerosols generated at 2 mg/m^3 (Figure 6). For a similar agglomerate size, the particles generated by nebulization show a more compact structure (Figure 6A) than those generated by powder dispersion (Figure 6B).

Simulation results based on passive contaminant behavior for both SA and LA suggested that the mass fraction in the inhalation chamber, more specifically in the area normally corresponding to animal's breathing zone, was uniform with a standard deviation of 4%. Zhao and Wu⁽³⁰⁾ suggested an indicator determined by the product of nominal time (τ_n) and relaxation time (τ_r) in order to decide whether the airborne particles could be treated as a passive contaminant. According to Zhao and Wu⁽³⁰⁾, if this product ($\tau_n \times \tau_r$) is smaller than $2.8 \times 10^{-2} \text{ s}^2$, a passive scalar behavior can be assumed. Determination of this indicator for a TiO_2 spherical particle having an aerodynamic diameter of $1 \mu\text{m}$ gives a value of $1.26 \times 10^{-3} \text{ s}^2$, which is 22 times smaller than the upper limit value of Zhao and Wu.^(29,30)

2.5 Discussion

This study reports the experimental conditions related to the generation and characterization of TiO₂ (5 nm) aerosols showing different agglomeration states (NMAD of 30 and 190 nm). This was done for two mass concentrations: 2 and 7 mg/m³. The originality of our study is derived from the first time reporting the parameters associated with the sustained generation (6 h) of TiO₂ nano-aerosols mainly composed of NP agglomerates having an aerodynamic diameter smaller than 100 nm. Indeed, for SA aerosols, 86% to 91% of the particles had diameters under 100 nm and were generated by atomizing a liquid suspension. The novelty of our study was achieved by combining different generating devices to obtain four different exposure conditions from the same nano-powder. These devices included the Palas, the Fluidized Bed, the Delavan and the Collison. The latter is considered as the device offering the best characteristics for inhalation studies by generating aerosols showing stable numbers and mass concentrations over time⁽³¹⁾, which are important criteria for animal inhalation experiments.

In this study, considerable effort was invested in the generation, measurement and characterization of nano-aerosols. Several experimental parameters such as the concentration and the filtration of TiO₂ suspension, the quantity of nano-powder placed in the nebulizers, the use of stirring plaques, the dilution air flow and the adjustment of the various feed rates of the generators were optimized to generate the aerosols having the required characteristics of concentrations and size distributions. This also led to the selection of the combination of the Collison and Delavan nebulizers for the SA aerosols. Based on several generation experiments we observed that the Collison generated stable relatively high mass concentrations, as

previously reported⁽²³⁾ and that the Delavan produced a large amount of small agglomerates as will be discussed below.

The nano-aerosols composed of LA were produced with two different dry-dust generators, a Palas and a Fluidized Bed. The Palas was used for the 2 mg/m³ aerosol and the Fluidized Bed was chosen for 7 mg/m³ experiment, because it showed more stability at higher mass concentrations. In addition, these two types of generators have already been used in rodent TiO₂ inhalation exposures and have resulted in aerosolization of large agglomerated TiO₂ NP.^(4,15,17,18,31) Indeed, dry powder dispersion techniques usually result in greater agglomeration (> 100 nm), since agglomerates of primary NP in the nano-powder are strongly bonded thereby reducing the chance of dispersion of small agglomerates or single NP.^(32,33) Furthermore, these techniques are subject to the creation of very high particle surface charges which can affect agglomeration and the mechanical energy applied is often not sufficient to reduce cluster size in the powder. Since an increase in mass concentration implies an increase in agglomeration of particles^(4,34), the generation of aerosols mainly composed of SA (diameters < 100 nm) at relatively high mass concentration constitutes a greater challenge.

To our knowledge, few studies have reported generating TiO₂ aerosols in the nano-size range: however, mass concentration or exposure time were not always reported.^(16,17,21,31,32) Using a controlled gas-phase NP generator/reactor, Leppänen *et al.*⁽²¹⁾ generated for thirty minutes an 8 mg/m³ TiO₂ (20 nm) aerosol characterized by a size distribution having a geometric mean

particle diameter of 91 nm (GSD: 1.6). Using an electrospray system, Kim *et al.*⁽³²⁾ generated a TiO₂ (25 nm) aerosol characterized by a peak at 60 nm for the size distribution, but no exposure time was reported. These authors also mentioned that mass concentration could be increased up to 20 mg/m³ by adjusting the suspension concentration, but the results were not reported. Schmoll *et al.*⁽³¹⁾ reported aerosolization of 5 nm TiO₂ NP with an electrospray, and measured a geometric mean of 24 nm (GSD: 1.71) in aerosol (exposure time and mass concentration not reported). In this same study, aerosolization of 21 nm TiO₂ NP under the same conditions resulted conversely in capillary clogging, and thus failed to produce stable counts over time, showing a limitation related to electrospray.

In the context of toxicological studies, two other research groups have generated TiO₂ nano-aerosols using the nebulization technique. Ma-Hock *et al.*⁽¹⁸⁾ used a two-component nebulizer (Schlick model 970) to produce TiO₂ (10 - 50 nm) aerosols and reported a median count distribution of 210 nm at 9.8 mg/m³. Grassian *et al.*⁽²³⁾ used a Collison to generate a TiO₂ (5 nm) aerosol at a concentration of 7.22 mg/m³ and reported a geometric mean of 119.5 nm (GSD: 1.56). While the nebulization technique and heating of particles theoretically favors the generation of ultrafine aerosols^(32,35), these authors did not succeed in generating aerosols mainly composed of particles with diameters smaller than 100 nm. An original aspect of our study is the addition of the Delavan in parallel with the Collison. The Collison enabled us to generate aerosols at relatively high mass concentration (e.g. 7 mg/m³), while the use of the Delavan allowed the NMAD (31 nm) to be lowered by increasing the number of small NP agglomerates in the aerosol. The higher air flow that passes through the Delavan nebulizer,

helps to reduce the size of the droplets and might be a reason explaining this difference. Thus, the type and number of nebulizers used constitute important factors contributing to the ultrafine size distribution of the aerosols. It should however be mentioned that in Ma-Hock *et al.*⁽¹⁸⁾ and Grassian *et al.*⁽²³⁾ studies a scanning mobility particle sizer (SMPS) was used to determine a mobility diameter and in our study an ELPI was used to determine an aerodynamic diameter. These two types of diameters are not directly comparable since they are based on different sizing techniques and units. Previous studies^(19,36,37) have made the comparison of these two devices in the characterization of the ultrafine particle size and number concentration in aerosols. Overall these two devices showed good agreement and suggested that the aerodynamic diameters could be larger than the electrical mobility diameter.⁽³⁷⁾

As shown in Table II, nano-aerosols composed of SA had a higher number of particles per cubic centimeter compared to those composed of LA. This is consistent with the fact that a greater number of small particles are necessary to reach the same mass compared to larger particles.^(9,15,18,22,23,34) The total particle number would be expected to increase with mass concentration, which is observed for the nano-aerosols composed of SA generated at 2 and 7 mg/m³ but not for the nano-aerosols composed of LA. Size distribution profiles of these nano-aerosols can explain this difference (Figure 3B and Figure 3D). Despite a similar median value, there were proportionally more LA in the 7 mg/m³ aerosol than in the 2 mg/m³ aerosol. Therefore, increasing the mass concentration from 2 to 7 mg/m³ was achieved by changing the particle size distribution profile. The use of a Venturi in the 2 mg/m³ experiment can explain

this difference since this flow ejector device redisperses the nano-aerosol, resulting in a finer aerosol with a narrower size distribution (Figure 3B). These results, like those obtained in other studies^(4,18,22,23), showed that TiO₂ nano-aerosols can be highly polydisperse. This means that aerosol NMADs can be close in value, whereas their distribution profiles can be totally different. Therefore, a complete characterization of nano-aerosols must be considered and the entire size distribution must be reported, when attempting to better understand the influence of the size distribution of aerosols on their toxicity.

TEM provides two-dimensional images and therefore the comparison of physical diameters measured by TEM with aerodynamic diameters provided by the impactors is not direct. Multiple factors need to be considered in order to establish a correlation between these two different types of diameters.⁽⁷⁾ These factors are related to the physical characteristics of the particles, such as density and shape, and to aerodynamic properties including the Cunningham slip factor. Establishing such a correlation is beyond the scope of this paper, however the deposition patterns obtained by TEM images representing the NP agglomerates present in the different aerosols, qualitatively support the results obtained with the ELPI (Figure 5).

As previously reported in Jiang *et al.*⁽³⁸⁾ study, multiple factors can affect the dispersion characteristics of TiO₂ suspensions. In our study, TEM characterization of the suspension showed small agglomerates in the range of 116 ± 46 nm. Thus, based upon the measurements made on the stock solution used to generate the nano-aerosol composed of SA, it appears that

the nebulizers applied sufficient energy to reduce the overall size of the agglomerates. It is well known that nebulization of an aqueous colloidal suspension results in aerosols in which particle physical characteristics (size, shape and porosity) are dependent upon multiple factors, such as the size of the micelles in suspension, the concentration and the condition of drying, which includes through a heated tube.⁽³⁹⁾ Since the dry powder and the NP suspension both had small agglomerated structures, it seems that the capacity of the generation methods to de-agglomerate the NP is an important factor that affects the size distribution of an aerosol. In this manner, nebulization and dry powder dispersion represent interesting approaches with significant flexibility in NP generation characteristics.

In our study, generation of TiO₂ nano-aerosols by dry-dust generators (Palas and Fluidized Bed) produced more agglomerated structures of TiO₂ NP compared to nebulization (Collison and Delavan) of TiO₂ suspensions. As observed by TEM, NP agglomerates produced by nebulization (Figure 6A) were more compact than those produced by the dry-powder generator (Figure 6B), with the latter agglomerates presenting more spaces between the primary NP. Thus, as mentioned above, we associate the difference observed in the structure of the NP agglomerates to the aerosol generation technique.⁽³⁹⁾

Grassian *et al.*⁽²³⁾ also observed that agglomerates of 21 nm TiO₂ particles had more open void regions at the interface between particles (loose) than those formed from 5 nm particles (compact). They attributed this difference to the initial size of the NP. Indeed, a decrease in

the size of NP implies an increase in the surface area per mass unit and leads to a higher surface-to-volume ratio, increasing the particle surface energy and consequently, its ability to bond to other particles.⁽⁵⁾ In addition, geometrically, if an agglomerated structure is tightly packed, smaller spheres will have less void space. The interesting distinction between agglomerates from Grassian *et al.*⁽²³⁾ and our study is between tight and loose packing of agglomerates of same size single particles. All together, these data suggest that the size and structure of the agglomerates may vary depending on the initial size of the NP, the method used to generate the aerosols, or in the work environment, according to the industrial processes. Most importantly, the biologically active surface of the NP structure will depend on the ability to mirror the characteristics of the specific aerosol exposure environment.

2.6 Conclusion

Using nebulization and dry nano-powder dispersion, it was possible to successfully generate stable 2 and 7 mg/m³ TiO₂ (5 nm) nano-aerosols over 6 hours showing different characteristics in their size distribution. Stable mass concentrations were generated by a wet method using Collison and Delavan nebulizers which resulted in aerosols composed of smaller agglomerates (< 100 nm), while aerosols composed of larger agglomerates (> 100 nm) were obtained by dry generation techniques using either a Palas dust feeder or a Fluidized Bed. The production of aerosols mainly composed of particle agglomerates with an aerodynamic diameter smaller than 100 nm (NMAD in the order of 30 nm) constitutes, to our knowledge, original data. Most significantly, this study highlights the needs of a qualitative and quantitative characterization of the NP and their agglomerates in aerosols. Overall, this study represents an important contribution to the current knowledge related to nano-aerosol generation and characterization techniques in nanotoxicology, more specifically for animal exposure studies.

Acknowledgements

Special thanks are expressed to Annie Ouellet of the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail* (IRSST) for her technical support.

Declaration of interest

This work was supported by a grant from the Quebec Center for Asthma in the Workplace and was also a collaborative multi-disciplinary research initiative in the *Axe de recherche en nanotoxicologie* of the *Réseau de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec* (RRSSTQ). Alexandra Noël is a recipient of Ph. D. scholarships from the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail* (IRSST) and from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ). The authors declare that they have no conflict of interest.

2.7 References

1. **Schrand A. L., D. Liming, J. J. Schlager and S.M. Hussain:** Toxicity Testing of Nanomaterials. *Adv Exp Med Biol* 745: 58-75 (2012).
2. **Balbus, J.M., A.D. Maynard, V.L. Colvin, V. Castranova, G.P. Daston, R.A. Denison, et al.:** Meeting report: hazard assessment for nanoparticles--report from an interdisciplinary workshop. *Environ Health Perspect* 115: 1654-1659 (2007).
3. **Warheit, D.B., R.A. Hoke, C. Finlay, E.M. Donner, K.L. Reed, and C.M. Sayes:** Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* 171: 99-110 (2007).
4. **Ma-Hock, L., A.O. Gamer, R. Landsiedel, E. Leibold, T. Frechen, B. Sens, et al.:** Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials. *Inhal Toxicol* 19: 833-848 (2007).
5. **Oberdörster, G., A.D. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, et al.:** Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 2: 8 (2005).
6. **Powers, K.W., S.C. Brown, V.B. Krishna, S.C. Wasdo, B.M. Moudgil, S.M. Roberts:** Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part IV. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Tox Sci* 90: 296-303 (2006).

7. **Powers, K.W., M. Palazuelos, B.M. Moudgil, S.M. Roberts:** Characterization of the size, shape and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology* 1: 42-51 (2007).
8. **Maynard, A.D. and J.A. Robert:** Assessing exposure to airborne nanomaterials: Current abilities and future requirements. *Nanotoxicology* 1: 26-41 (2007).
9. **Ferin, J., G. Oberdorster, D.P. Penney:** Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 535-542 (1992).
10. **Oberdörster, G., J. Ferin, R. Gelein, S.C. Soderholm, and J. Finkelstein:** Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 97: 193-199 (1992).
11. **Oberdörster, G., J. Ferin, and B.E. Lehnert:** Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5: 173-179 (1994).
12. **Janssen, Y.M., J.P. Marsh, K.E. Driscoll, P.J. Borm, G. Oberdörster, and B.T. Mossman:** Increased expression of manganese-containing superoxide dismutase in rat lungs after inhalation of inflammatory and fibrogenic minerals. *Free Radic Biol Med* 16: 315-322 (1994).
13. **Heinrich, U., R. Fuhst, S. Rittinghausen, O. Creutzenberg, B. Bellmann, W. Koch et al:** Chronic inhalation exposure of Wistar rats and 2 different strains of mice to

diesel-engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* 7: 533–556 (1995).

14. **Baggs, R.B., J. Ferin, and G.Oberdorster:** Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol* 34: 592-597 (1997).
15. **Bermudez, E., J.B. Mangum, B.S. Wong, B. Asgharian, P.M. Hext, D.B. Warheit, et al.:** Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 77: 347-357 (2004).
16. **Geiser, M., M. Casaulta, B. Kupferschmid, H. Schulz, M. Semmler-Behnke, and W. Kreyling:** The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 371-376 (2008).
17. **Nurkiewicz, T.R., D.W. Porter, A.F. Hubbs, J.L. Cumpston, B.T. Chen, D.G. Frazer, et al.:** Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Part Fibre Toxicol*, 5: 1 (2008).
18. **Ma-Hock, L., S. Burkhardt, V. Strauss, A.O. Gamer, K. Wiench, R.B. Van, et al.:** Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol* 21: 102-118 (2009).
19. **Rossi, E.M., L. Pykkänen, A.J. Koivisto, M. Vippola, K.A. Jensen, M. Miettinen et al.:** Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticules induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci* 113: 422-433 (2010).

- 20. Warheit, D.B., W.J. Brock, K.P. Lee, T.R. Webb, and K.L. Reed:** Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci* 88: 514-524 (2005).
- 21. Leppänen, M., A. Korpi, M. Miettinen, J. Leskinen, T. Torvela, E.M. Rossi, et al.:** Nanosized TiO₂ caused minor airflow limitation in the murine airways. *Arch Toxicol* 85: 827-839 (2011).
- 22. Grassian, V.H., P.T. O'shaughnessy, A. Adamcakova-Dodd, J.M. Pettibone, and P.S. Thorne:** Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect* 115: 397-402 (2007).
- 23. Grassian, V.H., A. Adamcakova-Dodd, J.M. Pettibone, P.T. O'Shaughnessy, and P.S. Thorne:** Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology* 1: 211-226 (2007).
- 24. Van, R.B., R. Landsiedel, E. Fabian, S. Burkhardt, V. Strauss, and L. Ma-Hock:** Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO(2), pigmentary TiO(2) and quartz. *Toxicol Lett* 186: 152-159 (2009).
- 25. Preining, E.:** The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *J Aerosol Sci* 29:418-495 (1998).

- 26. Domingos, R.F., M.A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. Reid, N. Tufenkji, J.R. Lead et al.:** Characterizing manufactured nanoparticles in the environment - multimethod determination of particle sizes. *Environ. Sci. Technol* 43: 7277-7284 (2009).
- 27. Coudray, N., A. Dieterlen, E. Roth and G. Trouvé:** Density measurement of fine aerosol fractions from wood combustion sources using ELPI distributions and image processing techniques. *Fuel* 88: 947-954 (2009).
- 28. Ibaseta, N.:** Étude expérimentale et modélisation de l'émission d'aérosols ultrafins lors du déversement de poudres nanostructurés. Thèse, Institut National polytechnique de Toulouse, Toulouse (2007).
- 29. Morency F., and S. Hallé:** Modelling Nanoparticles Transport in an Animal Exposure Chamber: A Comparison between Numerical and Experimental Measurements. *Advanced in Fluid Mechanics VIII*, Editor M. Rahman, C.A. Brebbia, WIT Press, Southampton, England, pp. 533-544 (2010).
- 30. Zhao, B. and J. Wu:** Numerical Investigation of Particle Diffusion in a Clean Room. *Indoor and Built Environment* 14: 469-479 (2005).
- 31. Schmoll, L.H., S. Elzey, V.H. Grassian, P.T. O'Shaughnessy:** Nanoparticle aerosol generation methods from bulk powders for inhalation exposure studies. *Nanotoxicology* 3: 265-275 (2009).

- 32. Kim, S.C., D.R. Chen, C. Qi, R.M. Gelein, J.N. Finkelstein, A. Elder, et al.:** A nanoparticle dispersion method for in vitro and in vivo nanotoxicity study. *Nanotoxicology* 4: 42-51 (2010).
- 33. Valverde, J.M. and A. Castellanos:** Fluidization, bubbling and jamming of nanoparticle agglomerates. *Chemical Engineering Science* 62: 6947-6956 (2007).
- 34. Hinds, W.C.:** Aerosol Technology, Properties, Behavior and Measurement of airborne particles. John Wiley & Sons Inc., New York, 483 pp. (1999).
- 35. Hakim, L.F., J.L. Portman, M.D. Casper, A.W. Wiemer:** Aggregation behavior of nanoparticles in fluidized beds. *Powder Technology* 160: 149-160 (2005).
- 36. Marjamäki, M., J. Keskinen, D.R. Chen, and D.Y.H. Pui:** Performance evaluation of the electrical low-pressure impactor (ELPI). *J. Aerosol Sci.* 31: 249-261 (2000).
- 37. Mostofi, R., A. Noël, F. Haghghat, A. Bahloul, J. Lara, and Y. Cloutier:** Impact of two particle measurement techniques on the determination of N95 class respirator filtration performance against ultrafine particles. *J Haz Mat* 217-218: 51-57 (2012).
- 38. Jiang, J., G. Oberdorster, P. Biswas:** Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res* 11:77– 89 (2009).
- 39. Hidy, G.M.:** Aerosols An industrial and Environmental Science. Academic Press, Inc. (London) LTD., 774 pp. (1984).

Table I

Experimental conditions for nano-aerosol generation

Experimental groups	Generation techniques	Total air flow entering chamber (m ³ /h)	Generator pressure (psi)	Specific parameters	Reynolds number
2 mg/m ³ SA ^a	Collison and Delavan	4.80	30	-	7646 (turbulent)
2 mg/m ³ LA ^b	Palas and Venturi	4.77	58 - 60	Brush speed = 2 mm/h and 1205 RPM	7591 (turbulent)
7 mg/m ³ SA ^a	Collison and Delavan	4.20	32	-	6693 (turbulent)
7 mg/m ³ LA ^b	Fluidized bed	4.80	15	Bed speed = 40, bed flow = 10, bead purge = 2	7646 (turbulent)

^a Nano-aerosol composed of small agglomerates.

^b Nano-aerosol composed of large agglomerates.

Table II

Measurements of nano-aerosols

Parameters	2 mg/m ³ SA ^a	2 mg/m ³ LA ^b	7 mg/m ³ SA	7 mg/m ³ LA
Mass concentration ^c	2.02	1.96	7.12	7.15
Min and max ^d (mg/m ³)	1.50 and 2.74	1.77 and 3.34	5.79 and 8.98	6.35 and 8.92
Total particle number ^e (/cm ³)	1 187 491	161 898	7 644 322	19 573
NMAD ^f (nm)	30	185	31	194
D ₂₅ and D ₇₅ ^g (nm)	17 and 61	108 and 284	17 and 49	81 and 470
Fraction of NP agglomerates <100 nm (%)	85.6	22.3	90.9	35.3

All measurements (cassettes, Dust Trak, ELPI) were recorded over the entire 6 hour period.

^a Nano-aerosol composed of small agglomerates.

^b Nano-aerosol composed of large agglomerates.

^c Measured by weight measurement.

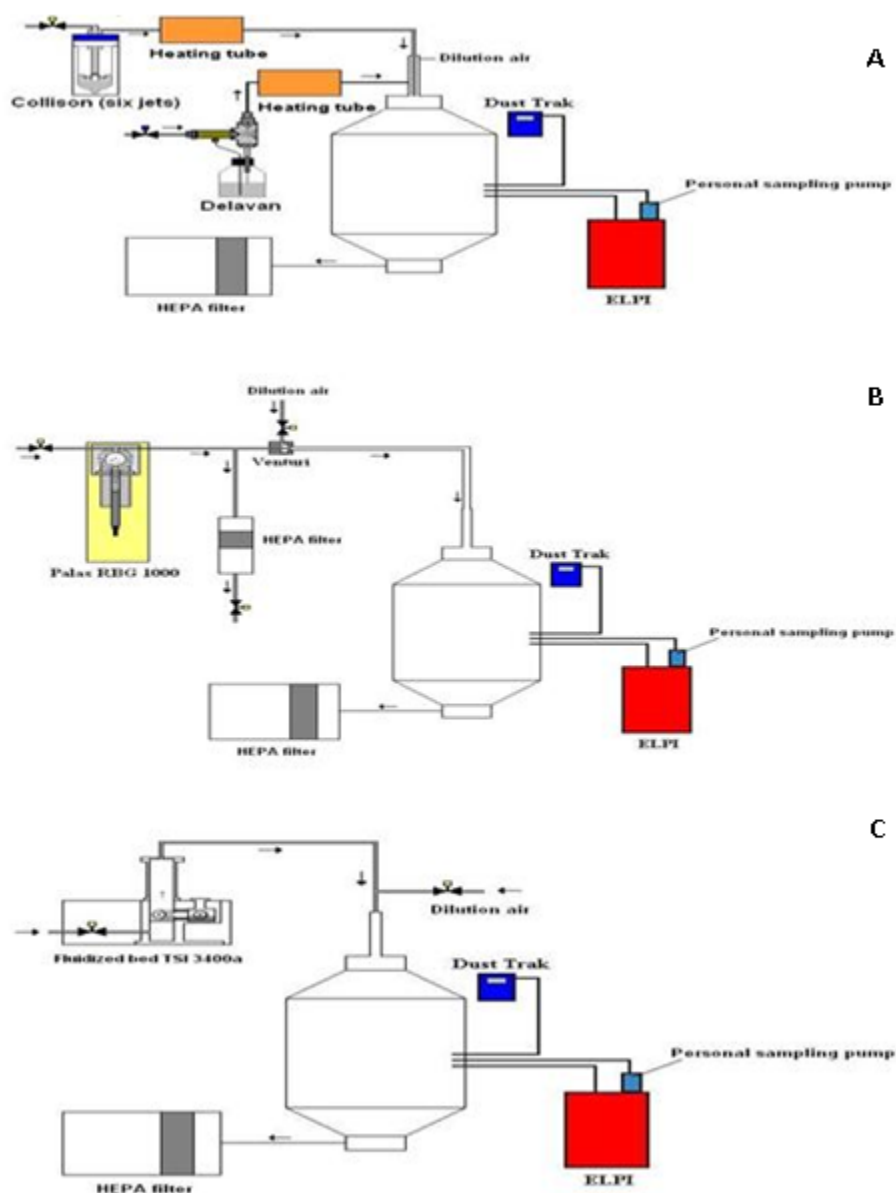
^d Measured with a Dust Trak.

^e Measured with an ELPI.

^f Number median aerodynamic diameter, measured with an ELPI.

^g Aerodynamic diameters for which 25% (D₂₅), 50% (D₅₀ or NMAD) or 75% (D₇₅) of the particles in the aerosol are smaller than this value.

Figure 1. Experimental setups for the generation of nano-aerosols



A) Generation system for the nano-aerosols composed of SA at 2 and 7 mg/m³. Atomization of a TiO₂ suspension with a six-jet Collison and a Delavan. **B)** Generation system for the nano-aerosol composed of LA at 2 mg/m³. Dry NP powder dispersion with a Palas and a Venturi. **C)** Generation system for the nano-aerosol composed of LA at 7 mg/m³. Dry NP powder dispersion with a fluidized bed.

Figure 2. Nano-TiO₂ bulk powder TEM characterization

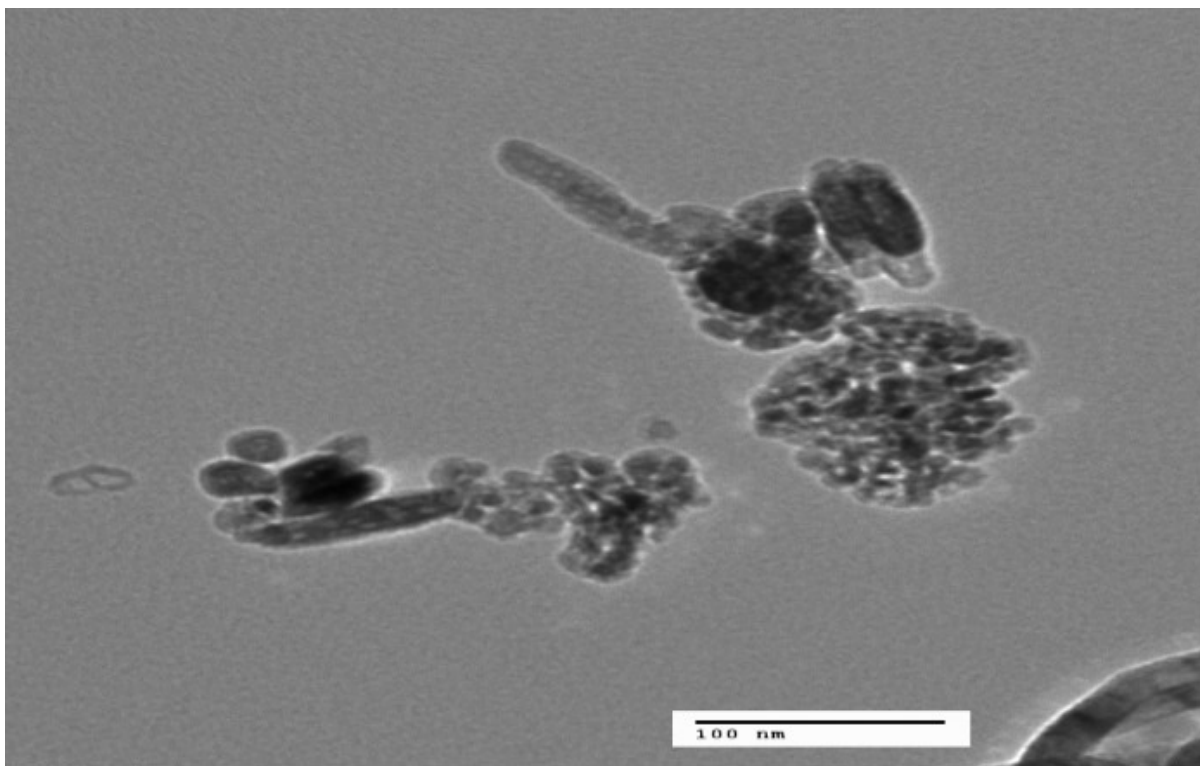
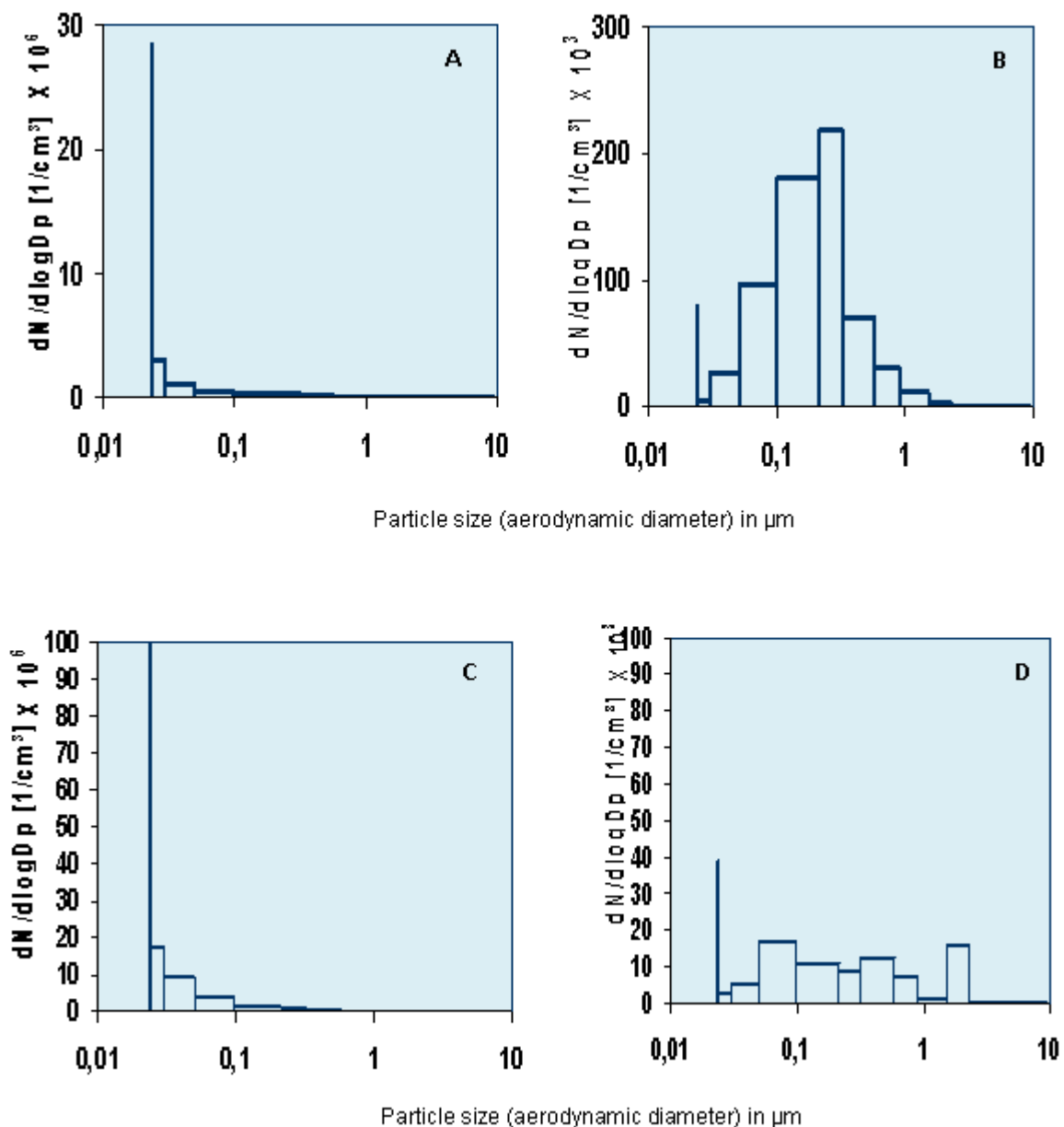


Image shows NP with a spherical or rod-shaped morphology.

Figure 3. Size distribution profiles of nano-aerosols measured by the ELPI



Size distribution profiles based on number collected over 6 hours measured by the ELPI for the **A)** nano-aerosol composed of SA at 2 mg/m³ produced by a wet method using Collison and Delavan nebulizers; **B)** nano-aerosol composed of LA at 2 mg/m³ produced by a dry dispersion technique using a Palas and a Venturi; **C)** nano-aerosol composed of SA at 7 mg/m³ produced by a wet method using Collison and Delavan nebulizers; **D)** nano-aerosol composed of LA at 7 mg/m³ produced by a dry dispersion technique using a Fluidized Bed.

Figure 4. Cumulative distributions based on number concentration of nano-aerosols measured by the ELPI

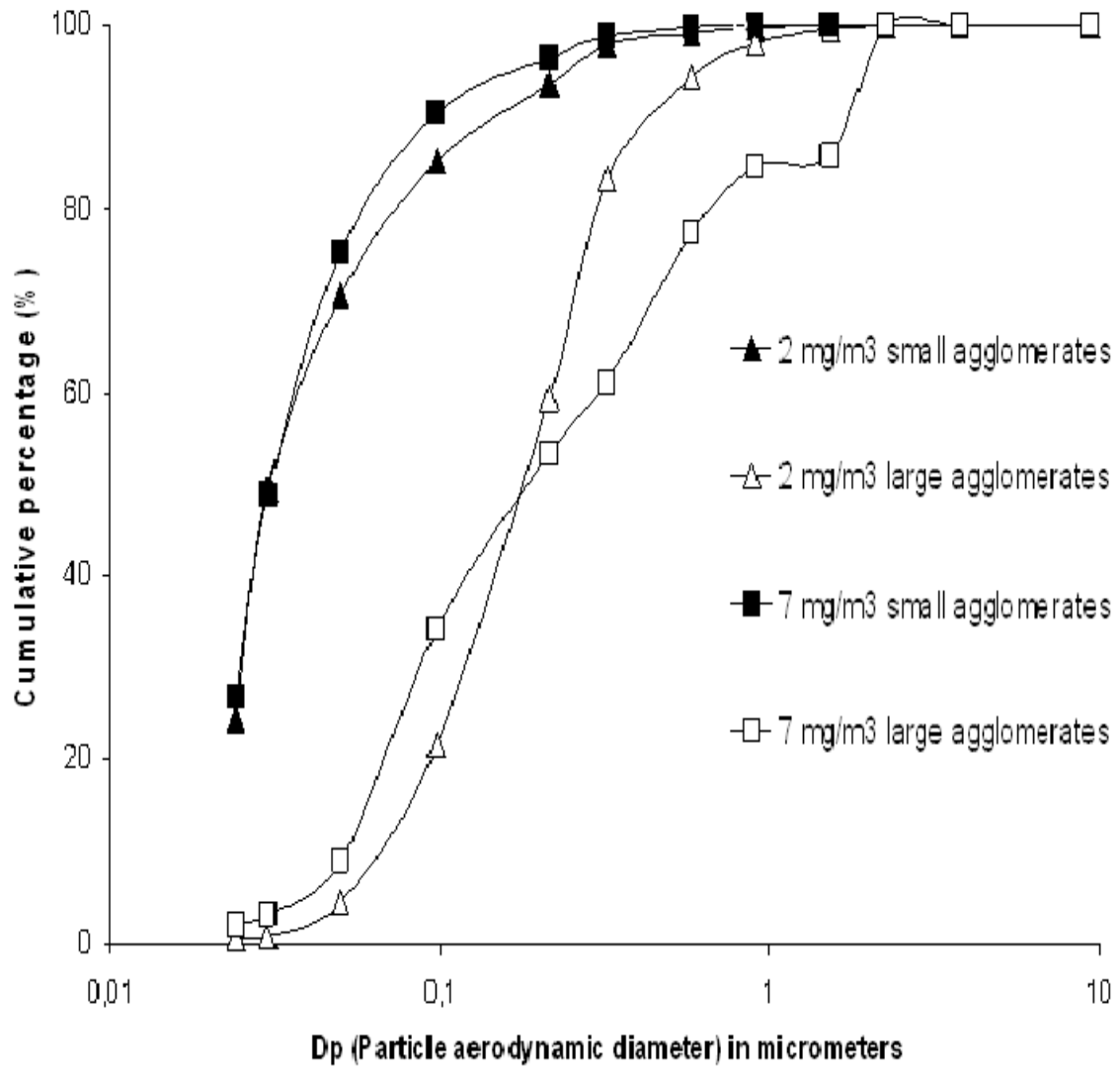
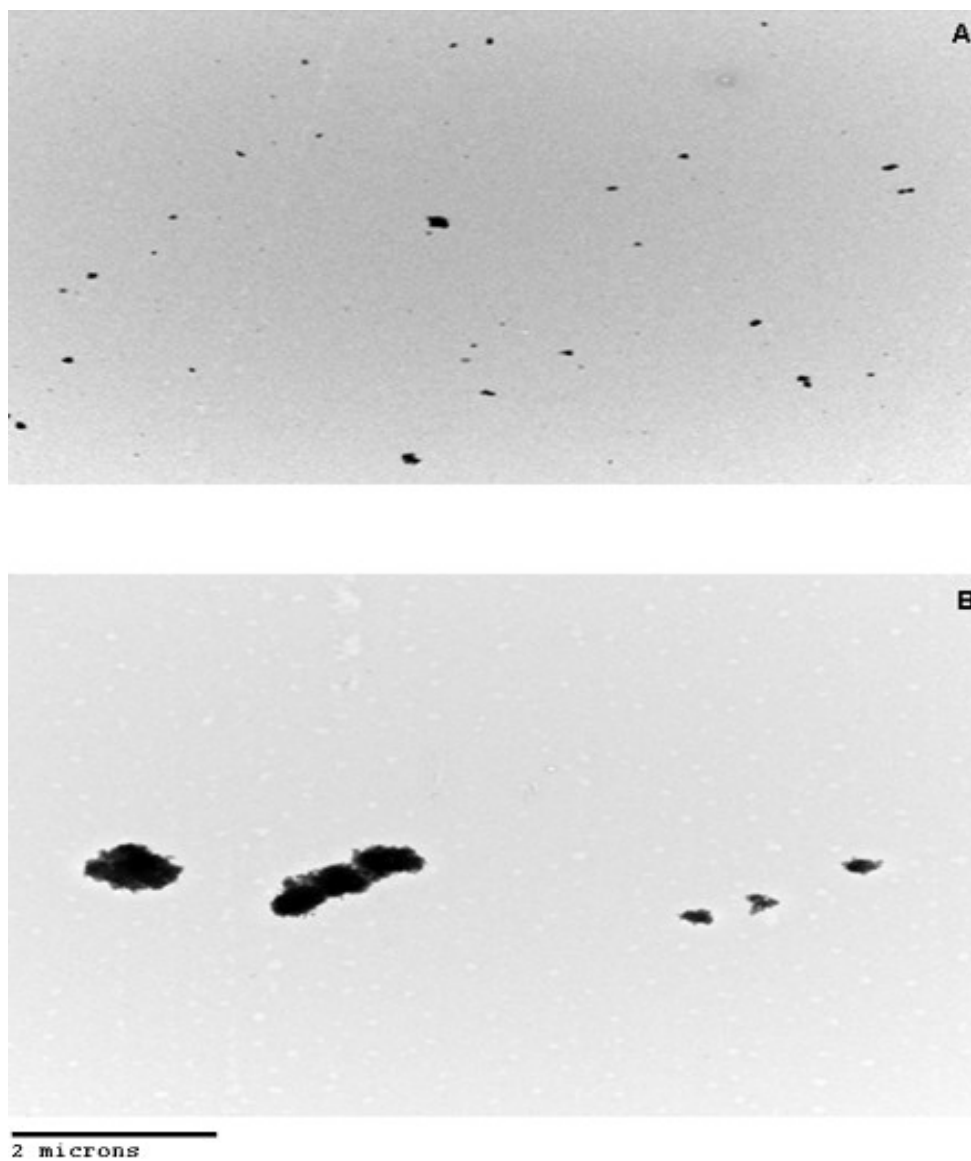
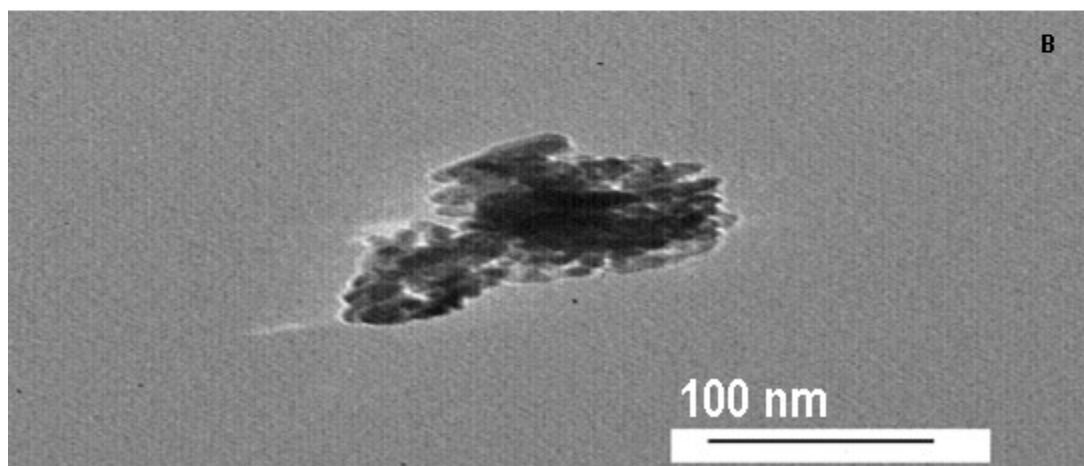
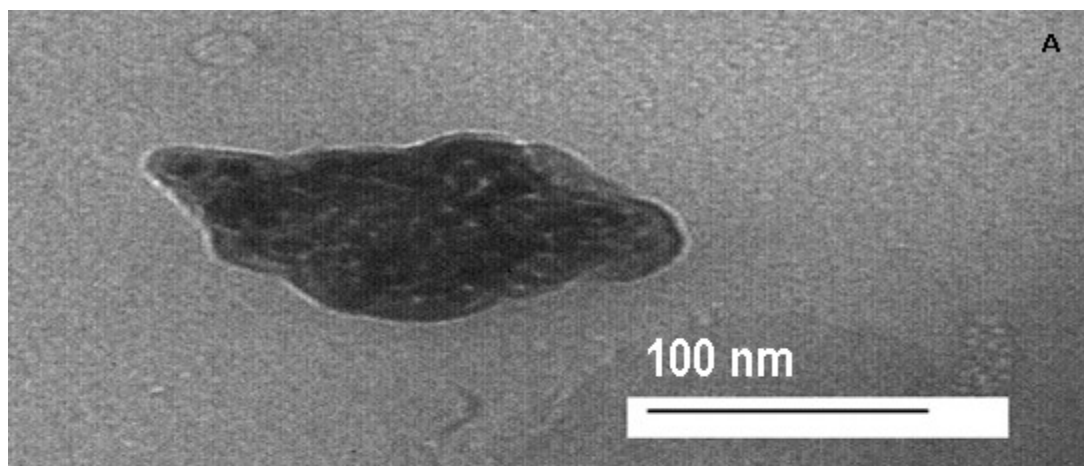


Figure 5. Nano-TiO₂ agglomerates collected from the nano-aerosols at 7 mg/m³



Images obtained by TEM with a 2500 X magnification **A)** Nano-TiO₂ agglomerates collected from the nano-aerosol composed of SA; **B)** Nano-TiO₂ agglomerates collected from the nano-aerosol composed of LA.

Figure 6. Nano-TiO₂ agglomerates collected from the nano-aerosols at 2 mg/m³



Images obtained by TEM **A)** with a 45 000 X magnification, typical tight or dense nano-TiO₂ agglomerate collected from the nano-aerosol composed of SA produced by nebulization; **B)** with a 33 000 X magnification, typical nano-TiO₂ agglomerate with empty spaces collected from the nano-aerosol composed of LA produced by powder dispersion.

Chapitre 3 - Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs

Article published in Toxicology Letters.

Authors: Noël A¹, Maghni K², Cloutier Y³, Dion C³, Wilkinson K.J⁴, Hallé S⁵, Tardif R¹ and Truchon G³.

¹Département de santé environnementale et de santé au travail, Institut de recherche en santé publique, Université de Montréal. ²Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Université de Montréal. ³Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). ⁴Département de chimie, Université de Montréal. ⁵Département de génie mécanique, École de Technologie Supérieure (ÉTS).

3.1 Abstract

Nano-aerosols composed of large agglomerates (LA) (> 100 nm) are more likely to promote pulmonary clearance via macrophages phagocytosis. Small agglomerates (SA) (< 100 nm) seem to escape this first defense mechanism and are more likely to interact directly with biological material. These different mechanisms can influence pulmonary toxicity. This hypothesis was evaluated by comparing the relative pulmonary toxicity induced by aerosolized nano-TiO₂ showing two different agglomeration states: SA (< 100 nm) and LA (> 100 nm) at mass concentrations of 2 or 7 mg/m³. Groups of Fisher 344 male rats were nose-only exposed for 6 hours. The median number aerodynamic diameters were 30 and 185 nm at 2 mg/m³, and 31 and 194 nm at 7 mg/m³. We found in rat's bronchoalveolar lavage fluids (BALF) a significant 2.1-fold increase in the number of neutrophils (p < 0.05) in the group exposed to the 7 mg/m³ LA nano-aerosol suggesting a mild inflammatory response. Rats exposed to the 7 mg/m³ SA nano-aerosol showed a 1.8-fold increase in LDH activity and 8-Isoprostane concentration in BALF, providing evidence for cytotoxic and oxidative stress effects. Our results indicate that biological responses to nanoparticles (NP) might depend on the dimension and concentration of NP agglomerates.

Keywords: TiO₂ nanoparticles; inflammation; cytotoxicity; oxidative stress; agglomeration state; inhalation.

3.2 Introduction

Effects related to nanoparticles (NP) (< 100 nm) large surface-to-mass ratio and quantum effects give them new characteristics compared to materials of the same chemical composition but of larger dimension (Baggs *et al.* 1997; Oberdörster *et al.* 2005a; Stone *et al.* 2007; Warheit 2008). Thus, over the past decade, massive investments have been made in nanotechnology research and development to support their uses in the electronics, cosmetics, medical and pharmaceutical fields (Donaldson and Seaton 2007; Stone *et al.* 2007). It is anticipated that millions more nanotechnology-related jobs will be created in the years to come (Simeonova 2007).

A growing number of scientific and government reports indicate that NP might represent new risks to human health and the environment (NIOSH 2011; Gwinn and Vallyathan 2006; Nel *et al.* 2006; Balbus *et al.* 2007; Tetley 2007; Li *et al.* 2010; Warheit *et al.* 2007a, Warheit *et al.* 2010). Both *in vivo* and *in vitro* studies have shown that some NP, including titanium dioxide (TiO₂), can cause harmful effects on cells and biological systems whereas larger particles of the same substance are relatively less toxic (Ferin *et al.* 1992; Oberdörster *et al.* 1994; Kaewamatawong *et al.* 2006; Sager *et al.* 2008; Shimada *et al.* 2009; Christensen *et al.* 2011). Differences in toxicity have been attributed to the small size of the NP, their large surface area or high surface reactivity, their crystal phases and their prolonged residence times in the lung (Renwick *et al.* 2004; Warheit *et al.*, 2005, 2007b and c; Warheit *et al.* 2008; Pauluhn 2009; Schmid *et al.* 2009). NP are thought to induce pulmonary toxicity through inflammation and oxidative stress mechanisms (Oberdörster *et al.* 1994; Li *et al.* 2003; Xia *et al.* 2006a and b).

In a workplace context, inhalation is the most plausible human exposure scenario (Song *et al.* 2009). NIOSH has recommended in 2011 exposure limits of 2.4 mg/m³ for fine and 0.3 mg/m³ for ultrafine TiO₂ (NIOSH, 2011). Therefore, experiments with inhaled NP are highly relevant means of acquiring sound toxicological data on nanomaterials (Pauluhn and Mohr 2000; Pauluhn 2005; Mühlfeld *et al.* 2008; Jacobsen *et al.* 2009; Bakand *et al.* 2012). However, significant efforts must be made to ensure that the NP are relevant to the exposure context and that their characterization is rigorous (Oberdörster *et al.* 2005b; Warheit *et al.* 2006, 2007b, c; Grassian *et al.* 2007a and b; Ma-Hock *et al.* 2007; Pauluhn 2009). The intrinsic properties of the NP, the structure and size of agglomerates, and a number of exposure metrics (e.g., mass, volume, number, surface area, size distribution) are all necessary parameters for understanding the relationships between NP dose and biological effects.

Surface area measurements have been widely studied and have shown potential for relating NP exposure dose and pulmonary responses (Oberdörster *et al.* 1992; Brown *et al.* 2001; Moss and Wang. 2006; Stoeger *et al.* 2006; Monteiller *et al.* 2007; Herve-Bazin 2007, NIOSH 2011). Significant production of free radicals can occur on the surface of the NP, and therefore, surface morphology is surely an important parameter related to cellular effects (Donaldson *et al.* 1996; Dick *et al.* 2003; Herve-Bazin 2007). Nonetheless, to the best of our knowledge, there is no consensus regarding the dose metric that best correlates NP exposure dose to biological effects (Oberdörster *et al.* 2005a; Kreyling *et al.* 2006; Warheit *et al.* 2006; Monteiller *et al.* 2007; Wittmaack 2007; Heitbrink *et al.* 2009; Pauluhn 2011).

Nearly fifteen studies have addressed the pulmonary effects induced by nTiO₂ during inhalation experiments in rodents (Ferin *et al.* 1992; Oberdöster *et al.* 1992 and 1994, Janssen *et al.* 1994; Heinrich *et al.* 1995; Baggs *et al.* 1997; Bermudez *et al.* 2004; Warheit *et al.* 2005; Grassian *et al.* 2007a and b; Geiser *et al.* 2008; Nurkiewicz *et al.* 2008; Ma-Hock *et al.* 2009; Van *et al.* 2009; Rossi *et al.* 2010; Leppänen *et al.* 2011). However, numerous tested variables such as exposure time, mass concentration, size, surface chemistry, crystalline phase of NP and the size of the agglomerates in the aerosols, makes difficult to compare the different studies. Hence, it is complex to establish a clear relationship between the physicochemical properties of the NP and the induction of pulmonary toxicity (Murr *et al.* 2004; Johnston *et al.* 2009; Kobayashi *et al.* 2009).

Agglomeration of metal oxide NP, particularly TiO₂, is central to the generation of nano-aerosols. Agglomeration can lead to micron-sized particles and a decrease in the number of NP present in the aerosol (Hinds, 1999). A few studies have investigated how agglomeration influences the relationship between the NP exposure dose and the induction of pulmonary toxicity (Ferin *et al.* 1992; Grassian *et al.* 2007b); however, to our knowledge, no study has yet evaluated the toxicity of inhaled nano-sized (<100 nm) agglomerates, most likely due to the technical limitations related to their generation.

The possible disaggregation of NP agglomerates by pulmonary surfactants is still uncertain (Ferin *et al.* 1992; Maynard 2002; Maier *et al.* 2006; Grassian *et al.* 2007b). However, the initial size of the agglomerates is a factor that determines their deposition in the lung, their ability to cross biological barriers, and their capacity to reach and enter cellular targets that are not accessible to larger micron-sized particles or agglomerates (> 100 nm) (Nemmar *et al.* 2003; Foged *et al.* 2005; Oberdörster *et al.* 2005a; Koike and Kobayashi 2006; Donaldson and Seaton 2007). For example, large NP agglomerates (> 100 nm) are more likely to promote pulmonary clearance by alveolar macrophages than smaller NP agglomerates, thus reducing persistence time in the deep lung, and hence airway toxicity. Alternatively, small NP agglomerates (< 100 nm) may escape the pulmonary defense systems and induce deleterious effects by interacting with cells in the lung (Maynard 2002, Oberdörster *et al.* 2005a; Maier *et al.* 2006; Herve-Bazin 2007; Grassian *et al.* 2007a and 2007b; Skebo *et al.* 2007; Soto *et al.* 2007).

Based on all of the above, it is highly relevant to examine the potential impact of agglomerate size on the pulmonary toxicity. To our knowledge, no *in vivo* inhalation study has compared the toxicological effects associated with aerosols composed of the same initial NP and showing different size distributions. Thus, the aim of this study is to compare the relative rat pulmonary toxicity induced by two distinct agglomeration state TiO_2 aerosols.

3.3 Materials and methods

General experimental study design

Animal inhalation exposures were performed in a cubic stainless steel 500-L inhalation chamber (Unifab, Kalamazoo, MI). Ports were placed on a single wall of the inhalation chamber so that only the nose of the animal was exposed to the aerosol. Four groups of rats (n = 6) were exposed to nano-aerosols composed of 5 nm nTiO₂ for 6 hours; two control groups (n = 6) were exposed to clean compressed air. Nano-aerosols were generated with size distributions consisting of large (> 100 nm) or small agglomerates (< 100 nm), at a mass concentration of 2 or 7 mg/m³. The animals were sacrificed 16 hours after the end of the exposure period and bronchoalveolar lavages (BAL) were performed to determine cellular and markers of pulmonary toxicity.

Nanoparticles

nTiO₂ (anatase, nominal size of 5 nm) with a specific area of 200 - 220 m²/g and a near spherical morphology was purchased from Nanostructured and Amorphous Materials Inc. (Texas, USA). These NP were characterized by transmission electron microscopy (TEM) (field emission gun (FEG) JEOL JEM-2100F), X-ray spectrometric analysis (EDS) and X-ray diffraction (XRD) (Philips, model: X'Pert, Lelyweg, The Netherlands).

Animals

Thirty-six 8-week-old male CDF (F344)/CrIBR (Charles River Breeding Laboratories, St. Constant, Quebec, Canada) rats with an average weight on the day of sacrifice of 169 ± 13 g were housed at the animal care facilities of the University of Montreal. The rats were placed two per cage and had access to water and food *ad libitum*. The animals were exposed to a 12-hour / 12-hour day/night cycle from 6:00 am to 6:00 pm. The animals were acclimatized to the inhalation chamber for a period of six days prior to NP exposure. Weight gain for each animal was recorded daily. The research project was approved by the University of Montreal's Ethics Committee on Animal Experiments.

Generation and characterization of nano-aerosols

Two nebulizers, a six-jet Collison (BGI Inc.) and a Delavan siphon spray nebulizer (Part number 30609-2 used with an adapter, part number DLN 17147, Delavan Spray Technologies, Goodrich Corporation, Montreal, Canada) were placed in parallel in order to produce the nano-aerosol composed mostly of small agglomerates from an NP suspension in distilled water (5 g/L). The nano-aerosols composed essentially of large agglomerates were generated using a dry NP powder dispersion technique with a Palas RBG-1000 (Palas GmbH) placed in series with a home-made venturi flow ejector for the 2 mg/m^3 nano-aerosol, or using a fluidized bed technique (Fluidized Bed, TSI Inc., Shoreview, MN, USA) for the 7 mg/m^3 nano-aerosol.

Air samples were collected throughout the experiment (6 hours) on cassettes (Sure Seal, SKC Inc.) using 37-mm polyvinyl chloride (PVC) filters at a flow rate of 4 L/min for gravimetric analysis. The mass concentrations were followed and adjusted in real time using a Model 8520 DustTrak Aerosol Monitor (TSI Inc., Shoreview, MN, USA) previously calibrated with the 5 nm TiO₂ powder. Air samples were also collected at a flow rate of 1 L/minute on pre-carbon metallized copper grids glued onto 25-mm polycarbonate filters. Sampling durations were 10 min for the 7 mg/m³ nano-aerosols and 20 min for the 2 mg/m³ sample. The shape, agglomeration degree, and structure of the nano-aerosols on the grids were analyzed by TEM (Philips CM200 equipped with a digital camera: Corel Corp. AMTV600 2Kx2K, 80 kV). Numbers and particle size distributions were monitored in real time with an electrical low pressure impactor (ELPI) (Dekati Ltd., Tampere, Finland), which was operated at a flow rate of 10 L/minute in the filter stage configuration. The sintered impaction substrates were oiled to prevent or reduce particle bounce. Cumulative size distributions were determined for the entire aerosol generation period. The ELPI was also used to determine the median aerodynamic diameter based on particle number (NMAD). All air samples were collected in the area of the inhalation chamber near the breathing zone of the animals.

Pulmonary deposition modeling

The rat's airway particle dosimetry was estimated using the Multiple-Path Particle Dosimetry Model (MPPD) (software version 2.11, Applied Research Associates Inc., Albuquerque, NM, USA). The respiratory tract deposition of NP agglomerates was estimated for each nano-aerosol.

Bronchoalveolar lavages and pulmonary toxicity analysis

The animals were anaesthetized with isoflurane and sacrificed by exsanguination. Fluids from the BAL (BALF) were collected with 0.9% saline. A first 5-mL wash was followed by four 4-mL washes that were pooled and placed on ice. The collected BALF were centrifuged at 1300 rpm at a temperature of 5°C for 10 minutes. The supernatant from the first 5-mL wash was separated into six aliquots of equal volume and frozen at -80°C. These aliquots were used for cytotoxicity analysis. The BALF of the four 4-mL washes were combined with the cell pellet of the first 5-mL wash. Cells were fixed after centrifugation by adding 1 mL of a phosphate buffered saline (PBS) with 1% bovine serum albumin (BSA) and 200 µL of Transfix (cellular antigen stabilizing reagent) (Cytomark Ltd., Buckingham, England).

A hemacytometer was used to determine total cell counts. The cytospin cell staining method (Accustain Giemsa stain, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) was used to obtain differential cell counts for lymphocytes, neutrophils and macrophages. Inflammation markers were quantified for interleukins IL-1 α , IL-6, TNF- α , MIP-1 α and MCP-1 using a Bio-Plex system bases on the Luminex technology and the use of kit for rats (Millipore Canada Ltd.). Cytotoxicity was evaluated by determining levels of lactate dehydrogenase (LDH) (Cytotoxicity Detection Kit for LDH, Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) and alkaline phosphatase (ALP) (Alkaline phosphatase assay kit QuantiChrom DALPÉ-250, Gentaur, Brussels, Belgium). The oxidative stress response was evaluated by measuring glutathione (GSH) (Glutathione Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), 8-Isoprostane (8-Isoprostane EIA kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), and Heme-

oxygenase 1 (HO-1), an inducible isoform expressed in response to stress such as oxidative stress (ImmunoSet™ HO-1 (rat, EIA development set, Enzo Life Sciences, Canada). The integrity of the alveolar-capillary barrier was determined by measuring the total protein concentration in BALF. Enzyme absorbance and protein analysis were measured in duplicate with an Elx808iu spectrophotometer (Bio-Tek Instruments Inc.). Results were compiled using KC4 software.

Statistical procedures

BALF cytology and pulmonary inflammation, cytotoxicity and oxidative stress markers were analyzed using nonparametric procedures. The Kruskal-Wallis test was first used to determine whether there were differences between the groups. If the resulting p-value was statistically significant ($p \leq 0.05$), a pairwise comparison of each group was performed using the Mann-Whitney test. Values of inflammation markers that were below the minimum detectable concentration (MinDC) were treated as equal to MinDC/2. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 17.0, SPSS Inc.).

3.4 Results

Measurement and characterization of nano-aerosols

The characterization of the bulk nTiO₂ used to produce the aerosols is summarized in Table 1 and TEM images are showed in Figure 1. Data of the characterization of nano-aerosols carried out with the ELPI, the DustTrak and by gravimetric measurements are presented in Table 2. From the cumulative size distributions obtained with the ELPI, three values for the number size distributions were estimated, namely the first quartile (D₂₅), the midpoint (D₅₀) or NMAD, and the third quartile (D₇₅). Based on the observation that the interquartile ranges (D₇₅ – D₂₅) for the different nano-aerosols did not overlap, it can be concluded that the nano-aerosols were generated in two distinct agglomeration states.

Pulmonary deposition

Estimation of NP pulmonary lung burden has been calculated using the following formula: lung burden = pulmonary aerosol concentration x minute ventilation x exposure time x fraction deposited (Kreyling *et al.* 2004; Nurkiewicz *et al.* 2008). Physiological data estimating the rat minute ventilation was 200 mL and the deposited fraction 10% (Kreyling *et al.* 2004; Nurkiewicz *et al.* 2008). Therefore, the lung burden of rats exposed to the 2 mg/m³ nano-aerosols was 14.5 µg for the aerosol composed of small agglomerates, and 14.1 µg for the aerosol composed of large agglomerates. The lung burden of rats exposed to 7 mg/m³ nano-aerosols was 51.3 µg for the aerosol composed of small agglomerates and 51.5 µg for the aerosol composed of large agglomerates. Based on the polydisperse diameter interquartile

range (Table 2), the estimated respiratory tract deposition fraction of NP agglomerates was computed with the MPPD model for each nano-aerosol (Figure 2).

Rat pulmonary toxicity

When differential cell counts were expressed as percentage of total cell populations, data indicated that total leukocytes recovered from BAL were essentially composed of macrophages (> 92%) followed by neutrophils (< 5.5%) (Figure 3). BALF cytologic analyses from rats exposed to both small and large agglomerates at a mass concentration of 2 mg/m³ showed no statistically significant differences for the total number of cells, the number of neutrophils or the number of macrophages compared to the control group (Figure 4). On the other hand, the exposure to the large agglomerates at the higher concentration (7 mg/m³) increased significantly neutrophil numbers when compared to controls (Figure 4). The slight increase in neutrophils observed following exposure to the small agglomerates was not significant (Figure 4). Furthermore, no significant differences were noted in BALF differential cell counts between experimental groups exposed to the two concentrations.

For all experimental groups, three of the five inflammatory mediators examined were below the threshold detection limit of the kit (IL-1 α < 6.23 pg/mL, IL-6 < 9.80 pg/mL and TNF- α < 4.44 pg/mL). Figure 5 shows the results obtained for the macrophage inflammation markers MIP-1 α and MCP-1. A small but non-significant increase in MCP-1 was observed for the two groups exposed to 7 mg/m³. The determination of markers of cytotoxicity and oxidative stress in rats exposed to 2 and 7 mg/m³ showed no statistically significant differences between

groups for the activity of LDH, ALP or the concentrations of total protein and 8-Isoprostane, HO-1 or GSH. However, when compared to controls, LDH activity and 8-Isoprostane concentrations showed a nearly two-fold increase ($p = 0.065$) in the 7 mg/m^3 nano-aerosol composed of small agglomerates (Figures 6 and 7).

Cell morphology from BALF cytopreparations of rats are shown in Figure 8. For all groups, the majority of the cells were typical, although few giant cells (macrophages) were observed. Both control groups showed typical macrophages, lymphocytes and neutrophils. No cell containing nTiO₂ was observed for these groups. Groups exposed to large agglomerates at 2 and 7 mg/m^3 showed essentially typical cell morphology, however with an important presence of macrophages containing nTiO₂. The same cell morphology was observed for the groups exposed to small agglomerates at both exposure concentrations; conversely macrophages that had engulfed nTiO₂ were much less abundant.

3.5 Discussion

This study was designed to compare the toxicity of TiO₂ nano-aerosols in relation to their size distributions. Moreover, the originality of our study is also derived from the first time reporting a sustained animal exposure (6 h) to TiO₂ nano-aerosols mainly composed of NP agglomerates having an aerodynamic diameter smaller than 100 nm.

The estimated calculated lung burden in rats exposed to 2 and 7 mg/m³ were 14 and 51 µg, respectively. When adjusting for dose and exposure time, these results were comparable to lung burdens found in other studies exposing similarly to nTiO₂ (Geiser *et al.* 2008; Ma-Hock *et al.* 2009). Even though there is a difference by a factor of more than 10 in exposure concentrations (0.1 mg/m³ vs 2 and 7 mg/m³) and lung burdens (1 – 2 µg vs 14 and 51 µg) between Geiser *et al.* (2008) and our study, these two studies show that few small agglomerates (< 100 nm) are phagocytosed by alveolar macrophages (Figure 8). Considering that hardly any field studies have monitored nTiO₂ workplace exposure scenarios, comparison to a realistic context is difficult. Curwin and Bertke (2011) reported in facilities using nTiO₂ average mass concentrations of 0.00247 mg/m³ and of 0.0783 mg/m³ for area and personal samplings, respectively. Lee *et al.* (2011) quantified mass concentrations ranging from 0.1 to 4.99 mg/m³ in TiO₂ NP manufacturing plants. Generally, it seems that nTiO₂ exposure concentrations in the workplace are low and thus, in those conditions, lung burden should not be higher than what was estimated in our study. Also, *in silico* analyses indicate that pulmonary deposition was different for the two nano-aerosols generated at 7 mg/m³ (Figure 2). Given their different agglomeration states (D₅₀ = 31 and 194 nm, Table 2), it can be assumed,

as described by Oberdörster *et al.* (2005a) as well as Geiser and Kreyling (2010), that the penetration of the two nano-aerosols into the various regions of the respiratory tract is different.

Interestingly, BALF analyses showed only a statistically significant increase in the number of neutrophils for the group exposed to the large agglomerates (Figure 4). In our animal model of NP exposure, the main cellular component of BALF is macrophages. The increase in the number of macrophages and neutrophils is a trademark of pulmonary inflammation (Goldsby *et al.* 2000; Oberdörster *et al.* 2005b; Warheit *et al.* 2005; Ma-Hock *et al.* 2009). In our study, the exposure to large agglomerates indicated the beginning of a mild and discrete inflammatory response characterized by a significant increase in neutrophil numbers, as well as by an increase in the macrophage inflammation marker MCP-1 levels (Figure 5). The absence of changes in macrophage numbers indicated that neutrophils were mainly driving the acute response. However, based on the other inflammation marker results, inflammation was likely not cytokine dependant since no increase in IL-1 α , Il-6 and TNF- α are observed. Pulmonary inflammation is a normal defense mechanism to particles but it may lead to adverse effects if sustained (Cho *et al.* 2010). Based on the literature (Bermudez *et al.* 2004; Grassian *et al.* 2007a and b; Ma-Hock *et al.* 2009), such an inflammatory response following inhalation of nTiO₂ is likely to be transient and resolved fairly quickly. Several other *in vivo* studies involving nTiO₂ have shown that pulmonary inflammation was characterized by a neutrophilic infiltration and an increase in the macrophage population (Ferin *et al.* 1992; Grassian *et al.* 2007a and b; Johnston *et al.* 2009; Ma-Hock *et al.* 2009; Rossi *et al.* 2010),

which is in line with the results of our study (Figure 3). Overall, these studies point out that in BALF cells, neutrophils seem to be the most sensitive endpoint.

The internalization of particles or other substances inside a cell occurs through endocytosis. The different mechanisms of endocytosis are principally dependent on the size and nature of the substance. Other factors, such as substance physico-chemical properties and interaction with receptors can also influence these mechanisms (Rabinovitch 1995). Phagocytosis is used for pathogens or large particles (> 500 nm) and pinocytosis is used for macromolecules, viruses or small particles, which is mediated by clathrin and caveolin (Aderem and Underhill, 1999; Conner and Schmid 2003). The size threshold necessary to activate phagocytosis and pinocytosis has not yet made consensus. However, numerous review articles (Oberdörster 1988; Yang *et al.* 2008; Mansour *et al.* 2009) concluded that the process of phagocytosis by alveolar macrophages is generally efficient for particles in a size range of 500 to 3000 nm, and that particles having a size below 260 nm can more easily escape phagocytosis (Morrow 1988; Oberdörster 1997 and 2001; Kreyling *et al.* 2002 and 2006; Semmler *et al.* 2004; Semmler-Behnke *et al.* 2007; Muhlfield *et al.* 2007a, b and c; Geiser and Kreyling 2010). For a same substance, several research studies have compared the size effect. In an *in vitro* system, Pratten and Lloyd (1986) demonstrated for a same weight of particles per unit volume of culture medium that large latex particles (1 100 nm) were internalized more rapidly by rat peritoneal macrophages than 100 nm particles, which, among all sizes used, showed the slowest uptake. A study conducted by Ferin *et al.* (1992) exposed rats subchronically by inhalation to 23 mg/m³ of ultrafine (21 nm) TiO₂ particles and showed that they accessed the

pulmonary interstitium to a greater extent than their fine (250 nm) counterpart at equivalent masses. The authors explained their results by the fact that particles escaping phagocytosis by alveolar macrophages had more chances of being uptaken by type I epithelial cells and of translocating into the interstitium. Using an acute exposure dog model, Kanapilly *et al.* (1982) have also demonstrated that a gallium oxide aerosol having a particle volume median diameter of 20 nm was cleared more rapidly from the lungs, than an agglomerated aerosol composed of the same primary particle size showing a 100 nm volume median diameter. The faster clearance of the smallest particles was attributed to the fact that they were not majorly phagocytized by macrophages and were rather cleared through the circulation system. Using only NP, Takenaka *et al.* (2001 and 2006) observed in rats acutely exposed by inhalation a limited uptake of silver and gold NP by macrophages (Takenaka *et al.* 2001 and 2006). In the same manner, Geiser *et al.* (2008) found at 1 and 24 hours post-exposure that only 0.2% and 1.7% of macrophages contained nTiO₂, and that the average size of particles found in macrophages was 31 ± 8 nm and 34 ± 10 nm, respectively. Taken together, all of these studies highlight that small particles are less detected and phagocytized by alveolar macrophages and thus, are more likely to interact with cells and lung tissue than larger counterparts.

Our results support the literature data. For the 7 mg/m³ aerosol composed of small agglomerates (< 100 nm), we observed that the LDH activity and the 8-Isoprostane concentration were higher than in the control group (Figures 6 and 7). LDH is a cytoplasmic enzyme that is released by dead cells and hence a suitable marker of cell cytotoxicity. 8-Isoprostane is a biomarker of lipid peroxidation and oxidative stress (Beck-Speier *et al.* 2005;

Fahmy and Cormier 2009). Therefore, these results are suggestive of cytotoxic and oxidative stress effects. Whereas, the characterization of the 7 mg/m³ aerosol composed of large agglomerates shows a size distribution ($D_{25} = 81$ nm, $D_{50} = 194$ nm, $D_{75} = 470$ nm; Table 2) which could be more easily detected by immune system cells, including alveolar macrophages (Figure 8). It is well known that macrophage phagocytosis activation signals, initiates the inflammatory and innate immune responses by producing and secreting proinflammatory mediators such as: reactive oxygen species, neutrophils chemotactic factors, interleukins (IL-6, IL-12, TNF- α) and cytokines (MIP-1 β and MIP-2) (Oberdörster 1988; Aderem and Underhill, 1999). In our study, activation of macrophages following phagocytosis of large NP agglomerates is supported by a slight increase in MCP-1 (Figure 5) and a significant increase in the number of neutrophils in BALF (Figure 4).

Thus, nano-aerosols composed of small or large agglomerates, at equal mass concentrations of 7 mg/m³, both seemed to induce mild pulmonary toxicity, but through different cellular pathways. This distinction has not been found by other studies. Furthermore, these results are consistent with the current hypothetical mechanisms of pulmonary toxicity induced by NP, stipulating that NP can induce toxicity through an oxidative stress and inflammation paradigm (Donaldson *et al.* 1998, 2001 and 2003; Nel *et al.* 2001; Oberdörsters *et al.* 2005a; Xia *et al.* 2006b; Li *et al.* 2010).

In our study, the 2 mg/m³ exposure induced no significant pulmonary toxicity (Figures 4 to 7), which is consistent with previous reports. In studies of Bermudez *et al.* (2002) and Ma-Hock *et al.* (2009) rats were exposed by inhalation to agglomerated 21 and 25 nm nTiO₂ (mass median aerodynamic diameter of 1.29 μm and median diameter of 250 nm, respectively). For sacrifices made after the exposure, only the immunohistological analyses of lung tissues revealed statistical differences for cell replication in the alveoli and terminal bronchioles when compared to control animals (Bermudez *et al.* 2004; Ma-Hock *et al.* 2009). Whether airway remodeling is also observed in our animal model of NP exposure is presently unknown, but it is surely an issue to explore. Interestingly, after a 3-day recovery in the Ma-Hock *et al.* (2009) study, cytotoxicity markers were significantly increased, although they returned to control levels after 16 days. Nonetheless, when sacrifices were made immediately after the last exposure, none of these studies noted a significant effect on the primary endpoints used to assess inflammatory response (total cell count) or cytotoxicity markers at 2 mg/m³, irrespective of the primary particle size of the nTiO₂ (5, 21 and 25 nm), the agglomeration state in the aerosols (30 nm to > 1000 nm), the proportion of nanometric-sized agglomerates, the crystalline phase of the TiO₂, or the duration of exposure (6 hours, 5 days and 13 weeks). Globally, this suggests that inhalation exposure to nTiO₂ at such a concentration does not induce significant acute pulmonary toxicity, at least for the parameters analyzed.

In Nurkiewicz *et al.* (2008) study, rats exposed to inhaled 21 nm nTiO₂ with a mode at 100 nm in aerosols at concentrations varying from 1.5 to 12 mg/m³ for up to 12 hours showed no evidence of pulmonary inflammation or lung damage. However, there was significant

arteriolar vasodilation in the NP-exposed group with respect to both the control and the fine TiO₂ exposed groups. These findings strongly suggest that cardiovascular effects may occur at lower concentrations or particle size distributions than for pulmonary toxicity associated with cytologic changes. Whether similar cardiovascular effects occur in our animal model of NP exposure is presently unknown.

In Grassian *et al.* (2007b), mice exposed to inhaled agglomerated nTiO₂ of 5 or 21 nm at concentration of 7 mg/m³ over 4 hours (mean particle size in aerosols: 120 and 153 nm, respectively) showed a moderate inflammation reaction in both groups; however, it was slightly more pronounced in mice exposed to the 21 nm TiO₂. These results are similar to our study for the 7 mg/m³ aerosol composed of large agglomerates.

Relevant dose metrics for spherical nano-oxides

Although an early acute inflammatory response following exposure to the large agglomerates (> 100 nm) at 7 mg/m³ was observed in our animal model, it cannot be concluded that the large agglomerates represent a greater risk than the small agglomerates (< 100 nm) since the transient inflammatory response is a natural defense mechanism. Although no significant effects were noted following exposure to the small agglomerates, there are clear trends that show that this nano-aerosol induced both cytotoxic and oxidative stress effects without an apparent activation and recruitment of immune cells as measured in the BALF. Cytotoxic and

oxidative stress effects occurred at smaller agglomerate sizes than those causing significant recruitment and activation of immune cells.

To the best of our knowledge, there is no consensus on the most accurate metric to express the NP exposure dose. Alternative metrics to the conventional mass concentration have been put forward, such as volume, number or surface area concentrations, based on their greater sensitivity to the novel properties of the NP (Schmid *et al.* 2009). However, based on our results (Table 2), it appears that the use of only the mass or the number concentration as a metric might be misleading, given the observed differences between the small and large agglomerates at 7 mg/m³. Thus, the use of mass concentration alone might mask the effects related to agglomeration in the aerosol. Two distinct total particle number concentrations (Table 2) were obtained for the 7 mg/m³ nano-aerosols. However, interpretation of data based on number concentration alone should also be done cautiously since the use of this metric does not allow any distinction between distribution effects and results occurring due to the unique particle sizes at either end of the tails of the distribution. Furthermore, it is likely crucial to properly characterize the size distribution of the nano-aerosol. Careful sizing of the agglomerate will be important in integrating the concept of regional pulmonary deposition based on size (Oberdörster *et al.* 2005a). It might also allow a more mechanistic discrimination of pulmonary toxic effects based on the agglomerate dimension. Ideally, a conventional metric such as mass should be used conjointly or in an integrated manner with NP agglomeration state. Size distributions of the NP agglomerates should be reported with a minimum of 3 values, or by providing key indices of distribution width, such as the

polydispersity index. A rigorous characterization of particle sizes and particle size distribution will allow researchers to more rapidly determine the key factors leading to the toxicity of these novel contaminants.

3.6 Conclusion

Acute inhalation of 5 nm TiO₂ with two distinct agglomeration states, smaller or larger than 100 nm, induced mild pulmonary effects at 7 mg/m³, but via different mechanisms. An acute inflammatory response followed the exposure to large agglomerates (> 100 nm). Clear trends showing both cytotoxic and oxidative stress effects without apparent activation and recruitment of immune cells measured in BALF was observed for small agglomerates (< 100 nm). Our study provides the first evidence that biological responses to NP might depend not solely on the dimension of the NP but also on the dimension of the NP agglomerates. Therefore, the characterization of the size distribution of the NP agglomerates in the aerosol is essential for the establishment of adequate and relevant correlations between NP exposure dose and adverse biological effects. Our results also provide indications of interesting research avenues related to NP and/or nano-aerosol characterization. Furthermore, future research should likely include experiments with chronic exposures, lung tissue histopathology examinations, analysis of additional biomarkers related to lungs or systemic inflammation, cytotoxicity and oxidative stress responses, as well as airway remodeling.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Center for Asthma in the Workplace of Quebec and was also a collaborative multi-disciplinary research initiative of the *Axe de Recherche en Nanotoxicologie du Réseau de recherche en Santé et en Sécurité du Travail du Québec* (RRSSTQ). Alexandra Noël is a recipient of Ph.D. scholarships from the *Institut de recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail* (IRSST) and from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ). Special thanks to Annie Ouellet of the IRSST, Ginette Charest-Tardif of the University of Montreal, and to Lucero Castellanos and Mélanie Welman of the *Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal* for technical support.

3.7 References

Aderem, A. and Underhill, D.M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623.

Baggs, R.B., Ferin, J., & Oberdorster, G., 1997. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol.* 34, 592-597.

Bakand, S., Hayes, A., Dechsakulthorn, F., 2012. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol.* 24, 125-135.

Balbus, J.M., Maynard, A.D., Colvin, V.L., Castranova, V., Daston, G.P., Denison, R.A., Dreher, K.L., Goering, P.L., Goldberg, A.M., Kulinowski, K.M., Monteiro-Riviere, N.A., Oberdorster, G., Omenn, G.S., Pinkerton, K.E., Ramos, K.S., Rest, K.M., Sass, J.B., Silbergeld, E.K., & Wong, B.A., 2007. Meeting report: hazard assessment for nanoparticles--report from an interdisciplinary workshop. *Environ Health Perspect.* 115, 1654-1659.

Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K.L., Schumann, G., Schulz, H., Semmler, M., Takenaka, S., Stettmaier, K., Bors, W., Ghio, A., Samet, J.M., Heyder, J., 2005. Oxidative

stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med.* 38,1080-1092.

Bermudez, E., Mangum, J.B., Wong, B.S., Asgharian, B., Hext, P.M., Warheit, D.B., 2004. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* 77, 347-357.

Brown, D., Wilson, M., MacNee, W., Stone, V., and Donaldson, K., 2001. Size-dependant proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 175, 191-199.

Cho, W.S., Duffin, R., Poland, C.A., Howie, S.E.M., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I.L., Donaldson, K., 2010. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect.* 118, 1699-1706.

Christensen, F.M., Johnston, H.J., Stone, V., Aitken, R.J., Hankin, S., Peters, S., Aschberger, K., 2011. Nano-TiO₂ – feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. *Nanotoxicology.* 5, 110-124.

Conner S.D. and Schmid, S.L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422, 37-44.

Curwin, B. and Bertke, S. 2011. Exposure characterization of metal oxide nanoparticles in the workplace. *J Occup Environ Hyg*. 8, 580-587.

Dick, C.A., Brown, D.M., Donaldson, K., and Stone, V., 2003. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol*. 15, 39-52.

Donaldson, K., Beswick, P., Gilmour, P., 1996. Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol Lett*. 88, 293-298.

Donaldson, K., Li, X., MacNee, W., 1998. Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci*. 29, 553-560.

Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A., and MacNee, W., 2001. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect.* 109, suppl. 4, 523-527.

Donaldson, K., and Stone, V., 2003. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Annali dell' Istituto Superiore Di Sanita.* 39, 405-410.

Donaldson, K., and Seaton, A., 2007. The Janus faces of nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 7, 4607-4611.

Fahmy, B. and Cormier, S.A., 2009. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol In vitro.* 23, 1365-1371.

Ferin, J., Oberdorster, G., and Penney, D.P., 1992. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 6, 535-542.

Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., and Sundblad, A., 2005. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm.* 298, 315-322.

Geiser, M., Casaulta, M., Kupferschmid, B., Schulz, H., Semmler-Behnke, M., & Kreyling, W., 2008. The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 38, 371-376.

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

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., and Osborne, B.A., 2000. *Immunologie le cours de Janis Kuby.* W.H. Freeman and Company, New-York and Basingstoke, 660 pp.

Grassian, V.H., O'shaughnessy, P.T., Mcakova-Dodd, A., Pettibone, J.M., and Thorne, P.S., 2007a. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect.* 115, 397-402.

Grassian, V.H., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J.M., O'Shaughnessy, P.T., and Thorne, P.S., 2007b. Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology.* 1, 211-226.

Gwinn, M.R., and Vallyathan, V., 2006. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect.* 114, 1818-1825.

Heinrich, U., Fuhst, R., Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Koch, W., & Levsen, K., 1995. Chronic inhalation exposure of Wistar rats and 2 different strains of mice to diesel-engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol.* 7, 533–556.

Heitbrink, W.A., Evans, D.E., Ku, B.K., Maynard, A.D., Slavin, T.J., and Peters, T.M., 2009. Relationships among particle number, surface area, and respirable mass concentrations in automotive engine manufacturing. *J Occup Environ Hyg.* 6, 19-31.

Hervé-Bazin, B., 2007. *Les nanoparticules un enjeu majeur pour la santé au travail?* EDP Sciences, France, 701 pp.

Hinds, W.C., 1999. *Aerosol Technology, Properties, Behavior and Measurement of airborne particles.* John Wiley & sons inc., New York, 483 pp.

Jacobsen, N.R., Moller, P., Jensen, K.A., Vogel, U., Ladefoged, O., Loft, S., & Wallin, H., 2009. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Part Fibre Toxicol.* 6, 2.

Janssen, Y.M., Marsh, J.P., Driscoll, K.E., Borm, P.J., Oberdörster, G., Mossman, B.T., 1994. Increased expression of manganese-containing superoxide dismutase in rat lungs after inhalation of inflammatory and fibrogenic minerals. *Free Radic Biol Med.* 16, 315-322.

Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V., 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol.* 6, 33.

Kaewamatawong, T., Shimada, A., Okajima, M., Inoue, H., Morita, T., Inoue, K., and Takano, H., 2006. Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol Pathol.* 34, 958-965.

Kanapilly, G.M., Wolff, R.K., DeNee, P.b., and McClellan, R.O. 1982. Generation, characterization and inhalation deposition of ultrafine aggregate aerosols. *Ann. Occup. Hyg.* 26, 77-91.

Kobayashi, N., Naya, M., Endoh, S., Maru, J., Yamamoto, K., and Nakanishi, J., 2009. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology*. 264, 110-118.

Koike, E., and Kobayashi, T., 2006. Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere*. 65, 946-951.

Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G., and Ziesenis, A., 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A*. 65, 1513-1530.

Kreyling, W.G., Semmler, M., and Moller, W., 2004. Dosimetry and toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med*. 17, 140-152.

Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., and Moller, W., 2006. Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *J Aerosol Med*. 19, 74-83.

Lee, J.H., Kwon, M., Ji, J.H., Kang, C.S., Ahn, K.H., Han, J.H. and Yu, I.J. 2011. Exposure assessment of workplaces manufacturing nanosized TiO₂ and silver. *Inhal Toxicol.* 23, 226-236.

Leppänen, M., Korpi, A., Miettinen, M., Leskinen, J., Torvela, T., Rossi, E.M., Vanhala, E., Wolff, H., Alenius, H., Kosma, V.M., Joutsensaari, J., Jokiniemi, J., Pasanen, P., 2011. Nanosized TiO₂ caused minor airflow limitation in the murine airways. *Arch Toxicol.* 85, 827-839.

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., and Nel, A., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 111, 455-460.

Li, J.J., Muralikrishnan, S., Ng, C.T., Yung, L.Y., and Bay, B.H., 2010. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med (Maywood.)* 235, 1025-1033.

Ma-Hock, L., Gamer, A.O., Landsiedel, R., Leibold, E., Frechen, T., Sens, B., Linsenbuehler, M., and van, R.B., 2007. Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials. *Inhal Toxicol.* 19, 833-848.

Ma-Hock, L., Burkhardt, S., Strauss, V., Gamer, A.O., Wiench, K., van, R.B., and Landsiedel, R., 2009. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol.* 21, 102-118.

Maier, M., Hannebauer, B., Holldorff, H., and Albers, P., 2006. Does lung surfactant promote disaggregation of nanostructured titanium dioxide? *J Occup Environ Med.* 48, 1314-1320.

Mansour, H.M., Rhee, Y.S., & Wu, X., 2009. Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int J Nanomedicine.* 4, 299-319.

Maynard, A., 2002. Experimental determination of ultrafine TiO₂ deagglomeration in a surrogate pulmonary surfactant: preliminary results. *Ann Occup Hyg.* 46, suppl. 1, 197-202.

Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B., & Donaldson, K., 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine

particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med.* 64, 609-615.

Morrow, P.E., 1988. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol.* 10, 369-384.

Moss, O.R., and Wong, V.A., 2006. When nanoparticles get in the way: impact of projected area on in vivo and in vitro macrophage function. *Inhal Toxicol.* 18, 711-716.

Muhlfeld, C., Mayhew, T.M., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B., 2007a. A novel quantitative method for analyzing the distributions of nanoparticles between different tissue and intracellular compartments. *J Aerosol Med.* 20, 395-407.

Muhlfeld, C., Geiser, M., Kapp, N., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B., 2007b. Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the "relative deposition index": Evidence for clearance through microvasculature. *Part Fibre Toxicol.* 4, 7.

Muhlfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., Vanhecke, D., Blank, F., Gehr, P., and Ochs, M., 2007c. Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy. *Part Fibre Toxicol.* 4, 11.

Muhlfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Vanhecke, D., Ochs, M., and Gehr, P., 2008. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294, L817-L829.

Murr, L.E., Esquivel, E.V., and Bang, J.J., 2004. Characterization of nanostructure phenomena in airborne particulate aggregates and their potential for respiratory health effects. *J Mater Sci Mater Med.* 15, 237-247.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). 2011. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention: "Occupational Exposure to Titanium Dioxide." DHHS (NIOSH) Publication No. 2011-160. *Current intelligence bulletin* 63.

<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf>

Nel, A.E., Diaz-Sanchez, D., and Li, N., 2001. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma : evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 7 20-26.

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

Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Vermeylen, J., and Nemery, B., 2003. Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 186, 38-45.

Nurkiewicz, T.R., Porter, D.W., Hubbs, A.F., Cumpston, J.L., Chen, B.T., Frazer, D.G., & Castranova, V., 2008. Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Part Fibre Toxicol*. 5, 1.

Oberdörster, G., 1988. Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *J Aerosol Med*. 1, 289-329.

Oberdörster, G., Ferin, J., Gelein, R., Soderholm, S.C., and Finkelstein, J., 1992. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 97, 193-199.

Oberdörster, G., Ferin, J., and Lehnert, B.E., 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 5, 173-179.

Oberdörster, G., Cox, C., and Gelein, R., 1997. Intratracheal instillation versus intratracheal-inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. *Exp Lung Res.* 23, 17-34.

Oberdörster, G., 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health.* 74, 1-8.

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

Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D.B., &

Yang, H., 2005b. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part Fibre Toxicol. 2, 8.

Pauluhn, J., and Mohr, U., 2000. Inhalation studies in laboratory animals--current concepts and alternatives. Toxicol Pathol. 28, 734-753.

Pauluhn, J., 2005. Overview of inhalation exposure techniques: strengths and weaknesses. Exp Toxicol Pathol. 57 Suppl 1, 111-128.

Pauluhn, J., 2009. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. Toxicol Sci. 109, 152-167.

Pauluhn, J., 2011. Poorly soluble particulates: searching for a unifying denominator of nanoparticles and fine particles for DNEL estimation. Toxicology. 279, 176-188.

Pratten, M.K. and Lloyd, J.B. 1986. Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured *in vitro*. Biochim. Biophys. Acta 881, 307-313.

Rabinovitch, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology*. 5, 85-87.

Renwick, L.C., Brown, D., Clouter, A., Donaldson, K., 2004. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med*. 61, 442-447.

Rossi, E.M., Pylkkänen, L., Koivisto, A.J., Vippola, M., Jensen, K.A., Miettinen, M., Sirola, K., Nykäsenoja, H., Karisola, P., Stjernvall, T., Vanhala, E., Kiilunen, M., Pasanen, P., Mäkinen, M., Hämeri, K., Joutsensaari, J., Tuomi, T., Jokiniemi, J., Wolff, H., Savolainen, K., Matikainen, S., Alenius, H., 2010. Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci*. 113, 422-433.

Sager, T.M., Komminenim C., & Castranova, V., 2008. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol*. 5, 17.

Schmid, O., Moller, W., Semmler-Behnke, M., Ferron, G.A., Karg, E., Lipka, J., Schulz, H., Kreyling, W.G., and Stoeger, T., 2009. Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers*. 14 Suppl 1, 67-73.

Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., Fertsch, S., Wenk, A., Seitz, J., Mayer, P., Oberdörster, G., and Kreyling, W.G., 2007. Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect*. 115, 728-733.

Semmler, M., Seitz, J., Erbe, F., Mayer, P., Heyder, J., Oberdörster, G., and Kreyling, W.G., 2004. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol*. 16, 453-459.

Shimada, M., Wang, W.N., Okuyama, K., Myojo, T., Oyabu, T., Morimoto, Y., Tanaka, I., Endoh, S., Uchida, K., Ehara, K., Sakurai, H., Yamamoto, K., and Nakanishi, J., 2009. Development and evaluation of an aerosol generation and supplying system for inhalation experiments of manufactured nanoparticles. *Environ Sci Technol*. 43, 5529-5534.

Simeonova, P.P., Opopol, N., Luster, M.I., 2007. *Nanotechnology – Toxicological issues and environmental safety*. Springer Netherlands, 276 pp.

Skebo, J.E., Grabinski, C.M., Schrand, A.M., Schlager, J.J., and Hussain, S.M., 2007. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. *Int J Toxicol.* 26, 135-141.

Song, Y., Li, X., & Du, X., 2009. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J.* 34, 559-567.

Soto, K., Garza, K.M., and Murr, L.E., 2007. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater.* 3, 351-358.

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

Stone, V., Johnston, H., and Clift, M.J., 2007. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience*, 6: 331-340.

Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., and Heyder, J., 2001. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect.* 109 Suppl 4, 547-551.

Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W.G., Lentner, B., Moller, W., Behnke-Semmler, M., Jennen, L., Walch, A., Michalke, B., Schramel, P., Heyder, J., and Schulz, H., 2006. Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol.* 18, 733-740.

Tetley, T.D., 2007. Health effects of nanomaterials. *Biochem Soc Trans.* 35, 527-531.

Van, R.B., Landsiedel, R., Fabian, E., Burkhardt, S., Strauss, V., and Ma-Hock, L., 2009. Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO(2), pigmentary TiO(2) and quartz. *Toxicol Lett.* 186, 152-159.

Warheit, D.B., Brock, W.J., Lee, K.P., Webb, T.R., and Reed, K.L., 2005. Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci.* 88, 514-524.

Warheit, D.B., Webb, T.R., Sayes, C.M., Colvin, V.L., and Reed, K.L., 2006. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci.* 91, 227-236.

Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L., and Sayes, C.M., 2007a. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett.* 171, 99-110.

Warheit, D.B., Webb, T.R., Colvin, V.L., Reed, K.L., and Sayes, C.M., 2007b. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci.* 95, 270-280.

Warheit, D.B., Webb, T.R., Reed, K.L., Frerichs, S., and Sayes, C.M., 2007c. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology.* 230, 90-104.

Warheit, D.B., 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci.* 101, 183-185.

Warheit, D.B., 2010. Assessing health risks of inhaled nanomaterials: development of pulmonary bioassay hazard studies. *Anal Bioanal Chem.* 398, 607-612.

Wittmaack, K., 2007. In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area, or what? *Environ Health Perspect.* 115, 187-194.

Xia, T., Kovoichich, M., and Nel, A., 2006a. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in mediating particulate matter injury. *Clinics in Occupational and Environmental Medicine.* 5, 817-836.

Xia, T., Kovoichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, I.J., Wiesner, R.M., Nel, E.A., 2006b. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters.* 6, 1794-1807.

Yang, W., Peters, J.I., and Williams, R.O., 2008. Inhaled nanoparticles--a current review. *Int J Pharm.* 356, 239-247.

Table 1Bulk powder NP characterization of 5 nm TiO₂

Parameters	Methods	Results
Substance	TEM and EDS	Titanium dioxide
Crystal phase	XRD	Anatase (> 90%) rutile (< 10%)
Morphology	TEM	Spherical (> 90%) and rod-shape (< 10%)

TEM: transmission electron microscopy; EDS: X-ray spectrometric analysis; XRD: X-ray diffraction.

Table 2

Measurements and characterization of the nano-aerosols

Parameters	Experimental groups					
	Control 1	Control 2	2 mg/m ³ SA ^a	2 mg/m ³ LA ^b	7 mg/m ³ SA	7 mg/m ³ LA
Average mass concentration ^c	0.008	0.004	2.02	1.96	7.12	7.15
Min and max ^d (mg/m ³)	0.002 and 0.048	0.004 and 0.005	1.50 and 2.74	1.77 and 3.34	5.79 and 8.97	6.35 and 8.92
Total particle number ^e (/cm ³)	-	-	1,187,491	161,898	7,644,322	19,573
D ₂₅ ^{e,f} (nm)	-	-	17	108	17	81
NMAD or D ₅₀ ^{e,f} (nm)	-	-	30	185	31	194
D ₇₅ ^{e,f} (nm)	-	-	61	284	49	470
Fraction of NP agglomerates < 100 nm ^e (%)	-	-	85.6	22.3	90.9	35.3

^a Nano-aerosol composed of small agglomerates.

^b Nano-aerosol composed of large agglomerates.

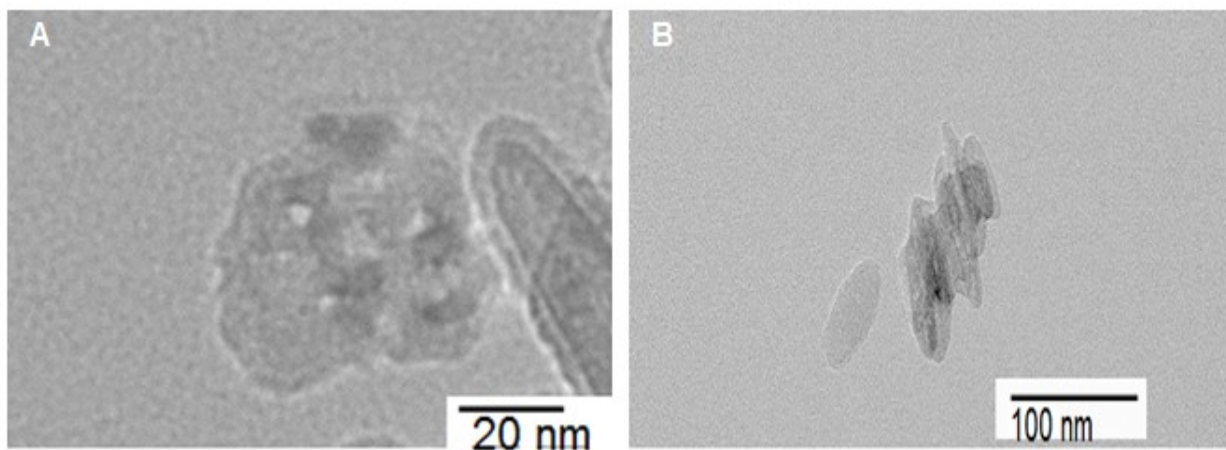
^c Average mass concentration determined by weight measurements.

^d Min and max concentration determined by a DustTrak.

^e Measurements made with the ELPI.

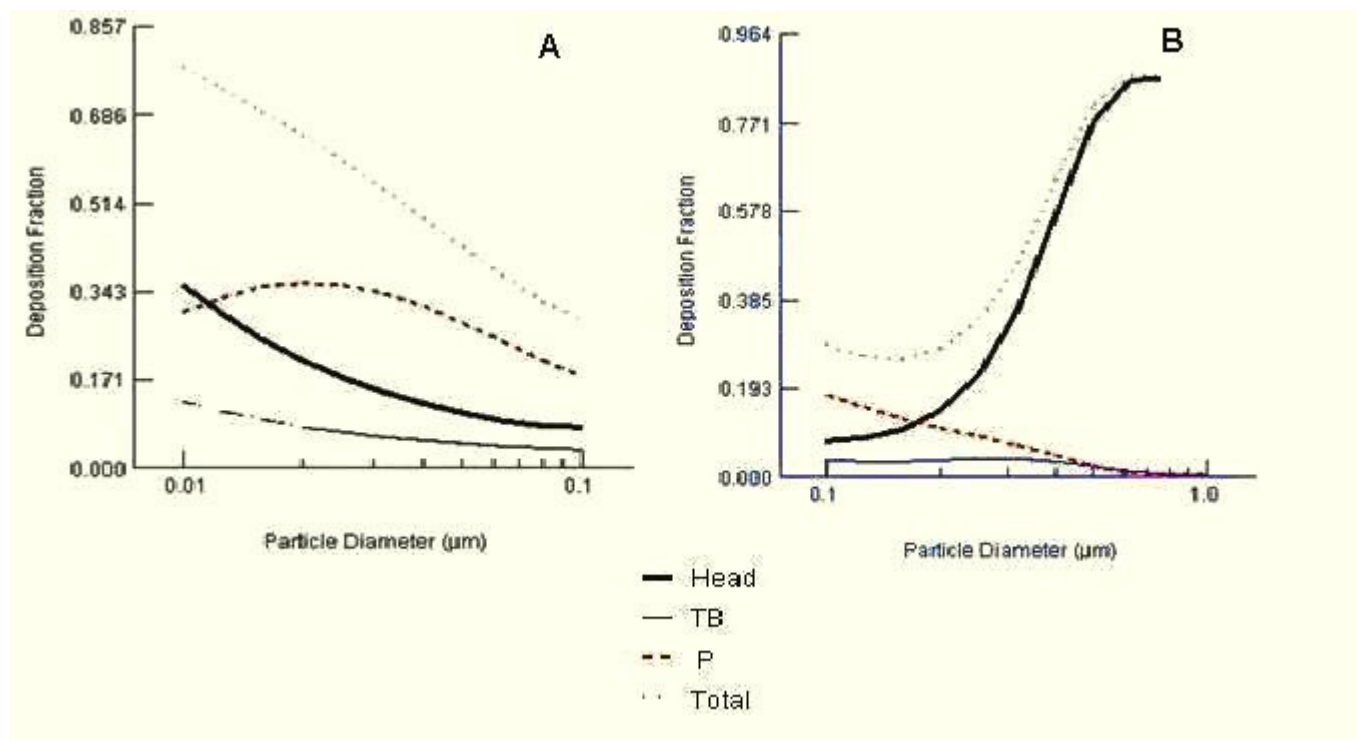
^f Aerodynamic diameters for which 25% (D₂₅), 50% (D₅₀ or NMAD) or 75% (D₇₅) of the particles in the aerosol are smaller than this value. D₇₅ – D₂₅ is the interquartile range and represents the size distribution where we find 50% of the particles.

Figure 1. TEM characterization of the bulk nano-TiO₂ powder



TEM images show the morphology of **A)** Spherically shaped nanoparticles (> 90 % in volume) and **B)** Rod shaped nanoparticle (< 10 % in volume).

Figure 2. Computed fractional deposition of NP agglomerates in the rat respiratory tract



A) Estimated deposition fraction for the nano-aerosols composed of small agglomerates for concentrations of 2 and 7 mg/m³ modeled for multiple diameters ranging from 10 to 100 nm. **B)** Estimated deposition fraction for the nano-aerosols composed of large agglomerates at 2 and 7 mg/m³ modeled for multiple diameters ranging from 100 to 1000 nm. **TB** = tracheobronchial; **P** = pulmonary. Functional residual capacity (FRC) volume 4 mL; head volume: 0.42 mL; nasal breathing route; tidal volume 2.1 mL; breathing frequency 110/min and inspiratory fraction 0.1.

Figure 3. Percentage of different leukocytes from BAL

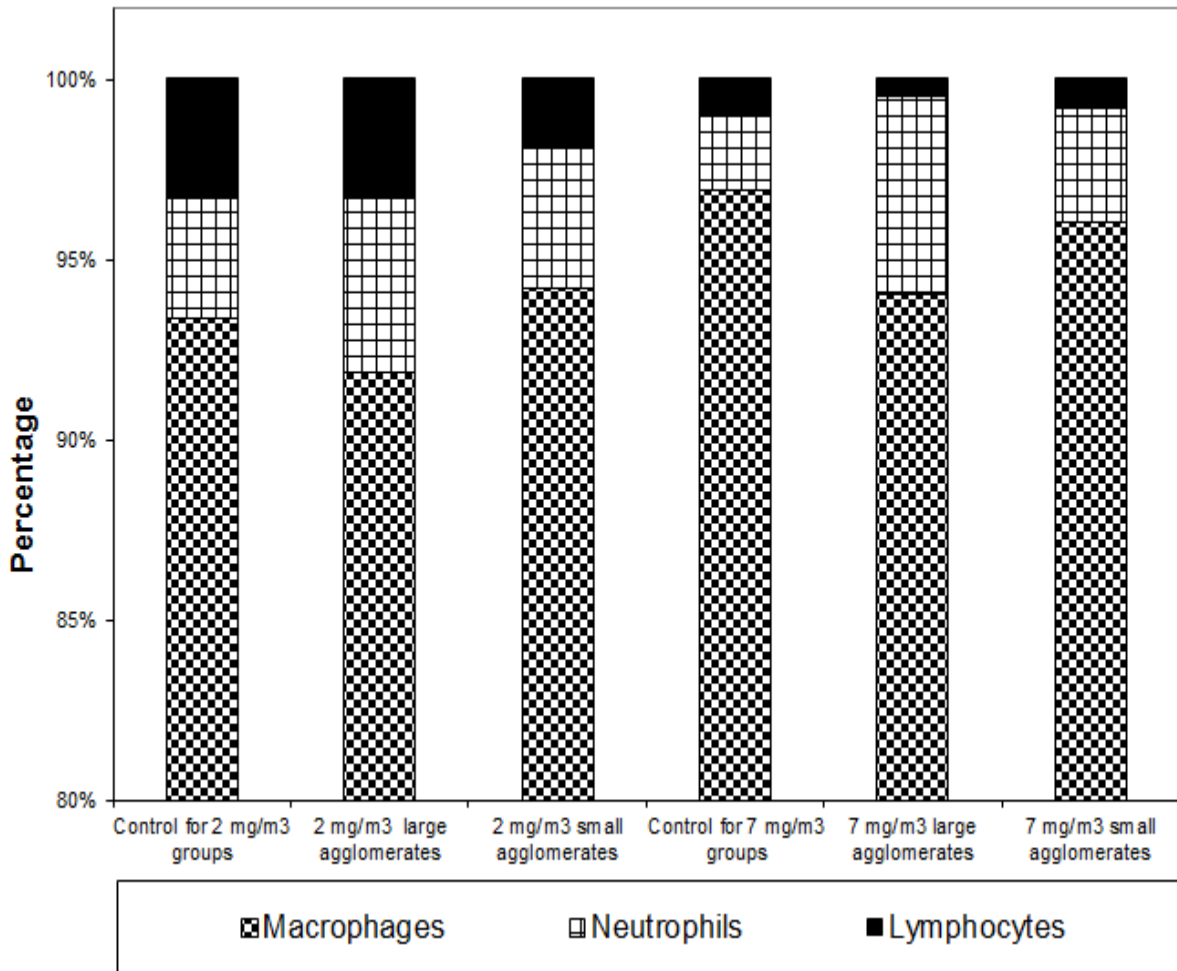
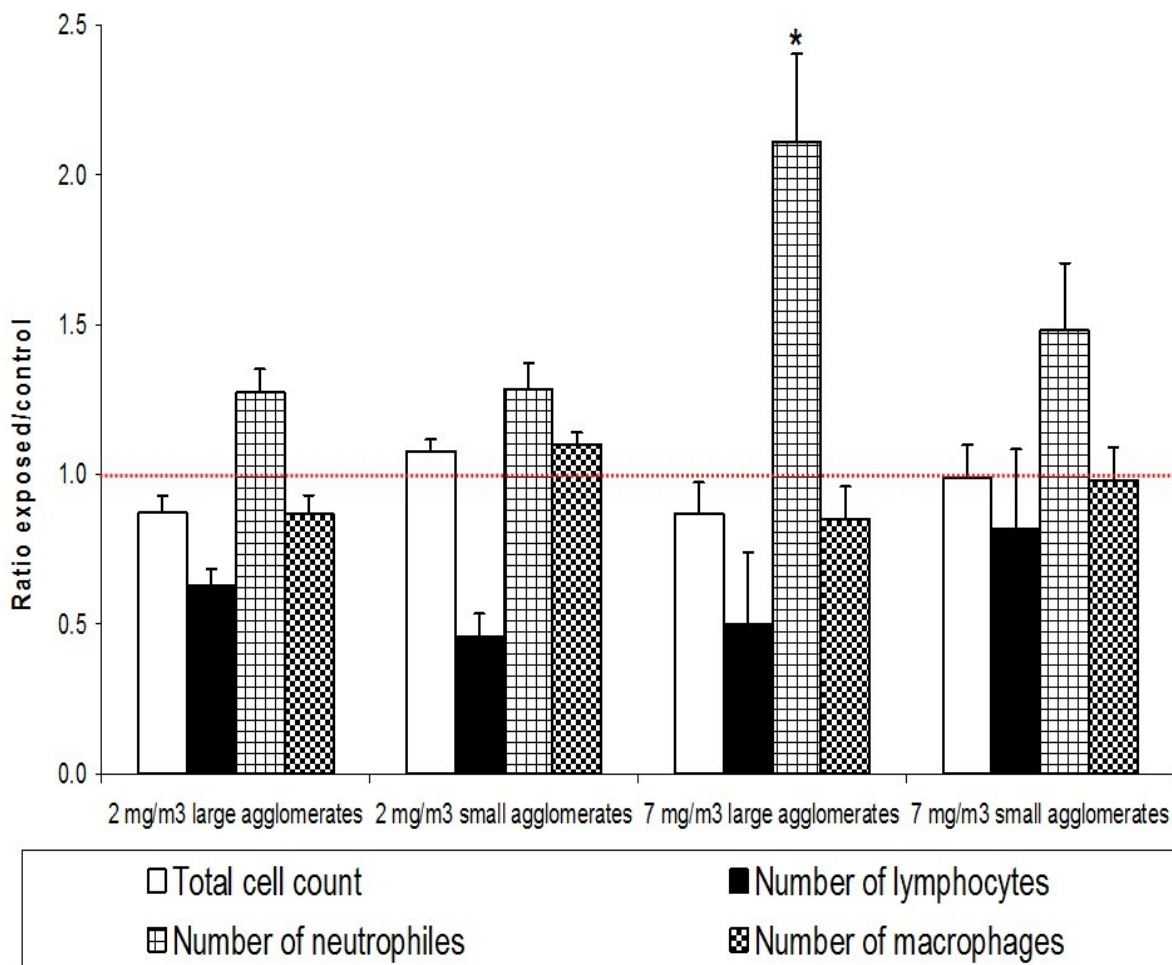


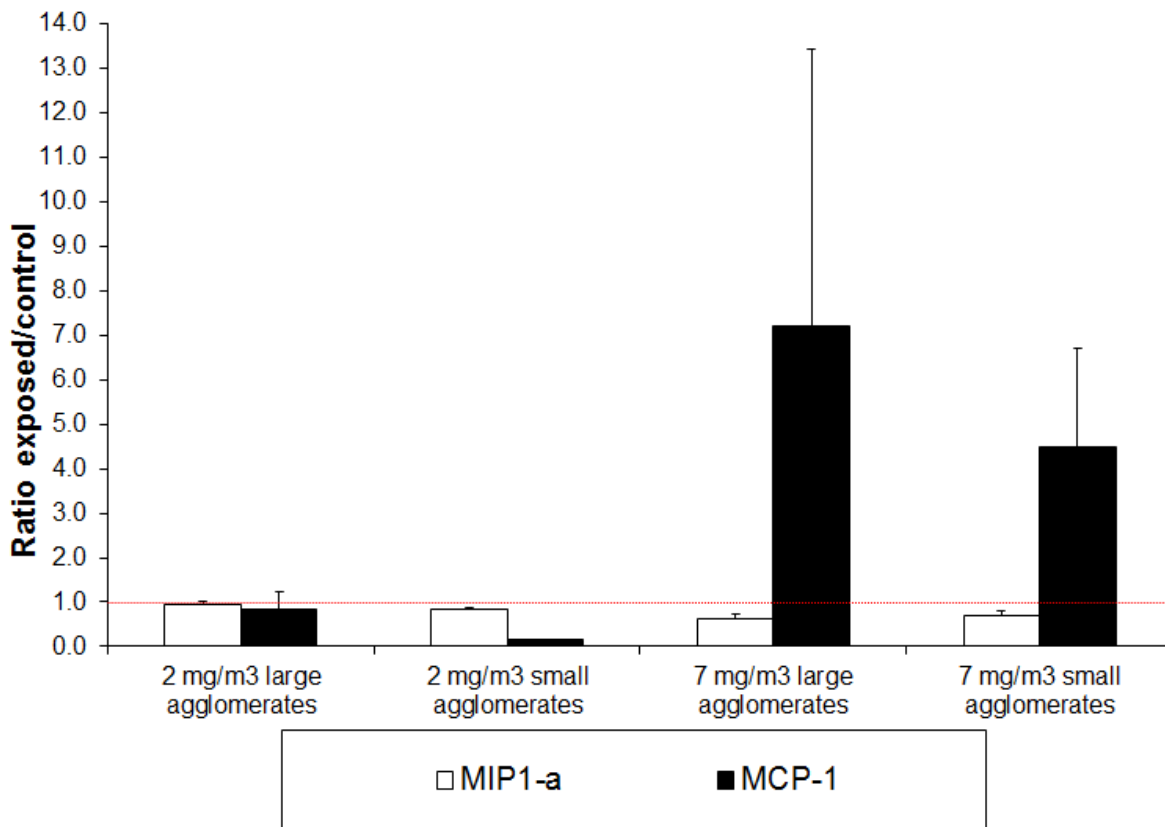
Figure 4. BALF cytology analyzed by the cytopsin method.



Data were expressed as fold increases of exposed groups compared to controls. Bars represent the mean value and the standard error on the mean obtained for 6 rats in each exposure group.

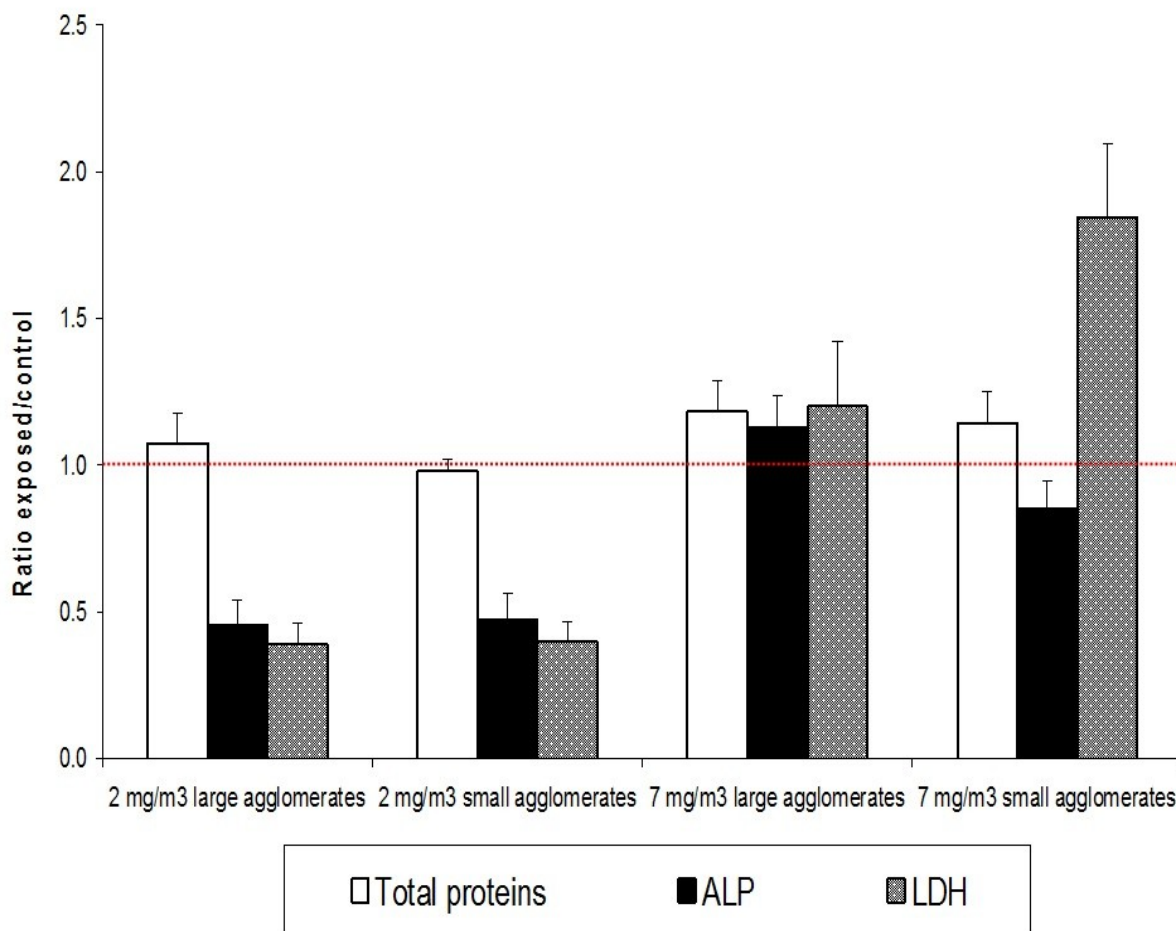
* Groups that are statistically different from controls $p < 0.05$.

Figure 5. Macrophage inflammation markers



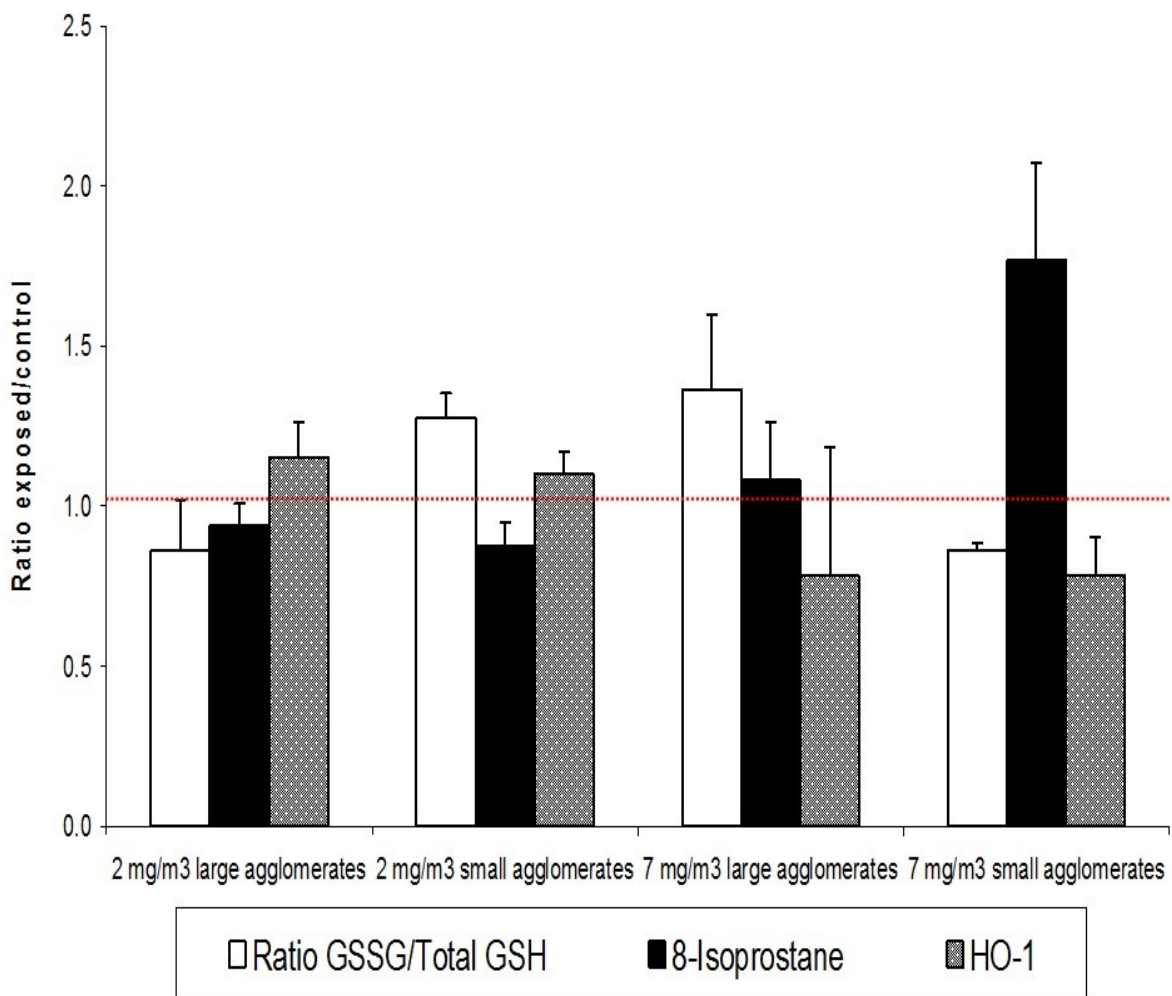
Data are expressed as fold increases of exposed groups as compared to the controls. Bars represent the mean value and the standard error on the mean obtained for 6 rats in each exposure group.

Figure 6. BALF cytotoxicity markers



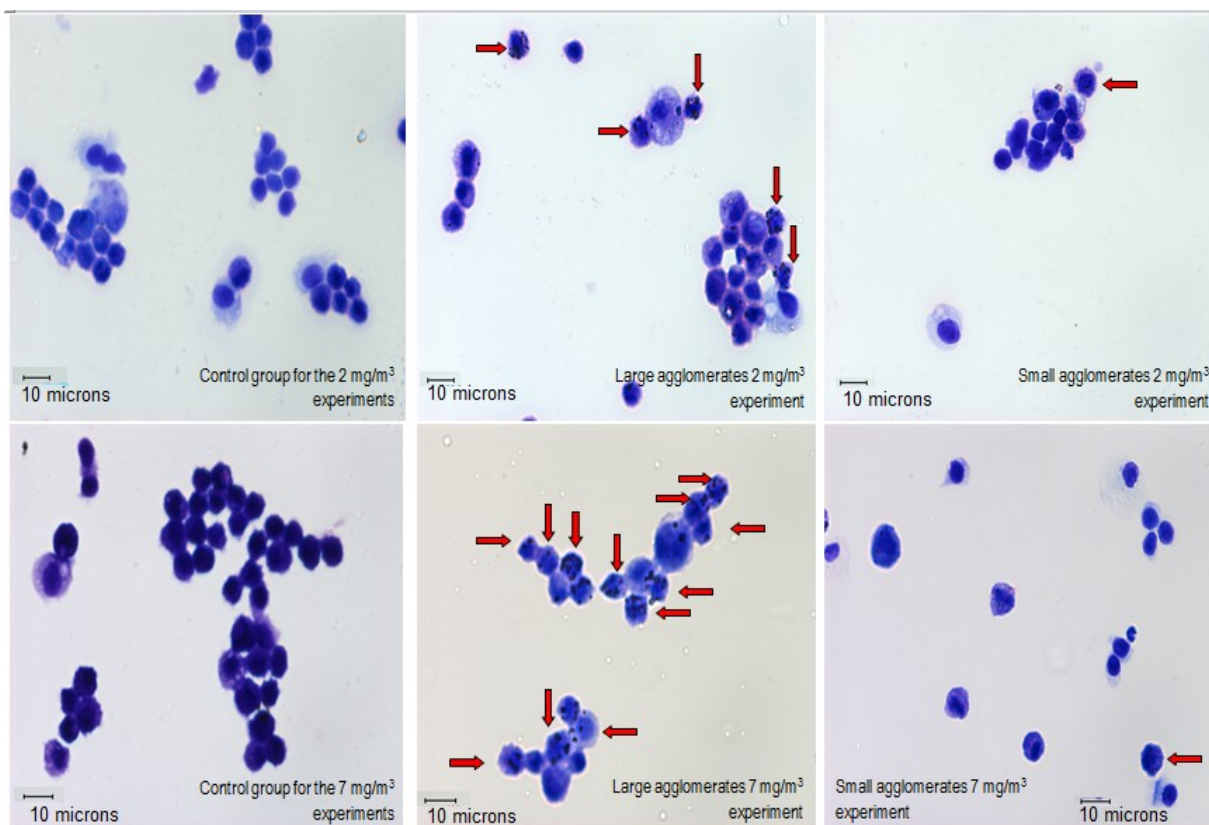
Data are expressed as fold increases of exposed groups compared to the controls. Bars represent the mean value and the standard error on the mean obtained for 6 rats in each exposure group.

Figure 7. BALF oxidative stress markers



Data are expressed as fold increases of exposed groups compared to the controls. Bars represent the mean value and the standard error on the mean obtained for 6 rats in each exposure group.

Figure 8. Cell morphology from BALF cytopreparations of rats



Optical microscopy (magnification 60 X) of cells cytopreparation collected in BALF of controls and exposed rats. For all nTiO₂ exposed groups, the images demonstrate the distribution of macrophages containing phagocytized nTiO₂ (arrows).

Chapitre 4 - Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO₂: effect of primary particle size and agglomeration state

Article submitted to Particle and Fibre Toxicology.

Authors: Noël Alexandra¹, Charbonneau Michel², Cloutier Yves³, Tardif Robert¹ and Truchon Ginette³.

¹ Département de santé environnementale et de santé au travail, Institut de recherche en santé publique, Université de Montréal. ² INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Quebec, Canada. ³ Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST).

4.1 Abstract

The exact role of primary nanoparticle (NP) size and their degree of agglomeration in aerosols on the determination of pulmonary effects is still poorly understood. Smaller NP are thought to have greater biological reactivity, but their level of agglomeration in an aerosol may also have an impact on pulmonary response. The aim of this study was to investigate the role of primary NP size and the agglomeration state in aerosols, using well-characterized TiO₂ NP, on their relative pulmonary toxicity, through inflammatory, cytotoxic and oxidative stress effects in Fisher 344 male rats (n = 6 per groups). Three different sizes of TiO₂ NP, i.e., 5, 10-30 or 50 nm, were inhaled as small (SA) (< 100 nm) or large agglomerates (LA) (> 100 nm) at 20 mg/m³ for 6 hours. Bronchoalveolar lavage fluids (BALF) showed that LA aerosols induced an acute inflammatory response, characterized by a significant increase in the number of neutrophils, while SA aerosols produced significant oxidative stress damages and cytotoxicity. Data also demonstrate that for an agglomeration state smaller than 100 nm, the 5 nm particles caused a significant increase in cytotoxic effects, assessed by an increase in LDH activity, while oxidative damage measured by 8-isoprostane concentration was less when compared to 10-30 and 50 nm particles. In both SA and LA aerosols, the 10-30 nm TiO₂ NP size induced the most pronounced pro-inflammatory effects. Overall, this study showed that initial NP size and agglomeration state are key determinants of nano-TiO₂ lung inflammatory reaction, cytotoxic and oxidative stress induced effects.

Keywords: TiO₂ nanoparticles; Inhalation; Agglomeration state; Primary particle size; Inflammation; Cytotoxicity; Oxidative stress.

4.2 Introduction

In recent decades, nanoparticles (NP) (< 100 nm) have attracted the increased attention of the industrial sector due to their unique physico-chemical properties and numerous applications. Indeed, compared to their larger-sized counterparts, NP have improved and distinctive surface characteristics which are considered as the building blocks of nanotechnology. This fast developing field is expected to generate by 2014 more than 10 million jobs related to this technology (Lux Research, 2004). Thus, an increasing number of workers are going to be handling NP during the production and disposal of several consumer products (McIntyre 2012). Reliable testing strategies to investigate possible health effects caused by NP exposure are therefore urgently needed. Risk assessment is based on exposure expressed in terms of dosimetry and toxicological data (Donaldson and Seaton 2012). Hence, research studies should examine the characteristics of NP or nano-aerosols that determine their ability to cause deleterious effects. Currently, the best metric, such as mass, surface area, number or size distribution, to measure NP in order to evaluate risk and prevent the development of occupational diseases is still a matter of debate (Donaldson and Seaton 2012).

Several toxicological studies have addressed the micro versus the nano size effect. This has indicated at equivalent mass concentration that agglomerated NP produce greater pulmonary inflammation responses than micron size particles (Oberdörster *et al.* 1992, 1994; Brown *et al.* 2001; Renwick *et al.* 2004; Duffin *et al.* 2007). However, few studies have investigated *in vivo* the size-dependent effects of NP (Grassian *et al.* 2007b, Kobayashi *et al.* 2009; Pauluhn 2009). As NP (< 100 nm) size decreases, it is expected that the percentage of atoms and active sites at the surface, as well as the structural imperfections, increase significantly (Oberdörster *et al.*

2005b; Nel *et al.* 2006). In addition, it has previously been shown that metal oxide particles less than 30 nm in size, had enhanced interfacial reactivity (Auffan *et al.* 2009; Liang *et al.* 2009). Correspondingly, the biological reactivity of smaller NP is expected to be higher than that of larger NP (Liu *et al.* 2010). Moreover, it is at approximately 20 nm that the highest relative deposition efficiency of NP in the alveolar region occurs (Oberdörster *et al.* 2005a; Landsiedel *et al.* 2012). This suggests that NP of different initial sizes could produce different biological responses (Grassian *et al.* 2007a; Liu *et al.* 2010).

TiO₂ is a substance that is manufactured at a large scale, either as crude, fine or ultrafine powder. Given its important industrial production, several countries use TiO₂ as a reference nanomaterial in research and in the assessment of workplace exposures (U.S. EPA 2009; OECD 2010; Boutou-Kempf *et al.* 2011; NIOSH 2011). However, to this day there is still limited consistent toxicological data and similarly limited epidemiological studies related to occupational exposures to this chemical (Fryzek *et al.* 2003; Hext *et al.* 2005; Hsu and Chein 2007; Demou *et al.* 2009; Curwin and Bertke 2011; Lee *et al.* 2011). This puts the emphasis on the need for more research on TiO₂ NP.

Our research group and other researchers have previously reported that agglomeration is a process occurring during nano-TiO₂ aerosol production (Bermudez *et al.* 2004; Grassian *et al.* 2007a and b; Ma-Hock *et al.* 2007 and 2009; Noël *et al.* 2013a and b). Using different methods to generate nano-aerosols in laboratory studies, we have shown that a given TiO₂ NP can agglomerate in different sizes and structures (Noël *et al.* 2013a). This observation is relevant and

valuable for toxicological assessment since there is increasing evidence that nano-aerosol characteristics can modulate NP interaction with biological systems (Grassian *et al.* 2007b; Warheit *et al.* 2007; Zook *et al.* 2011; Kreyling *et al.* 2012; Landsiedel *et al.* 2012). Indeed, agglomeration of NP has multiple influences on dose characteristics and on their pulmonary toxicity and kinetics. It can affect: the number concentration in the aerosol; the deposition site in the respiratory tract; the possibility of detection and subsequent phagocytosis by alveolar macrophages; the fate in lung tissue and translocation to other extra-pulmonary compartments; and the size, density, shape and structure of the resulting particle, being either loose or compact. Furthermore, once deposited in the respiratory tract, NP can interact with biological material (e.g., pulmonary surfactant, macromolecules and proteins), which can also have an impact by increasing, slowing or preventing the degree of agglomeration in the physiological environment (Warheit *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2008; Zook *et al.* 2011). Taken together, it is highly relevant to characterize and consider the agglomeration state of NP, particularly metal oxides, in nanotoxicological studies.

We have previously reported that rats exposed by inhalation to small agglomerates (< 100 nm) of 5 nm TiO₂ showed greater cytotoxic and oxidative stress responses than rats exposed to larger agglomerates (> 100 nm) of the same NP, which induced a slight inflammatory reaction (Noël *et al.* 2012). This suggested that biological responses to TiO₂ might depend on the dimension and concentration of the NP agglomerates. These results are in line with the current hypothetical mechanisms of NP pulmonary toxicity, based on the inflammation and oxidative stress paradigm (Donaldson *et al.* 2001; Oberdörster *et al.* 2005a; Xia *et al.* 2006; Scherbart *et al.* 2011).

In inhalation studies, establishing the effect of primary NP size involves considering the size of the agglomerates, and only a few studies have addressed this issue. In a study by Pauluhn (2009), rats exposed to aluminum oxide nano-aerosols showed a clearance half-time which increases as the NP size decreases, while the inflammatory response appeared to be determined by the size of the agglomerates. In a study conducted by Grassian *et al.* (2007b), mice exposed to 7 mg/m³ of 5 nm TiO₂ NP (120 nm in aerosol) or 21 nm NP (139 nm in aerosol) showed that the latter was slightly, but significantly more toxic than the smaller NP. These authors suggested that the difference in the structure of the agglomerates, which was compact for the 5 nm TiO₂ versus loose for the 21 nm particles, could be partly responsible for the results. Collectively, these two inhalation nanotoxicology studies suggest that smaller initial NP size might not always induce enhanced lung inflammatory reactions when compared to larger nanometric counterparts.

The exact role of primary NP size and their degree of agglomeration in aerosols in the determination of pulmonary effects is still poorly understood. Indeed, smaller NP are thought to have greater biological reactivity, but the level to which these NP agglomerate in aerosols may also have an impact on the pulmonary response. Moreover, NP of different primary sizes could possibly bundle in agglomerates of various dimensions, shapes and structures in aerosols, which can also influence their pulmonary toxicity and kinetics. Thus, the primary particle size and agglomeration state of NP can be of significance in toxicity and partly responsible for the distinct effects induced in lungs. To our knowledge, no previous study has addressed both factors simultaneously, i.e., the size-dependent effect of NP while also comparing the influence of the

agglomeration state. Elucidating the impact of these factors on the mechanism of toxicity will provide important knowledge for NP risk assessment.

The aim of this study was to investigate the role of primary NP size and agglomeration state in aerosols using well-characterized TiO₂ NP and to compare their relative acute pulmonary toxicity, through inflammatory, cytotoxic and oxidative stress effects in rats. For this purpose, we used three different sizes of TiO₂ NP, i.e., 5, 10-30 or 50 nm inhaled as small (< 100 nm) or large agglomerates (> 100 nm) at a concentration of 20 mg/m³.

4.3 Materials and methods

General experimental study design

Animal inhalation exposures were performed in a cubic stainless steel 500-L inhalation chamber (Unifab, Kalamazoo, MI) adapted for nose-only. Six groups of rats (n = 6) were exposed to TiO₂ nano-aerosols for 6 hours; one control group (n = 6) was exposed to clean air. The nano-aerosols were composed of either 5, 10-30 or 50 nm primary particle size TiO₂. Each primary particle size of TiO₂ was generated in aerosols with two distinct size distributions consisting of large (> 100 nm) or small agglomerates (< 100 nm) at mass concentrations of 20 mg/m³. Small agglomerate (SA) nano-aerosols were produced by a wet generation method and large agglomerate (LA) nano-aerosols by a dry powder dispersion technique. The animals were sacrificed 16 hours after the end of the exposure period, and bronchoalveolar lavages (BAL) were performed to determine cellular markers of pulmonary toxicity. Lungs were also fixed for histopathology observations.

TiO₂ nanoparticles

Anatase TiO₂ with average particle sizes of 5 nm (Stock# 5420MR) and 10-30 nm (Stock# 5420HT), specific area of 200-220 m²/g and near spherical morphologies were purchased from Nanostructured and Amorphous Materials Inc. (Texas, USA). Anatase 50 nm TiO₂ (MK-TiO₂-A050) was purchased from MKnano (Ontario, Canada). All the NP were stored in a desiccator placed in a fume hood for one month prior to use. These NP were characterized by transmission electron microscopy (TEM) (field emission gun (FEG) JEOL JEM-2100F), X-ray spectrometric

analysis (EDS) and X-ray diffraction (XRD) (Philips, model: X'Pert, Lelyweg, The Netherlands). These characterization methods were previously described in Noël *et al.* 2013a.

Animals

Forty-eight 8-week-old male CDF (F344)/CrIBR (Charles River Breeding Laboratories, St. Constant, Québec, Canada) rats with an average weight on the day of sacrifice of 164 ± 12 g were housed at the animal care facilities of the Université de Montréal. The rats were placed two per cage and had access to water and food *ad libitum*. The animals were exposed to a 12-h/12-h day/night cycle from 6:00 am to 6:00 pm. The animals were acclimatized to the inhalation chamber for a period of six days prior to NP exposure. Weight gain for each animal was recorded daily. The research project was approved by the Université de Montréal's Ethics Committee on Animal Experiments.

Generation of TiO₂ nano-aerosols

All aerosols were generated using compressed air that first passed through a Donaldson high-efficiency industrial filter equipped with a coalescing filter (Donaldson DFSP, Series Model-DF 0070 ZU, Ultra-Filter Superplus, Donaldson Company, Inc., Norcross, GA, USA). The average temperature and relative humidity in the inhalation chamber were $23.07 \pm 0.72^\circ\text{C}$ and $39.3 \pm 16.6\%$ RH. A fan mixed the air in the inhalation chamber. For all exposures, the total air flow entering the chamber was between 3.6 and 4.5 m³ per hour.

Generation of small agglomerate aerosols – Nebulization of TiO₂ NP

Nano-aerosols composed of small agglomerates were generated using a Lovelace-type nebulizer (In-Tox products, Albuquerque, New Mexico) placed in parallel with two Delavan siphon spray nebulizers (Part number 30609-2 used with an adapter, part number DLN 17147, Delavan Spray Technologies, Goodrich Corporation, Montréal, Canada) (Figure 1). A 7 g/L (for the 5 nm experiment) or a 5 g/L (for the 10-30 nm and 50 nm experiments) NP suspension in distilled water (Milli-Q reference A+ system, water purification system with total oxidizable carbon indicator, Millipore Corporation) was filtered on Whatman 41 filter paper (pores of 20 µm) (Piscataway, NJ, USA) to remove large agglomerates, and sonicated for 10 minutes (Bransonic tabletop ultrasonic cleaner, model 5510, Branson, Danbury, CT, USA). This suspension was poured into the Delavan devices. Since the filtered suspension did not allow the targeted mass concentration to be reached, 2.5 g (for the 5 nm experiment) or 1.5 g (for the 10 – 30 and 50 nm experiments) of the TiO₂ powder was placed in the Lovelace-type nebulizer prior to the addition of the original suspension to completely fill the device. This new suspension was not sonicated. The suspension was agitated for the entire generation period using magnetic stirring plates placed under each nebulizer. The pressure applied to each nebulizer was between 30 and 35 psi. Dual-element heating tapes (624 watts, 120 VAC, Cole-Parmer, Canada) wrapped around a copper tube were used to dry the aerosol, prior to its dispersion in the inhalation chamber.

Generation of large agglomerate aerosols – Powder dispersion of TiO₂ NP

The nano-aerosols composed of large agglomerates were produced using a Fluidized Bed 3400A device (TSI Inc., Shoreview, MN, USA). The exposure concentration for each primary particle

size was achieved by adjusting the various feed rates of the Fluidized Bed. The pressure applied to this instrument was between 33 and 38 psi. No charge neutralization was performed.

TiO₂ aerosol sampling and characterization

TiO₂ nano-aerosols sampling and characterization methods have been described in detail elsewhere (Noël *et al.* 2013a). Briefly, air samples were collected throughout the experiment on cassettes (Sure Seal, SKC Inc.) using 37-mm polyvinyl chloride (PVC) filters at a flow rate of 4 L/min for gravimetric analysis. The mass concentrations were followed and adjusted in real time using a Model 8520 Dust Trak Aerosol Monitor (TSI Inc., Shoreview, MN, USA) previously calibrated with TiO₂ by comparison with the gravimetric method. Air samples were also collected at a flow rate of 1 L/minute on pre-carbon coated Formvar copper grids glued onto 25-mm polycarbonate filters. The glue used was a current cyanoacrylate (Loctite superglue gel, Henkel, Boucherville, Canada). The sampling durations were 2.5 and 5 min for all of the nano-aerosols. Characterization (shape, agglomeration degree and structure) of the nano-aerosols sampled on these grids was performed by TEM (Philips CM200 equipped with a digital camera: Corel Corp. AMTV600 2Kx2K, 80 kV). Numbers and particle size distributions were monitored in real time with an electrical low pressure impactor (ELPI) (Dekati Ltd., Tampere, Finland) which was operated at a flow rate of 10 L/minute in the filter stage configuration. The sintered impaction substrates were oiled to prevent or reduce particle bounce. Cumulative size distributions were acquired through 5 thirty-minute samples collected every hour of the experiment. The ELPI was also used to determine the median aerodynamic diameter based on the number concentration

(NMAD). Air samples were all collected in the area of the inhalation chamber corresponding to the breathing zone of the animals.

Pulmonary deposition modeling

The rats' airway particle dosimetry was estimated using the Multiple-Path Particle Dosimetry Model (MPPD) (software version 2.11, Applied Research Associates Inc., Albuquerque, NM, USA). The respiratory tract deposition of NP agglomerates was estimated for LA and SA nano-aerosols.

Bronchoalveolar lavages

The animals were anaesthetized with isoflurane and sacrificed by exsanguination. BAL fluids (BALF) were collected with 0.9% saline. The BAL techniques were previously described elsewhere (Scarino *et al.* 2009). Briefly, five 5-ml washes were pooled and placed on ice. The collected BALF were centrifuged at 2000 rpm at a temperature of 4°C for 10 minutes. After centrifugation, the supernatant was removed and frozen at -80°C. These supernatants were used for cytotoxicity and oxidative stress analysis. The cells were resuspended in 500 µl of saline. 100-µl aliquots were fixed with formalin for cell count (1:1). The lungs were fixed *in situ* with buffered formalin.

Pulmonary toxicity analysis

Cell suspensions were mixed 1:1 with methylene blue to determine the total cell counts using a hemacytometer. The cytospin cell staining method using Hema 3 solutions (Fisher Diagnostics cat. nos. 122-911A, 122-911B and 122-911C) was used to obtain differential cell counts for lymphocytes, neutrophils and macrophages. Slides were observed using a photonic microscope with a magnification of 400-x (Leica DM 1000). Cytotoxicity was evaluated by determining levels of lactate dehydrogenase (LDH) activity (Cytotoxicity Detection Kit for LDH, Roche Applied Science, Laval, QC, Canada). The oxidative stress response was evaluated by measuring 8-isoprostane concentration (8-isoprostane EIA kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Cytokines in BAL were analyzed using Rat Cytokine Array Panel A (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) to determine the relative levels of 29 cytokines. To perform this assay, samples from the same exposure group were pooled together. Data from this assay were analyzed by chemiluminescent signals of cytokines/chemokines present in the BALF and were detected on Kodak X OMAT-RA film, as described in Ratthe *et al.* (2009) and Gonçalves *et al.* (2011). Results were reported as described in Gonçalves *et al.* (2011). Briefly, cytokines with ≥ 1.2 -fold increased compared to the control group were considered to represent a slight inflammation. All assays were performed as specified by the respective manufacturers.

Estimation of NP endocytosis by macrophages

The cytospin slides were used to visually estimate the extent of NP phagocytosis by counting the first 200 macrophages present in at least 10 fields for the presence or absence of NP agglomerates

inside the cytoplasm. In this way, the percentage of particle-laden macrophages was established. Slides were observed using a photonic microscope (Leica DM 1000).

Lung histopathology

Caudal right lobe lung sections were sliced and embedded in paraffin. Sections were then sliced into thin layers and colored using haematoxylin and eosin staining standard protocol. Images were acquired using an Olympus BX51 optical microscope.

Statistical procedures

BALF cytology, pulmonary cytotoxicity and oxidative stress markers, as well as NP endocytosis by macrophages were analyzed using ANOVA and Tukey's test. Statistical significance was achieved when $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 17.0, SPSS Inc.).

4.4 Results

Characterization of initial bulk NP

The characterization of the three bulk nano-TiO₂ powders used to produce the aerosols and TEM images are presented in Table 1. EDS analysis showed that all powders were made of TiO₂. The size distribution of the NP present in the bulk nano-powders was established by measuring the diameter of over 300 particles by TEM. These results showed that the median diameter of the NP present in the powder labeled by the manufacturer as 5 nm was 10.6 nm, while it was 18.2 nm and 34.8 nm for the 10-30 nm and 50 nm powders, respectively. The analysis also showed that the size distributions of the three nano-powders slightly overlapped (data not shown). In addition, TEM analysis showed that, in the case of the 5 and 50 nm powders, particles had a spherical or rod-shaped morphology, while the 10-30 nm powder, showed only spherical particles. Analysis by XRD revealed that the 5 and 10-30 nm powders were predominantly in the anatase form (> 97%), while the 50 nm powder showed a slightly higher presence of the rutile form (< 20%).

Measurement and characterization of nano-aerosols

Nano-aerosol's characterization data carried out with the ELPI, DustTrak and gravimetric measurements are presented in Table 2. Cumulative size distributions obtained with the ELPI are shown in Figure 2. Three values were used to estimate the number size distributions, namely the first quartile (D₂₅), the midpoint (D₅₀) or NMAD, and the third quartile (D₇₅). These results show that for each TiO₂ NP, the size distributions obtained for SA and LA nano-aerosols are different (Table 2 and Figure 2). The targeted exposure concentration was 20 mg/m³ for all exposed

groups and the concentrations gravimetrically measured were between 18.8 and 22.0 mg/m³. As measured with the ELPI, the total particle number was higher in the aerosols composed of SA compared to the aerosols composed of LA.

Figure 3 shows representative TEM images of particles from the nano-aerosols composed of SA or LA. For the same initial particle size, TEM images (12 000-x) allowed the observation of qualitative differences in the size, shape and structure of the agglomerates present in the nano-aerosols (Figure 3). Indeed, SA aerosols were mostly composed of small compact agglomerates, while LA aerosols had larger agglomerates with void space. Higher magnification (120 000-x) allowed the observation of irregularly shaped small agglomerates (Figure 3).

Pulmonary deposition

Using the polydisperse diameter interquartile ranges presented in Table 2, the estimated respiratory tract deposition fraction of NP agglomerates was computed with the MPPD model for LA and SA nano-aerosols. These results are presented in Figure 4 and indicate that pulmonary deposition is different for the two types of nano-aerosols.

Rat pulmonary toxicity

BALF cytology analysis from rats exposed to SA nano-aerosols showed increases in total cell count, number of macrophages and neutrophils compared to the control group. Increases were

slightly but statistically significant ($p < 0.05$) for total cell count and number of macrophages in the 5 and 10-30 nm groups compared to the controls (Figure 5). Rats exposed to LA nano-aerosols also showed increases in total cell count, number of macrophages and neutrophils compared to the control group. Results were significant ($p < 0.05$) for total cell count, number of macrophages and neutrophils in the 10-30 and 50 nm groups compared to the controls (Figure 5).

The profiles of inflammatory cytokines are shown in Figure 6. Twelve of the 29 cytokines analyzed in the assay showed ≥ 1.2 -fold increases compared to the control group (CCL5, CXCL7, TIMP-1, TNF- α , L-selectin, MIP-1 α , MIP-3 α , IL-1 β , IL-6, CINC-3, CXCL1, sICAM, IFN- γ). Noticeably, the 10-30 nm LA nano-aerosol showed a profile where all of the 12 cytokines were increased compared to the controls.

8-isoprostane, a marker of oxidative stress, showed a statistically significant increase for all SA nano-aerosols compared to the controls or respective LA nano-aerosols (Figure 7). There was also a significant difference between the 5 nm and 10-30 or 50 nm SA aerosols (Figure 7). For LDH activity, the three SA nano-aerosols showed an increase compared to the controls; however, only the results for the 5 nm particles were statistically ($p < 0.05$) different from the controls (Figure 7). There was also a significant ($p < 0.05$) difference between the 5 nm SA and all LA nano-aerosols (Figure 7).

Representative cell morphology of the BALF cytopreparations from the control and exposed rats are shown in Figure 8. The control group showed typical BAL cells. For all nano-TiO₂ exposed groups, the majority of the cells (macrophages, neutrophils and lymphocytes) were also typical, although giant cells (macrophages) and fragmented nucleus macrophages were observed (Figure 8).

Estimation of NP endocytosis by macrophages

Figure 8 shows representative images of BAL macrophages with (arrows) or without phagocytized NP agglomerates. All groups exposed to the LA nano-aerosols had $79 \pm 2\%$ (standard error on the mean, SEM) of macrophages that contained nano-TiO₂ agglomerates, whereas for the SA nano-aerosols, it was $57 \pm 3\%$ (SEM). For each primary NP size, a significant difference was observed for the percentage of particle-laden macrophages between the LA and SA nano-aerosols (data not shown).

Lung histopathology

Figures 9 and 10 show images of haematoxylin and eosin stained lungs. The control group did not show any signs of inflammation. Morphological assessments of lung tissue responses to nano-TiO₂ were different in intensity compared to the controls, except for the 50 nm SA group (Figure 9). The lungs of rats exposed to 5 and 10-30 nm SA nano-aerosols as well as rats exposed to 10-30 and 50 nm LA nano-aerosols showed more leukocyte infiltration compared to the control group (Figure 10). This is consistent with the cytological analysis (Figure 5). Figure 10,

which is representative of all groups, shows TiO₂ NP-laden macrophages in the 5 nm SA nano-aerosol group.

4.5 Discussion

Since TiO₂ NP tends to agglomerate in aerosols (Grassian *et al.* 2007b; Ma-Hock *et al.* 2009; Noël *et al.* 2013a and b), establishing the effect of these NP involves considering the primary particle size and that of the agglomerates (Grassian *et al.* 2007b). The agglomeration state of NP influences the site of particle deposition in the respiratory tract and affects lung clearance mechanisms, including endocytosis (Ferin *et al.* 1992; Oberdörster *et al.* 1997; Hervé-Bazin 2007; Grassian *et al.* 2007a and b; Sager *et al.* 2008; Mühlfeld 2007a and b, 2008; Seipenbusch *et al.* 2008). In general, the size distribution of a nano-aerosol is composed of a less (< 100 nm) and highly (> 100 nm) agglomerated fraction, with the percentage varying from one nano-aerosol to another. The less agglomerated fraction, for which the size of the agglomerates is closer to the size of the primary NP, could possibly induce effects related to their interaction with lung tissue and epithelial cells at the site of pulmonary deposition. These small particles are also more readily available for translocation to the lymph nodes or bloodstream (Oberdörster *et al.* 2005a). Larger agglomerates (> 100 nm) are thought to be more easily detected and removed by the lung macrophages (Kanapilly *et al.* 1982; Pratten and Lloyd 1986; Oberdörster 1988; Yang *et al.* 2008; Noël *et al.* 2012).

In our study, the cellular pulmonary response observed for all exposed groups denoted by the increases in leukocytes from BALF compared to the controls (Figure 5) could be considered as a normal response to immediate and transient external particle aggression (Cho *et al.* 2010). The increase in the number of macrophages and neutrophils is thought to contribute to particle removal. Indeed, previous studies have shown that following inhalation of nano-TiO₂ this type of

response is temporary and resolves rapidly (Bermudez *et al.* 2004; Grassian *et al.* 2007a and b; Ma-Hock *et al.* 2009). Hence, after an acute exposure, this could be a defense mechanism rather than adverse response (Warheit *et al.* 2012).

Effect of the agglomeration state

For the LA nano-aerosols, we observed that the 5 nm TiO₂ produced larger agglomerates than the 10-30 and 50 nm particles (Table 2). This result could be partly explained by the fact that as particle size decreases, the attractive force per unit mass increases, which favors agglomeration (Preining, 1998). Indeed, small particles that coagulate to agglomerates larger than superior-sized counterparts is a common finding previously described in numerous inhalation studies, including ones using nano-TiO₂ (Ferin *et al.* 1992; Bermudez *et al.* 2002 and 2004; Warheit *et al.* 2007; Pauluhn 2009).

As shown in Figure 4, the estimated pulmonary deposition was different for the LA and SA nano-aerosols. Also, given their different agglomeration states (Table 2), it can be assumed, as described by Oberdörster *et al.* (2005a) as well as Geiser and Kreyling (2010), that the penetration of these nano-aerosols into the various regions of the respiratory tract is different. Considering their size distribution characteristics ($D_{25} = 128$ nm to $D_{75} = 783$ nm; Table 2), particles of the LA nano-aerosols could be more easily detected by immune system cells, including alveolar macrophages (Figures 8 and 9). Indeed, the estimation of NP endocytosis showed for all LA nano-aerosols that $79 \pm 2\%$ of macrophages contains nano-TiO₂ agglomerates.

In our study, activation of macrophages following phagocytosis of large NP agglomerates (Figure 8) is supported by a slight but significant increase in the total cell count, and number of macrophages and neutrophils (Figure 5), as well as fold increases in relative levels of pro-inflammatory cytokines (Figure 6) for two out of the three LA nano-aerosols. Interferon γ (IFN- γ), chemokine C-X-C motif ligand 7 (CXCL7), interleukine-6 (IL-6), macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α) and MIP-3 α were increased for the 10-30 nm LA nano-aerosol when compared to the controls. These cytokines are produced by activated macrophages and act in host defense by promoting phagocytosis, resulting in chemotaxis, inflammatory cell recruitment and activation at the site of injury (Cavaillon 1993; Nicola 1994; Goldsby 2000). In particular, MIP-1 α activates granulocytes (neutrophils, eosinophils, basophils) which can lead to acute neutrophilic inflammation (Cavaillon 1993; Nicola 1994; Goldsby 2000). The detection and phagocytosis of these agglomerates by macrophages can favor their clearance from the lungs and prevent their interaction with lung cells and tissue (Ferin *et al.* 1992; Oberdörster *et al.* 2000; Tetley 2007; Noël *et al.* 2012). This is also supported by our results, where no cytotoxicity or oxidative stress effects, evaluated through LDH activity and 8-isoprostane concentration, were observed for these LA nano-aerosols (Figure 7). LDH is a cytoplasmic enzyme that is released by dead cells and is therefore a suitable marker of cell cytotoxicity, while 8-isoprostane is a biomarker of lipid peroxidation and thus an indicator of oxidative stress effects (Beck-Speier *et al.* 2005; Fahmy and Cormier 2009).

An increase in the number of neutrophils supports the presence of an inflammatory reaction (Goldsby *et al.* 2000; Oberdörster *et al.* 2005b; Warheit *et al.* 2006; Ma-Hock *et al.* 2009). Thus, a mild significant inflammatory ($p < 0.05$) response was observed following the 10-30 and 50 nm

LA nano-aerosols exposures. These results are consistent with the common finding of various nanotoxicological studies on the increases in the number of neutrophils following agglomerated nano-TiO₂ exposures (Ferin *et al.* 1992; Grassian *et al.* 2007a and b; Johnston *et al.* 2009; Ma-Hock *et al.* 2009; Rossi *et al.* 2010; Halappanavar *et al.* 2011; Noël *et al.* 2012). Previous studies have also observed that inhalation of agglomerated nano-TiO₂, in mice and rats, caused slight inflammatory responses and long-term pulmonary inflammation (Bermudez *et al.* 2004; Grassian *et al.* 2007a and b; Ma-Hock *et al.* 2009; van Ravenzwaay *et al.* 2009; Halappanavar *et al.* 2011; Lindberg *et al.* 2012; McKinney *et al.* 2012).

For the 5 and 10-30 nm SA nano-aerosols, the cytological analysis showed a statistically significant increase in total cell count and number of macrophages (Figure 5). Qualitatively, these results are consistent with the histopathological findings (Figure 9). The estimation of NP endocytosis showed that all SA nano-aerosols had $57 \pm 3\%$ of a sample of 200 observed macrophages containing nano-TiO₂ agglomerates. Despite the NMAD values that were below 100 nm for these nano-aerosols, the D₇₅ values ranged from 124 to 305 nm. Thus, the agglomerated (> 100 nm) fraction, which was encountered for 29 to 46% of these nano-aerosols could explain the NP endocytosis observed. Nonetheless, for each primary NP size, a significant difference was observed for the percentage of particle-laden macrophages between LA and SA nano-aerosols. Also, increases in the relative levels of CXCL7 and MIP-3 α were observed in all SA nano-aerosols, while for the tissue inhibitor matrix proteinase 1 (TIMP-1), a glycoprotein involved in the degradation of the extracellular matrix, was increased for the 10-30 nm SA nano-aerosol only. Considering the size distributions of the SA nano-aerosols (D₂₅ = 28 nm to D₇₅ = 305 nm; Table 2) and as shown with the estimation of NP endocytosis, it can be assumed that

these nano-aerosols were not as well detected and phagocytized by alveolar macrophages as the LA nano-aerosols. Thus, increased NP interaction with biological materials (lung cells and tissue) may have occurred compared to the LA nano-aerosols and could be expressed as cytotoxicity and oxidative stress effects. In our study, statistically significant increases were observed in LDH activity and 8-isoprostane concentration for the 5 nm SA nano-aerosol compared to the controls and its respective LA nano-aerosol, while only 8-isoprostane was significantly increased for the 10-30 and 50 nm SA nano-aerosols (Figure 7). Therefore, overall, the results for the SA nano-aerosols indicate clear trends of NP interaction with lung cells and tissue through oxidative stress damage and suggestive slight cytotoxic effects (Figure 7).

Overall, these results confirm, at a higher mass concentration, what we had previously shown at 7 mg/m³ (Noël *et al.* 2012), namely that an acute inhalation of nano-TiO₂ with two distinct agglomeration states, smaller or larger than 100 nm, induced different mild pulmonary effects. An acute inflammatory response measured by an increase in the number of neutrophils was induced by exposure to two out of three LA (> 100 nm) nano-aerosols, while significant oxidative stress effects were observed after exposures to all of the SA (< 100 nm) nano-aerosols. With respect to hazard identification, our results indicate that even though LA nano-aerosols induced an acute inflammatory response, which is reversible according to the literature (Ferin *et al.* 1992; Grassian *et al.* 2007a and b; Johnston *et al.* 2009; Ma-Hock *et al.* 2009; Rossi *et al.* 2010), it cannot be concluded that these nano-aerosols induce toxicity through the same mechanisms as SA nano-aerosols, which showed clear oxidative stress damage in BALF.

Effect of primary nanoparticle size

For the three initial TiO₂ NP sizes, we observed only one significant difference within the smaller than 100 nm agglomeration state nano-aerosols. The significant difference was observed between the 5 nm and the two other SA nano-aerosols for the 8-isoprostane concentration (Figure 7). This suggests that the larger 10-30 and 50 nm particles induced more lipid peroxidation and oxidative stress damage than the smaller 5 nm particles. Numerous inhalation studies have previously demonstrated that translocation of various type of NP, including TiO₂, to extrapulmonary compartments occurred for small agglomerated NP (average diameter < 80 nm) in aerosols (Takenaka *et al.* 2001 and 2006; Oberdörster *et al.* 2002 and 2004; Geiser *et al.* 2005 and 2008; Elder *et al.* 2006; Kreyling *et al.* 2009 and 2012). Collectively, these studies indicate that the penetration efficiency of NP through cellular membranes increases as the NP size decreases and that the translocation time increases with particle size (Chen *et al.* 2006; Choi *et al.* 2010; Diang *et al.* 2012). Thus, in our study, the smaller size of the 5 nm particles ($D_{50} = 48$ nm in aerosol) would facilitate their possible and rapid translocation from the lung epithelial cells, thereby reducing their availability and time to cause cellular membrane lipid peroxidation at the NP - cell interface. The larger size of the 10-30 and 50 nm particles ($D_{50} = 65$ and 85 nm in aerosols, respectively) may on the other hand promote translocation to a lesser extent and over a longer period of time, resulting in increased interaction of NP with the cellular membranes, which generates oxidative stress through membranolytic effects (Figure 7).

We also observed that the LDH activity for the SA nano-aerosols compared to controls was only significant for the 5 nm particles (Figure 7). LDH is an enzyme that leaks from damaged cells as

a sign of membrane integrity lost (Zaqout *et al.* 2012) and as previously mentioned, is a suitable marker of cell death, particularly by necrosis. It could also be considered as evidence of NP penetration into cells (Meena *et al.* 2012). NP penetration into cells leading to interactions with intracellular components is size-dependent (Choi *et al.* 2010; Diang *et al.* 2012). Thus, the lower cytotoxicity observed for the larger NP (10-30 and 50 nm) could possibly be due to their less efficient penetration into cells. Interestingly, our data suggest that membrane damage by lipid peroxidation at the NP – cell membrane interface might not be the primary cause of cytotoxicity. Our results also highlight a possible role of nano-TiO₂ primary particle size in cell necrosis. The size-dependent effect of nano-TiO₂ observed in our study in the smaller than 100 nm agglomeration state is supported by the literature. Also, these results are in line with Paulhun's study (2009) that reported that the clearance kinetics of NP was more dependent on their initial particle size.

In addition, for the SA nano-aerosols, there may be a few reasons that explain the lack of cellular and histopathological changes with the 50 nm group compared to the 5 and 10-30 nm groups (Figures 5 and 9). First, considering the bulk powder characterization, approximately 20% of the crystal phase of the 50 nm powder was in the rutile form, while it was 3% or less for the two other powders (Table 1). It has already been reported that the rutile form of TiO₂ NP is less toxic than the anatase crystal phase (Sayes *et al.* 2006; Warheit *et al.* 2007a; Jiang *et al.* 2008; Braydich-Stolle *et al.* 2009; Schanen *et al.* 2009; Oberdörster, 2010). Thus, in the less than 100 nm agglomeration state, the presence of the rutile phase in the 50 nm powder may be partly responsible for the lower cellular toxicity observed. At equal mass concentration, as the NP size decreases, the surface area per mass unit increases and leads to high surface to volume ratios,

giving smaller NP enhanced surface reactivity (Oberdörster *et al.* 2005b). Studies have also shown that the surface adsorption and reactivity of smaller than 10 nm TiO₂ NP were enhanced relatively to larger NP (Zhang *et al.* 1999; Grassian *et al.* 2007a). Hence, the size effect of the initial 5 nm particle size ($D_{50} = 48$ nm in aerosol), which would be more toxic than the 50 nm particles ($D_{50} = 85$ nm in aerosol), may also contribute to the cytological effects observed for the SA nano-aerosols. Also, for these three nano-aerosols, the total particle number concentration was elevated (Table 2). However, the 50 nm SA nano-aerosol had the lowest total particle number concentration by a factor of 2.4 and 1.4 compared to the 5 and 10-30 nm nano-aerosols, respectively. Due to their small size, NP mainly contribute to number concentrations in aerosols and, to a much lesser degree, to mass concentration (Brouwer *et al.* 2004; Peters *et al.* 2009). For identical masses, a larger number of NP can occupy the same space, and thus, in theory, increase the interactions with biological material (Oberdörster *et al.* 2005b; Bérubé *et al.* 2007). Thus, all of these factors may also contribute to the toxicological results observed for the 50 nm SA nano-aerosol.

Overall, these results show that within a less than 100 nm agglomeration state, there may be a primary particle size-dependent effect of nano-TiO₂. Even though the 10-30 and 50 nm particles induced significantly higher oxidative stress and pro-inflammatory damage than the 5 nm particles, it cannot be directly concluded that these larger TiO₂ NP are more toxic. Our data, in line with the current literature, show that the smaller 5 nm particles may potentially pose greater health risks by causing more cytotoxicity through necrosis.

Our results also indicate that the 10-30 nm particles induced significant increases in the total cell count and number of macrophages in both the SA and LA nano-aerosols, while the number of neutrophils was significantly increased in the LA nano-aerosol (Figure 5), which also showed the highest fold increases in pro-inflammatory cytokine (Figure 6). Moreover, qualitatively comparing the agglomerate structure of the LA nano-aerosols (Figure 3) we noticed that the 10-30 nm particles agglomerated into loose structures with more void open spaces. The possibility of agglomeration and de-agglomeration of NP in physiological environments still remains an open question (Ferin *et al.* 1992; Grassian *et al.* 2007b; Warheit *et al.* 2007; Donaldson and Seaton 2012). However, if de-agglomeration was to occur once deposited in the lungs, the loose agglomerate structure is thought to be more easily de-agglomerated (Grassian *et al.* 2007b). Therefore, the NP agglomerates structure may also play a role in toxicity. Overall, of the three NP sizes, the 10-30 nm TiO₂ NP seemed to induce the most pronounced pro-inflammatory effects. These results are consistent with Grassian *et al.* (2007b) inhalation study in mice at 7 mg/m³ where it was concluded, solely based on the inflammatory cell response, that the 21 nm nano-TiO₂ particles (139 nm in aerosol) were slightly, but significantly more toxic than the 5 nm ones (120 nm in aerosol). Interestingly, the highest relative deposition efficiency of NP in the alveolar region occurs at approximately 20 nm (Oberdörster *et al.* 2005a; Landsiedel *et al.* 2012).

4.6 Conclusion

We have found that the initial NP size and agglomeration state are key determinants of nano-TiO₂ lung inflammatory reaction, cytotoxic and oxidative stress induced effects. Acute exposure to 20 mg/m³ of nano-TiO₂ in rats inhaled as LA nano-aerosols induced an acute inflammatory response, noted by an increase in the number of neutrophils, while SA nano-aerosols also produced oxidative stress damage and cytotoxicity in BALF. These results indicate that the toxicity modes of nano-TiO₂ are different when inhaled as two distinct agglomeration states, smaller or larger than 100 nm, and that within a smaller than 100 nm agglomeration state, there may be a primary particle size-dependent effect of nano-TiO₂. The 5 nm particles caused increased cytotoxic effects while the oxidative damage was milder when compared to 10-30 and 50 nm particles. This suggests that smaller NP can cause cytotoxicity through necrosis by penetrating more easily into cells and thereby reducing their interaction with the cellular membrane at the NP – cell interface, resulting in decreased oxidative stress effects. In addition, the most pronounced pro-inflammatory effects were induced by the 10-30 nm TiO₂ NP, which is also the size having the highest relative deposition efficiency in the alveolar region.

The overall observed responses for the LA and SA nano-aerosols as well as the primary particle size effect in the less than 100 nm agglomeration state must be investigated in future studies incorporating multiple doses, time points and nano-TiO₂ of different crystal phases, as well as systemic and translocation effects to better elucidate the impact of these factors on the NP kinetics and mechanism of toxicity.

Conflit of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the *Réseau de recherche en santé environnementale du Québec* (RRSE) and the *Institut de recherche en santé publique de l'Université de Montréal* (IRSPUM). Alexandra Noël is a recipient of Ph.D. scholarships from the *Institut de recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail* (IRSST) and from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ). Special thanks to Ginette Charest-Tardif of the *Université de Montréal* and Guylaine Lassonde of the *INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec* for technical support.

4.7 References

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., and Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol.* **4**, 634-641.

Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K. L., Schumann, G., Schulz, H., Semmler, M., Takenaka, S., Stettmaier, K., Bors, W., Ghio, A., Samet, J. M., and Heyder, J. (2005). Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med* **38**, 1080-1092.

Bermudez, E., Mangum, J. B., Asgharian, B., Wong, B. A., Reverdy, E. E., Janszen, D. B., Hext, P. M., Warheit, D. B., and Everitt, J. I. (2002). Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* **70**, 86-97.

Bermudez, E., Mangum, J. B., Wong, B. A., Asgharian, B., Hext, P. M., Warheit, D. B., and Everitt, J. I. (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* **77**, 347-357.

Berube, K., Balharry, D., Sexton, K., Koshy, L., and Jones, T. (2007). Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 1044-1050.

Boutou-Kempf, O., Marchand, J. L., Radauceanu, A., Witschger, O., and Imbernon, E. (2011). Development of a French epidemiological surveillance system of workers producing or handling engineered nanomaterials in the workplace. *J Occup Environ Med* **53**, S103-S107.

Braydich-Stolle, L. K., Schaeublin, N. M., Murdock, R. C., Jiang, J., Biswas, P., Schlager, J. J., Hussain, S. M. (2009). Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity. *J Nanopart Res* **11**, 1361-1374.

Brouwer, D. H., Gijbbers, J. H., and Lurvink, M. W. (2004). Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *Ann Occup Hyg* **48**, 439-453.

Brown, D. M., Wilson, M. R., MacNee, W., Stone, V., and Donaldson, K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**, 191-199.

Cavaillon, J. M. (1993). *Les cytokines*. Ed. Masson, Paris. ISBN: 2-225-84174-8, 412 pp.

Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fang, X., Ma, B., and Wan, L. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett* **163**, 109-120.

Cho, W. S., Duffin, R., Poland, C. A., Howie, S. E., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I. L., and Donaldson, K. (2010). Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* **118**, 1699-1706.

Choi, H. S., Ashitate, Y., Lee, J. H., Kim, S. H., Matsui, A., Insin, N., Bawendi, M. G., Semmler-Behnke, M., Frangioni, J. V., and Tsuda, A. (2010). Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol* **28**, 1300-1303.

Curwin, B., and Bertke, S. (2011). Exposure characterization of metal oxide nanoparticles in the workplace. *J Occup Environ Hyg* **8**, 580-587.

Demou, E., Stark, W. J., and Hellweg, S. (2009). Particle emission and exposure during nanoparticle synthesis in research laboratories. *Ann Occup Hyg* **53**, 829-838.

Diang, H. M., Tian, W. D., Ma, Y. Q. (2012). Designing nanoparticle translocation through membranes by computer simulations. *ACS Nano* **6**, 1230-1238.

Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., and MacNee, W. (2001). Ultrafine particles. *Occup Environ Med* **58**, 211-6, 199.

Donaldson, K., and Seaton, A. (2012). A short history of the toxicology of inhaled particles. Part I. *Fibre Toxicol* **9**, 13.

Duffin, R., Mills, N. L., and Donaldson, K. (2007). Nanoparticles-a thoracic toxicology perspective. *Yonsei Med J* **48**, 561-572.

Elder, A., Gelein, R., Silva, V., Feikert, T., Opanashuk, L., Carter, J., Potter, R., Maynard, A., Ito, Y., Finkelstein, J., and Oberdorster, G. (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* **114**, 1172-1178.

Fahmy, B., and Cormier, S. A. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol In Vitro* **23**, 1365-1371.

Ferin, J., Oberdorster, G., and Penney, D. P. (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**, 535-542.

Fryzek, J. P., Chadda, B., Marano, D., White, K., Schweitzer, S., McLaughlin, J. K., and Blot, W. J. (2003). A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *J Occup Environ Med* **45**, 400-409.

Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im, H., V, Heyder, J., and Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* **113**, 1555-1560.

Geiser, M., Casaulta, M., Kupferschmid, B., Schulz, H., Semmler-Behnke, M., and Kreyling, W. (2008). The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**, 371-376.

Geiser, M. and Kreyling, W.G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. Part
Fibre Toxicol **7**, 2.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., and Osborne, B.A. (2000). Immunologie le cours de Janis Kuby.
W.H. Freeman and Company, New-York and Basingstoke, 660 pp.

Goncalves, D. M., and Girard, D. (2011). Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce
neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. Int
Immunopharmacol **11**, 1109-1115.

Grassian, V. H., O'Shaughnessy, P. T., Adamcova-Dodd, A., Pettibone, J. M., and Thorne, P. S.
(2007a). Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size
of 2 to 5 nm. Environ Health Perspect **115**, 397-402.

Grassian, V. H., Adamcova-Dodd, A., Pettibone, J. M., O'Shaughnessy, P. T. and Thorne, P. S.
(2007b). Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles:
Comparison of size effects through different exposure routes. Nanotoxicol **1**, 211-226.

Halappanavar, S., Jackson, P., Williams, A., Jensen, K. A., Hougaard, K. S., Vogel, U., Yauk, C. L., and Wallin, H. (2011). Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. *Environ Mol Mutagen* **52**, 425-439.

Hervé-Bazin, B. (2007). *Les nanoparticules un enjeu majeur pour la santé au travail?* EDP Sciences, France, 701 pp.

Hext, P. M., Tomenson, J. A., and Thompson, P. (2005). Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology. *Ann Occup Hyg* **49**, 461-472.

Hsu, L. Y. and Chein, H. M. (2007). Evaluation of nanoparticle emission for TiO₂ nanopowder coating materials. *J Nanopart Res* **9**, 157-163.

Jiang, J., Oberdorster, G., Elder, A., Gelein, R., Mercer, P., and Biswas, P. (2008). Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase? *Nanotoxicology* **2**, 33-42.

Johnston, H. J., Hutchison, G. R., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., and Stone, V. (2009). Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol* **6**, 33.

Kanapilly, G. M., Wolff, R. K., DeNee, P. B., and McClellan, R. O. (1982). Generation, characterization and inhalation deposition of ultrafine aggregate aerosols. *Ann Occup Hyg* **26**, 77-91.

Kobayashi, N., Naya, M., Endoh, S., Maru, J., Yamamoto, K., and Nakanishi, J. (2009). Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology* **264**, 110-118.

Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Seitz, J., Scymczak, W., Wenk, A., Mayer, P., Takenaka, S., and Oberdorster, G. (2009). Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol* **21 Suppl 1**, 55-60.

Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., and Moller, W. (2012). Differences in the Biokinetics of Inhaled Nano- versus Micrometer-Sized Particles. *Acc Chem Res*.

Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Haussmann, H. J., van, R. B., Kayser, M., and Wiench, K. (2012). Inhalation studies for the safety assessment of nanomaterials: status quo and the way forward. *Wiley Interdiscip. Rev Nanomed. Nanobiotechnol.* **4**, 399-413.

Lee, J. H., Kwon, M., Ji, J. H., Kang, C. S., Ahn, K. H., Han, J. H., and Yu, I. J. (2011). Exposure assessment of workplaces manufacturing nanosized TiO₂ and silver. *Inhal Toxicol* **23**, 226-236.

Liang, G., Pu, Y., Yin, L., Liu, R., Ye, B., Su, Y., and Li, Y. (2009). Influence of different sizes of titanium dioxide nanoparticles on hepatic and renal functions in rats with correlation to oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A* **72**, 740-745.

Lindberg, H. K., Falck, G. C., Catalan, J., Koivisto, A. J., Suhonen, S., Jarventaus, H., Rossi, E. M., Nykasenoja, H., Peltonen, Y., Moreno, C., Alenius, H., Tuomi, T., Savolainen, K. M., and Norppa, H. (2012). Genotoxicity of inhaled nanosized TiO₂ in mice. *Mutat Res* **745**, 58-64.

Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H. C., Wang, T., Liao, C. Y., Cui, L., Zhou, Q. F., Yan, B., and Jiang, G. B. (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology* **4**, 319-330.

Lux Research. (2004). *The Nanotech Report 2004* <http://www.luxresearchinc.com/>

Ma-Hock, L., Gamer, A. O., Landsiedel, R., Leibold, E., Frechen, T., Sens, B., Linsenbuehler, M., and van, R. B. (2007). Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials. *Inhal Toxicol* **19**, 833-848.

Ma-Hock, L., Burkhardt, S., Strauss, V., Gamer, A. O., Wiench, K., van, R. B., and Landsiedel, R. (2009). Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol* **21**, 102-118.

McIntyre, R. A. (2012). Common nano-materials and their use in real world applications. *Sci Progress* **95**, 1-22.

McKinney, W., Jackson, M., Sager, T. M., Reynolds, J. S., Chen, B. T., Afshari, A., Krajnak, K., Waugh, S., Johnson, C., Mercer, R. R., Frazer, D. G., Thomas, T. A., and Castranova, V. (2012). Pulmonary and cardiovascular responses of rats to inhalation of a commercial antimicrobial spray containing titanium dioxide nanoparticles. *Inhal Toxicol* **24**, 447-457.

Meena, R., Pal, R., Pradhan, S. N., Rani, M., Paulraj, R. (2012). Comparative study of TiO₂ and TiSiO₄ nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis of HEK-293 cells. *Adv Mat Lett* **3**, 459-465.

Muhlfeld, C., Mayhew, T. M., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. (2007a). A novel quantitative method for analyzing the distributions of nanoparticles between different tissue and intracellular compartments. *J Aerosol Med* **20**, 395-407.

Muhlfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., Vanhecke, D., Blank, F., Gehr, P., and Ochs, M. (2007b). Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy. *Part Fibre Toxicol* **4**, 11.

Muhlfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Vanhecke, D., Ochs, M., and Gehr, P. (2008). Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L817-L829.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (2011). Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention: DHHS. Publication No. 2011-160. Current intelligence bulletin 63.

<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf>

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

Nicola, N. A. (1994). *Guidebook to cytokines and their receptors*. A Sambrook and Tooze publication, Oxford University Press, 261 pp.

Noël, A., Maghni, K., Cloutier, Y., Dion, C., Wilkinson, K. J., Halle, S., Tardif, R., and Truchon, G. (2012). Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs. *Toxicol Lett* **214**, 109-119.

Noël, A., Cloutier, Y., Wilkinson, K. J., Dion, C., Halle, S., Maghni, K., Tardif, R., and Truchon, G. (2013a). Generating Nano-Aerosols from TiO₂ (5 nm) Nanoparticles Showing Different Agglomeration States. Application to Toxicological Studies. *J Occup Environ Hyg* **10**, 86-96.

Noël, A., L'Espérance, G., Cloutier, Y., Plamondon, P., Boucher, J., Philippe, S., Dion, C., Truchon, G., Zayed, J. (2013b). Assessment of the contribution of electron microscopy to nanoparticle characterization sampled with two cascade impactors. *J Occup Environ Hyg* **10**, 155-172.

Oberdörster, G. (1988). Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *J Aerosol Med* **1**, 289-329.

Oberdorster, G., Ferin, J., Gelein, R., Soderholm, S. C., and Finkelstein, J. (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.

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

Oberdörster, G., Cox, C., and Gelein, R. (1997). Intratracheal instillation versus intratracheal-inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. *Exp Lung Res* **23**, 17-34.

Oberdorster, G., Finkelstein, J. N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Elder, A. C. (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* **5**-74.

Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., and Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1531-1543.

Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., and Cox, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* **16**, 437-445.

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

Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., and Yang, H. (2005b). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* **2**, 8.

Oberdorster, G. (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med* **267**, 89-105.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2010). List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials: revision. Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27

Pauluhn, J. (2009). Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. *Toxicol Sci* **109**, 152-167.

Peters, T. M., Elzey, S., Johnson, R., Park, H., Grassian, V. H., Maher, T., and O'Shaughnessy, P. (2009). Airborne monitoring to distinguish engineered nanomaterials from incidental particles for environmental health and safety. *J Occup Environ Hyg* **6**, 73-81.

Pratten, M. K., and Lloyd, J. B. (1986). Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Biochim Biophys Acta* **881**, 307-313.

Preining, E. (1998). The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *J Aerosol Sci* **29**, 481-495.

Ratthe, C., Ennaciri, J., Garces Goncalves, D. M., Chiasson, S., and Girard, D. (2009). Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. *Mediators.Inflamm* **2009**, 193970.

Renwick, L. C., Brown, D., Clouter, A., and Donaldson, K. (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* **61**, 442-447.

Rossi, E. M., Pylkkanen, L., Koivisto, A. J., Vippola, M., Jensen, K. A., Miettinen, M., Sirola, K., Nykasenoja, H., Karisola, P., Stjernvall, T., Vanhala, E., Kiilunen, M., Pasanen, P., Makinen, M., Hameri, K., Joutsensaari, J., Tuomi, T., Jokiniemi, J., Wolff, H., Savolainen, K., Matikainen, S., and Alenius, H. (2010). Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci* **113** , 422-433.

Sager, T. M., Kommineni, C., and Castranova, V. (2008). Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol* **5**, 17.

Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., Liu, Y., West, J. L., Ausman, K. D., Warheit, D. B., and Colvin, V. L. (2006). Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and

inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* **92**, 174-185.

Scarino, A., Tardif, R., and Charbonneau, M. (2009). Influence of ALDH2 polymorphism on ethanol kinetics and pulmonary effects in male and female rats exposed to ethanol vapors. *Inhal Toxicol* **21**, 193-199.

Schanen, B. C., Karakoti, A. S., Seal, S., Drake, D. R., III, Warren, W. L., and Self, W. T. (2009). Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an in vitro human immune construct. *ACS Nano* **3**, 2523-2532.

Scherbart, A. M., Langer, J., Bushmelev, A., van, B. D., Haberzettl, P., van Schooten, F. J., Schmidt, A. M., Rose, C. R., Schins, R. P., and Albrecht, C. (2011). Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. *Part Fibre Toxicol* **8**, 31.

Seipenbusch, M., Binder, A., and Kasper, G. (2008). Temporal evolution of nanoparticle aerosols in workplace exposure. *Ann Occup Hyg* **52**, 707-716.

Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., and Heyder, J. (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 4**, 547-551.

Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W. G., Lentner, B., Moller, W., Behnke-Semmler, M., Jennen, L., Walch, A., Michalke, B., Schramel, P., Heyder, J., and Schulz, H. (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* **18**, 733-740.

Tetley, T. D. (2007). Health effects of nanomaterials. *Biochem Soc Trans* **35**, 527-531.

van, R. B., Landsiedel, R., Fabian, E., Burkhardt, S., Strauss, V., and Ma-Hock, L. (2009). Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz. *Toxicol Lett* **186**, 152-159.

United-States Environmental Protection Agency (EPA). (2009). Nanomaterial Research Strategy Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Washington, D.C. Report no EPA620/K-09/011.

Warheit, D. B., Webb, T. R., Sayes, C. M., Colvin, V. L., and Reed, K. L. (2006). Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci* **91**, 227-236.

Warheit, D. B., Hoke, R. A., Finlay, C., Donner, E. M., Reed, K. L., and Sayes, C. M. (2007a). Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* **171**, 99-110.

Warheit, D. B., Webb, T. R., Colvin, V. L., Reed, K. L., and Sayes, C. M. (2007b). Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci* **95**, 270-280.

Warheit, D. B., Reed, K. L., and Delorme, M. P. (2012). Embracing a Weight-of-Evidence Approach for Establishing NOAELs for Nanoparticle Inhalation Toxicity Studies. *Toxicol Pathol.*

Xia, T., Kovoichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., and Nel, A. E. (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* **6**, 1794-1807.

Yang, W., Peters, J. I., and Williams, R. O., III (2008). Inhaled nanoparticles--a current review. *Int J Pharm* **356**, 239-247.

Zaqout, M. S., Sumizawa, T., Igisu, H., Wilson, D., Myojo, T., and Ueno, S. (2012). Binding of titanium dioxide nanoparticles to lactate dehydrogenase. *Environ Health Prev Med* **17**, 341-345.

Zhang, H. Z., Penn, R. L., Hamers, R. J., Banfield, J. F. (1999). Enhanced adsorption of molecules on surfaces of nanocrystalline particles. *J Phys Chem B* **103**, 4656-4662.

Zook, J. M., Maccuspie, R. I., Locascio, L. E., Halter, M. D., and Elliott, J. T. (2011). Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology* **5**, 517-530.

Table 1Bulk powder characterization of TiO₂ NP

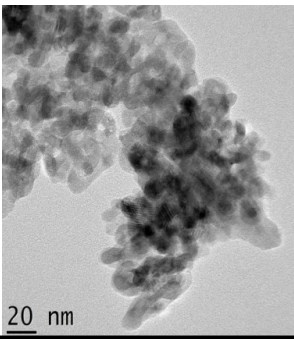
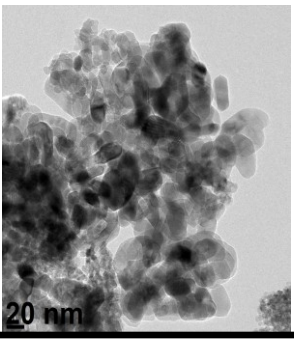
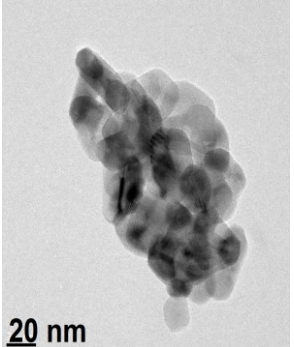
	Parameters	Methods	Results
5 nm n = 375 	Morphology	TEM	Spherical: > 97% Rod-shape: < 3%
	Crystal phase	XRD	Anatase: > 97% (volume) Rutile: < 3%
	Size (nm)	TEM	53.3% between 3 and 11 Median: 10.6 Min: 3.9 and max: 75.6
10-30 nm n = 330 	Morphology	TEM	Spherical
	Crystal phase	XRD	Anatase: 100% (volume) No rutile detected
	Size (nm)	TEM	67.6% between 11 and 31 Median: 18.2 Min: 4.9 and max: 70
50 nm n = 302 	Morphology	TEM	Spherical: > 80% Rod-shape: < 20%
	Crystal phase	XRD	Anatase: > 80% (volume) Rutile: < 20%
	Size (nm)	TEM	47% between 31 and 61 Median: 34.8 Min: 8.6 and max: 112

Table 2

Measurements and characterization of the nano-aerosols

Experimental groups							
Parameters	Control	5 nm SA ^a	5 nm LA ^b	10-30 nm SA	10-30 nm LA	50 nm SA	50 nm LA
Average mass concentration ^c	0.05	18.77	19.30	22.04	21.99	21.38	21.94
Min and max ^d (mg/m ³)	0.03 and 0.27	17.12 and 22.47	17.43 and 22.18	18.83 and 27.99	20.48 and 25.42	19.66 and 25.34	20.45 and 30.09
Total particle number ^e (/cm ³)	-	3 159 758	308 098	1 808 939	374 225	1 320 239	280 379
D ₂₅ ^{e,f} (nm)	-	29	156	28	128	35	135
NMAD or D ₅₀ ^{e,f} (nm)	-	48	369	65	255	85	321
D ₇₅ ^{e,f} (nm)	-	124	575	183	686	305	783
Fraction of NP agglomerates <100 nm ^e (%)	-	71	16	63	18	54	19

^a Nano-aerosol composed of small agglomerates.

^b Nano-aerosol composed of large agglomerates.

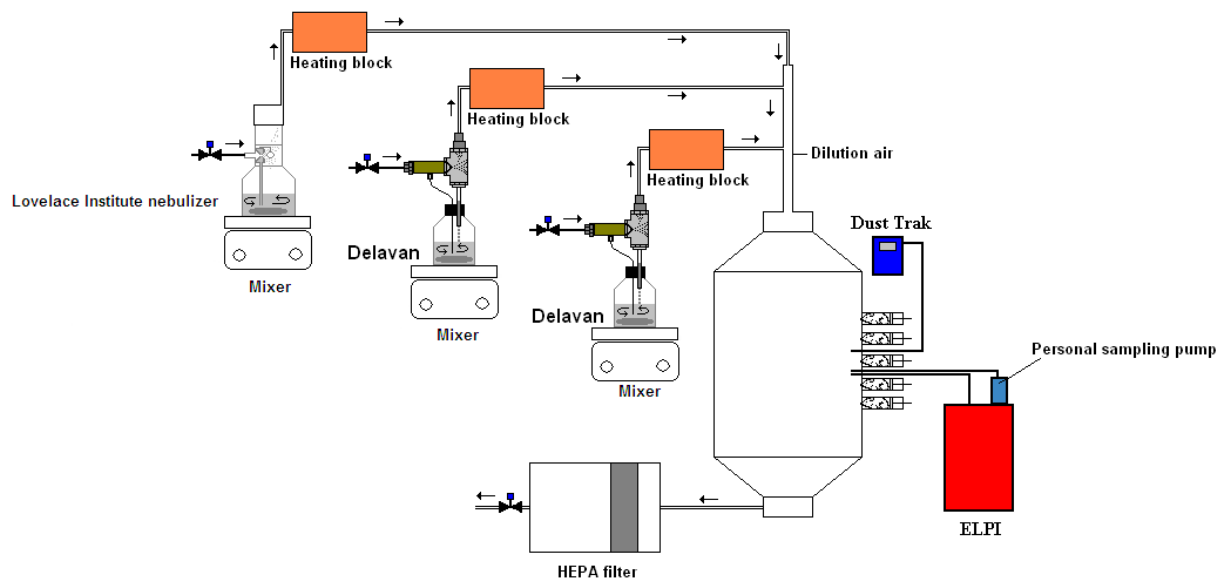
^c Average mass concentration (arithmetic) determined by weight measurements.

^d Min and max concentration determined by a DustTrak.

^e Measurements made with the ELPI.

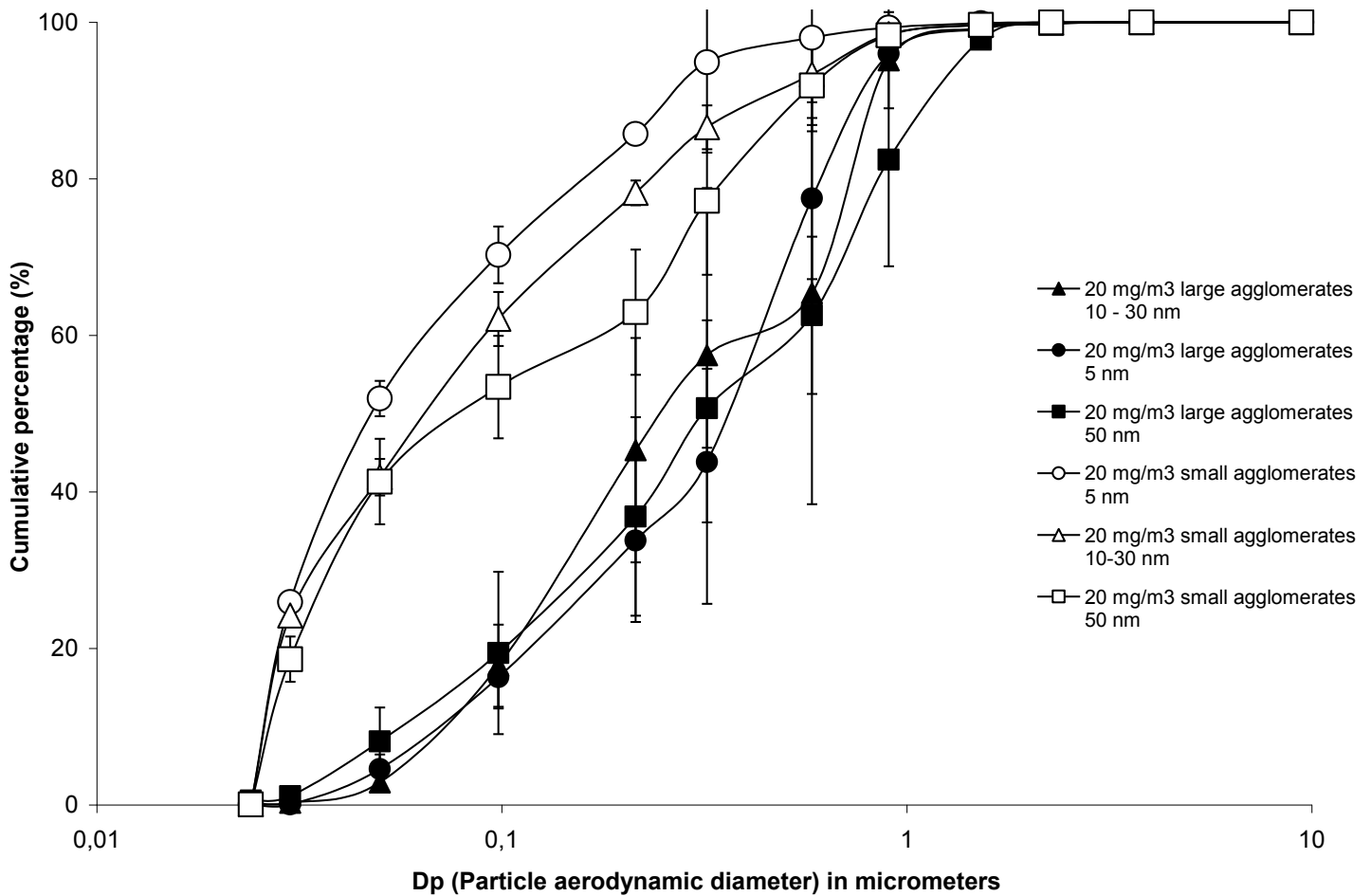
^f Aerodynamic diameters for which 25% (D₂₅), 50% (D₅₀ or NMAD) or 75% (D₇₅) of the particles in the aerosol are smaller than this value. D₇₅ – D₂₅ is the interquartile range and represents the size distribution where we find 50% of the particles.

Figure 1. Experimental set-up for the generation of small agglomerate aerosols



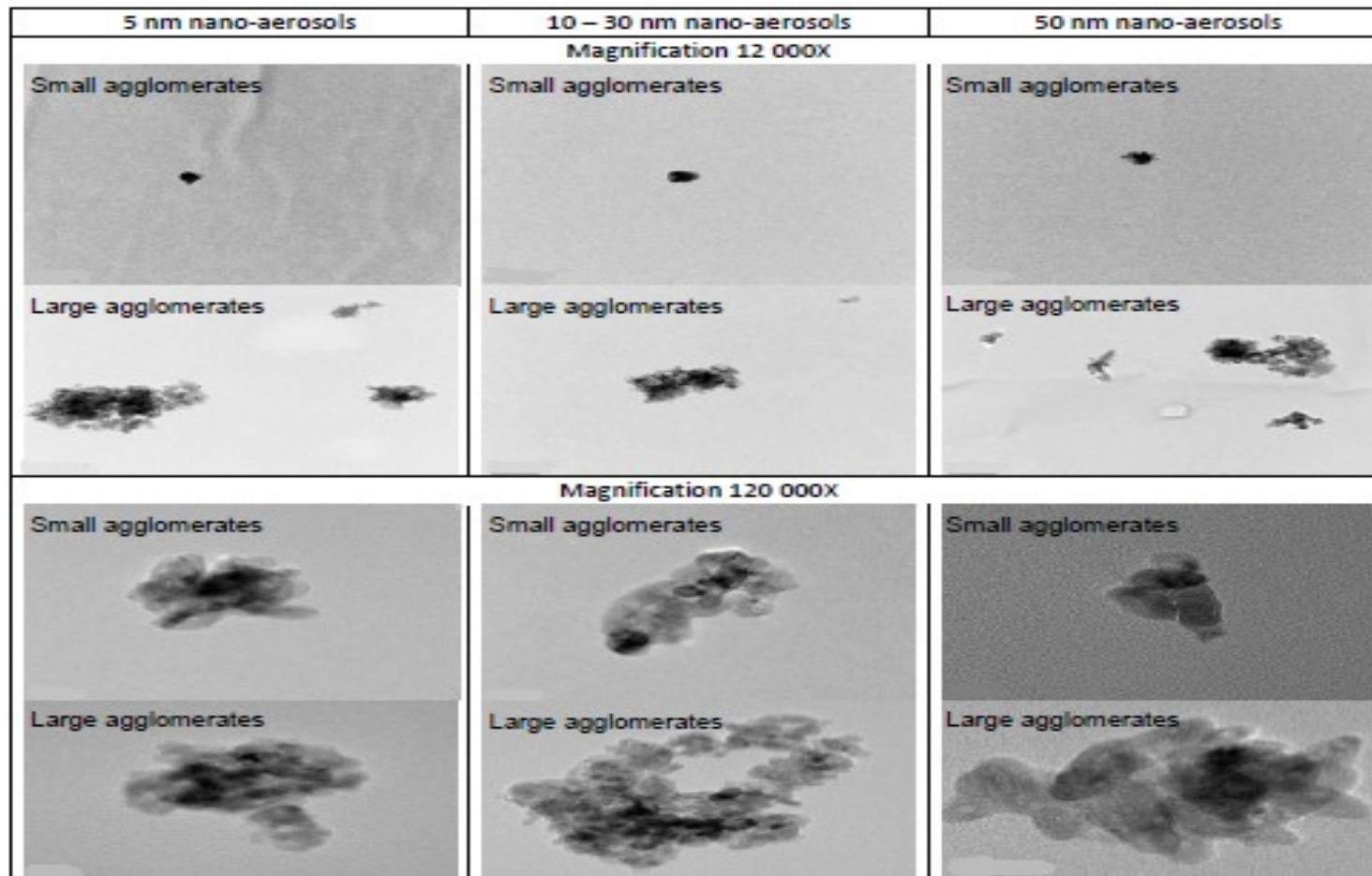
Experimental set-up using a Lovelace and two Delavan nebulizers in parallel to produce 20 mg/m^3 nano-aerosols. Nano-aerosols concentration measurements were made with an ELPI, a Dust Trak and a personal sampling pump. ELPI: electrical low pressure impactor; HEPA filter: high-efficiency particulate air filter.

Figure 2. Cumulative distributions of the nano-aerosols



Nano-aerosols cumulative size distributions measured with the ELPI. For each nano-aerosol 5 thirty-minute samples were collected every hour of the experiment. The graph represents the arithmetic mean values and the standard error.

Figure 3. Nano-aerosol agglomerate structure observed by transmission electron microscopy

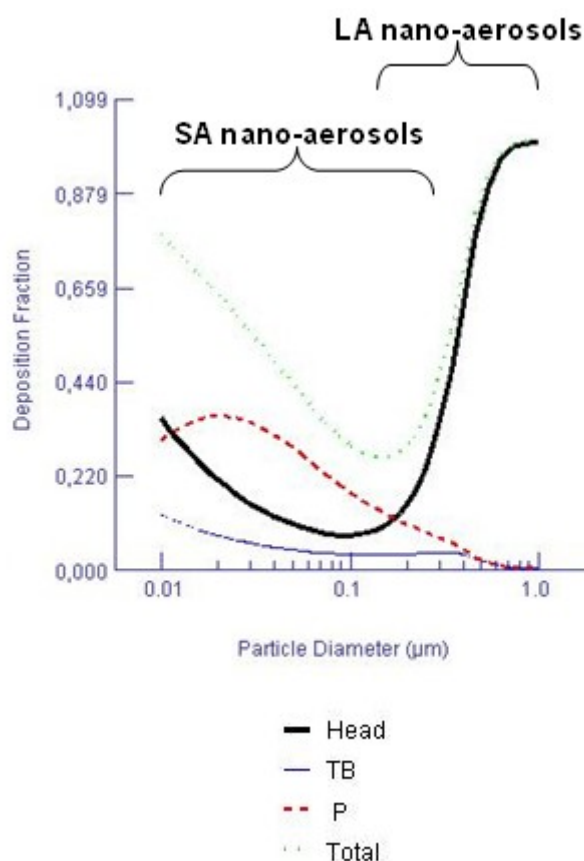


Air samples were collected on pre-carbon coated Formvar copper grids glued onto 25-mm polycarbonate filters placed in cassettes. Characterization (shape, agglomeration degree and structure) of the nano-aerosols was performed by TEM.

Scale bar (12 000-x magnification) 200 nm

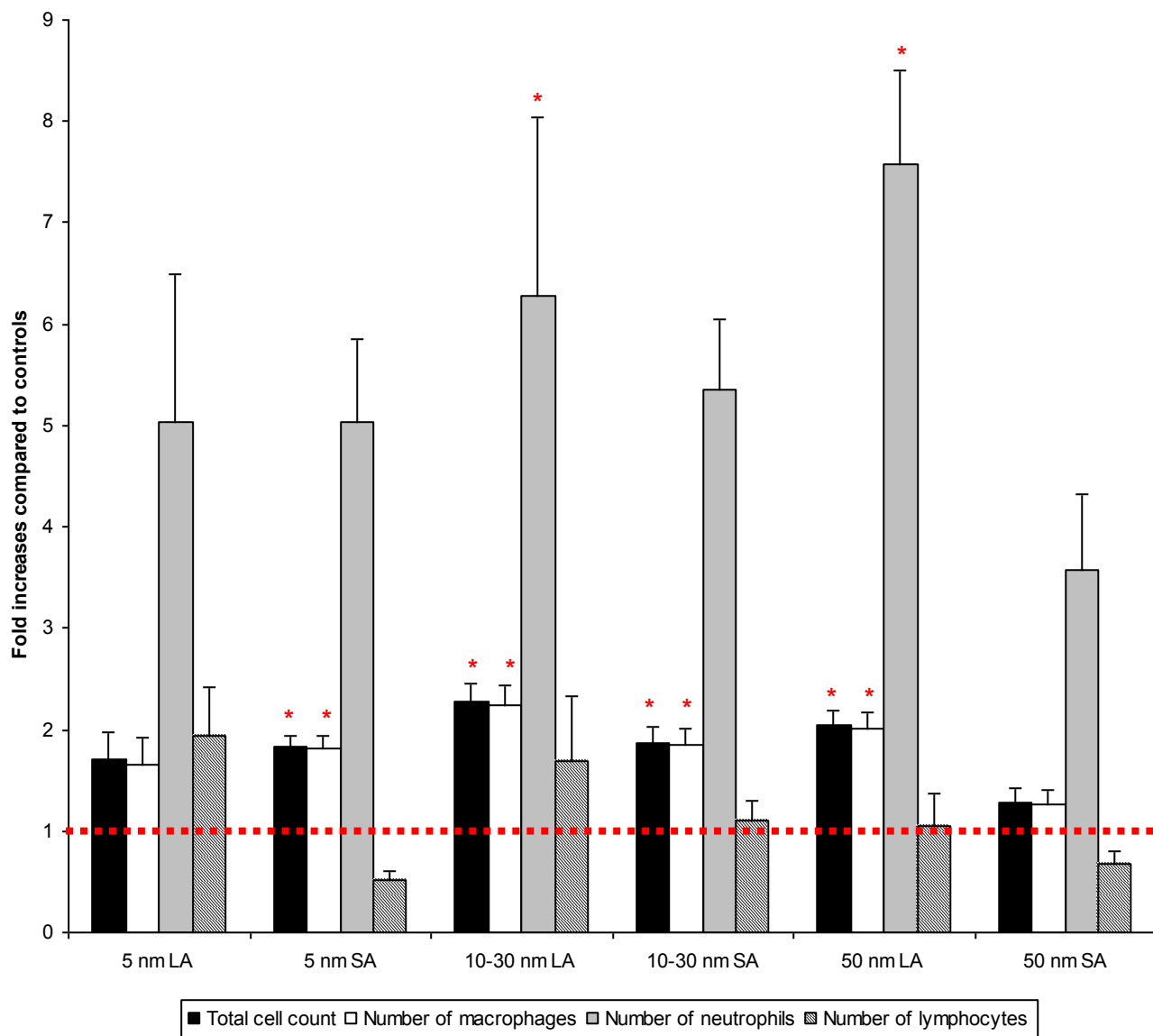
Scale bar (120 000-x magnification) 20 nm

Figure 4. Computed fractional deposition of NP agglomerates in the rat respiratory tract



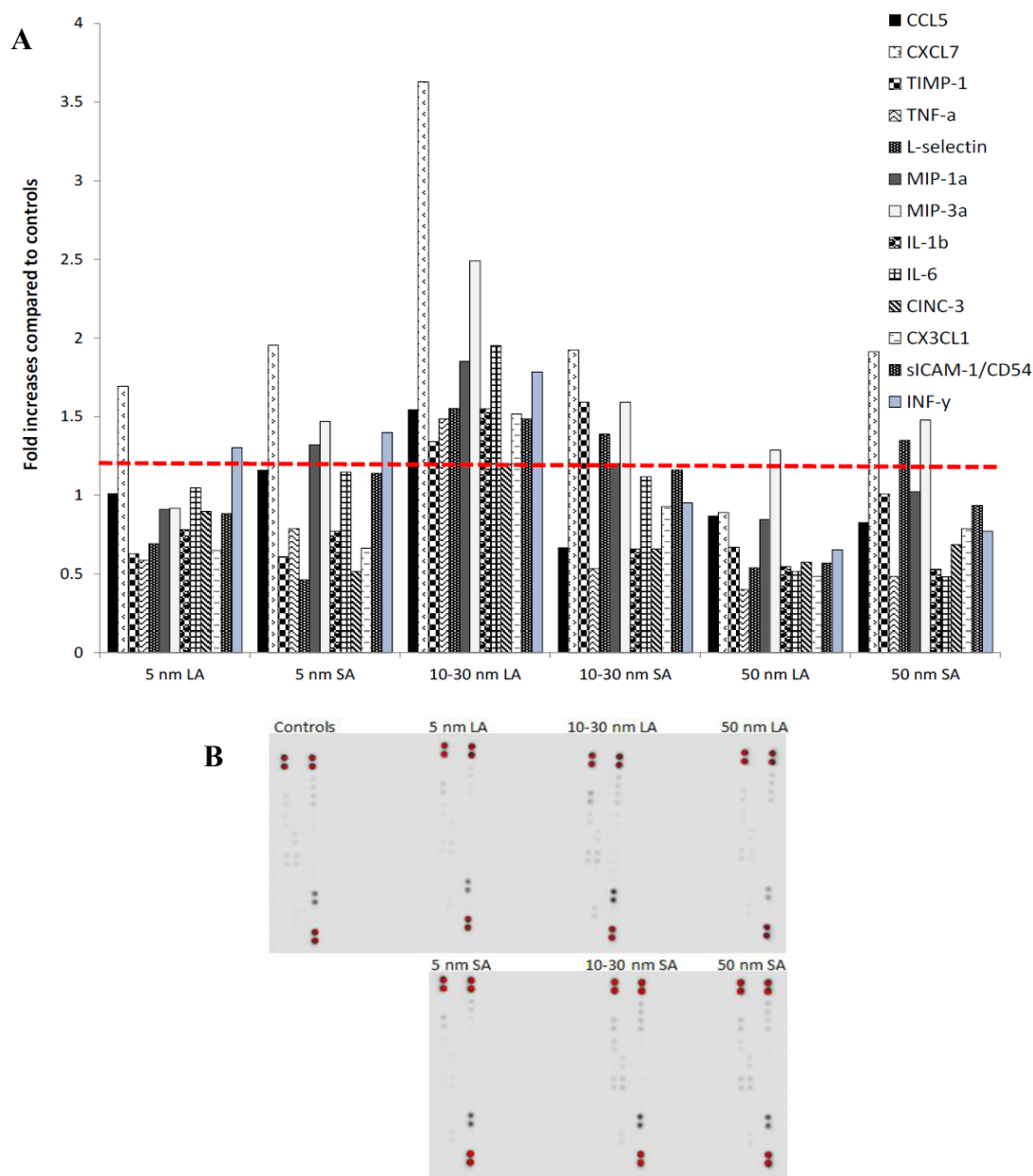
The rats' airway particle dosimetry was estimated using the Multiple-Path Particle Dosimetry Model (MPPD) (software version 2.11, Applied Research Associates Inc., Albuquerque, NM, USA). Estimated deposition fraction for the nano-aerosols at 20 mg/m^3 composed of SA, modeled for multiple diameters ranging from 10 to 100 nm and for the nano-aerosols composed of LA, modeled for multiple diameters ranging from 100 to 1000 nm. **TB** = tracheobronchial; **P** = pulmonary. Functional residual capacity (FRC) volume 4 ml; head volume: 0.42 ml; nasal breathing route; tidal volume 2.1 ml; breathing frequency 110/min and inspiratory fraction 0.1.

Figure 5. BALF cytology analyzed by the cytopsin method



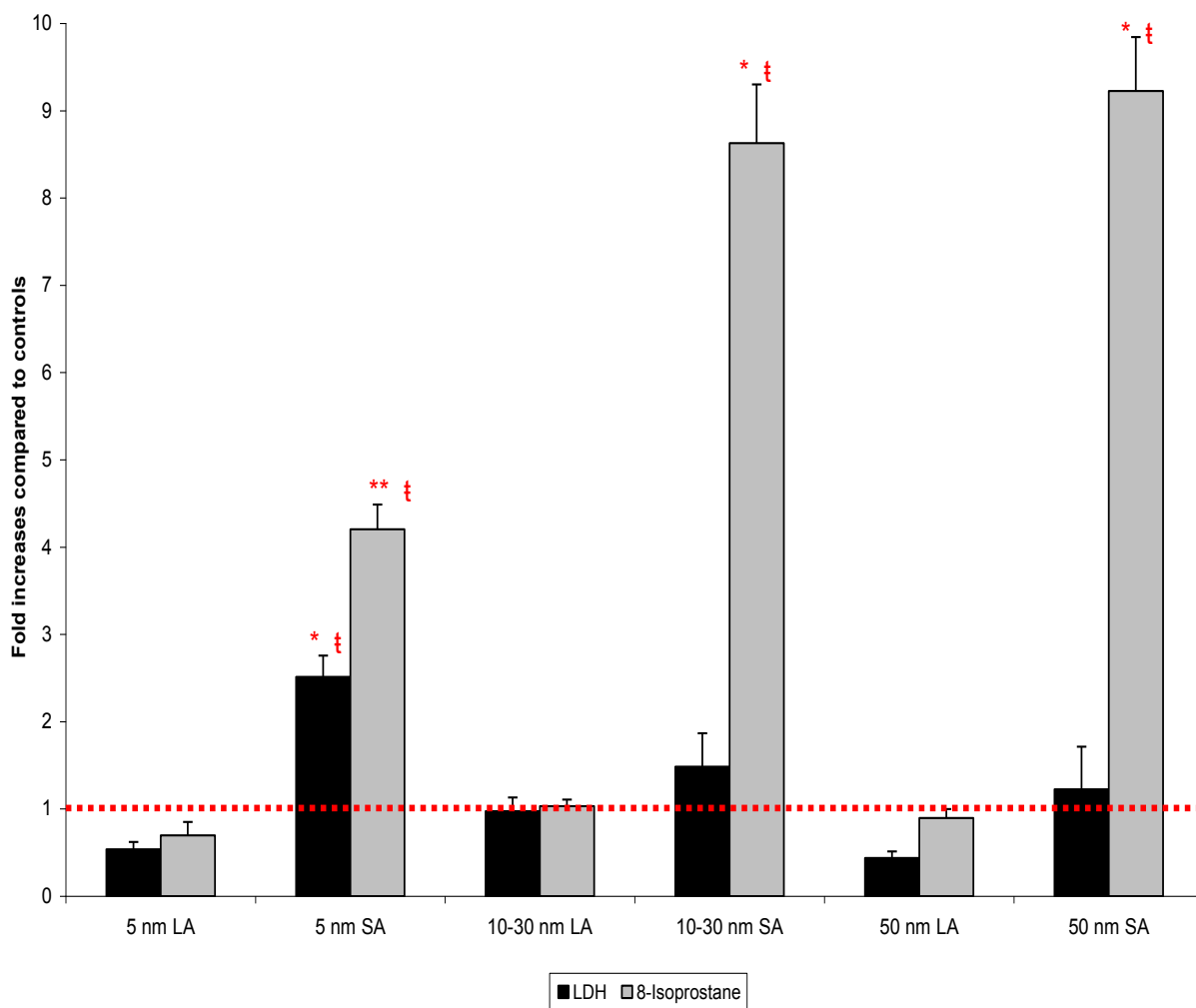
Data were expressed as fold increases of exposed groups compared to controls. Bars represent the arithmetic mean value and the standard error of the mean obtained for 6 rats in each exposure group. Statistical procedures: ANOVA followed by a Tukey's test. *Mean value is statistically different from control level $p < 0.05$.

Figure 6. Relative levels of BALF pro-inflammatory cytokines



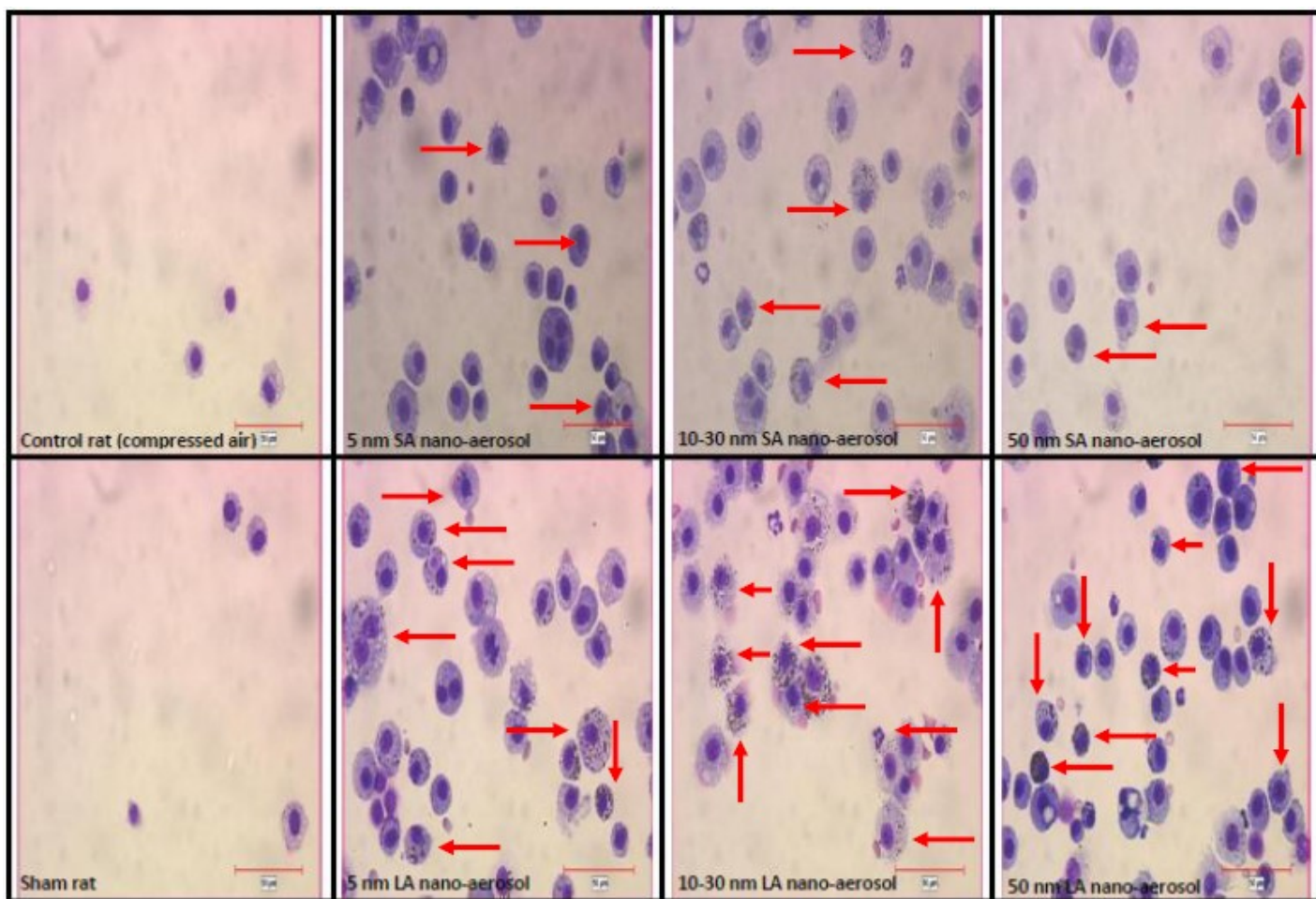
BALF pro-inflammatory cytokines were expressed as fold increases of exposed groups compared to controls (A). Samples from the same exposure group were pooled together. The ratio for each cytokine was calculated as described in materials and methods. Results with ratios ≥ 1.2 were considered to represent a slight inflammation. (B) Images of the membranes.

Figure 7. BALF cytotoxicity (LDH) and oxidative stress (8-isoprostane) markers



Data were expressed as fold increases of exposed groups compared to controls. Bars represent the mean value and the standard error on the mean obtained for 6 rats in each exposure group. LDH assay for each rat was done in triplicate and 8-isoprostane was in duplicate. Statistical procedures: ANOVA followed by a Tukey's test. * Mean value is statistically different from control level $p < 0.05$; ** Mean value is statistically different from control level and 10-30; 50 nm SA nano-aerosols $p < 0.05$; † Mean value is statistically different from all LA nano-aerosol levels $p < 0.05$.

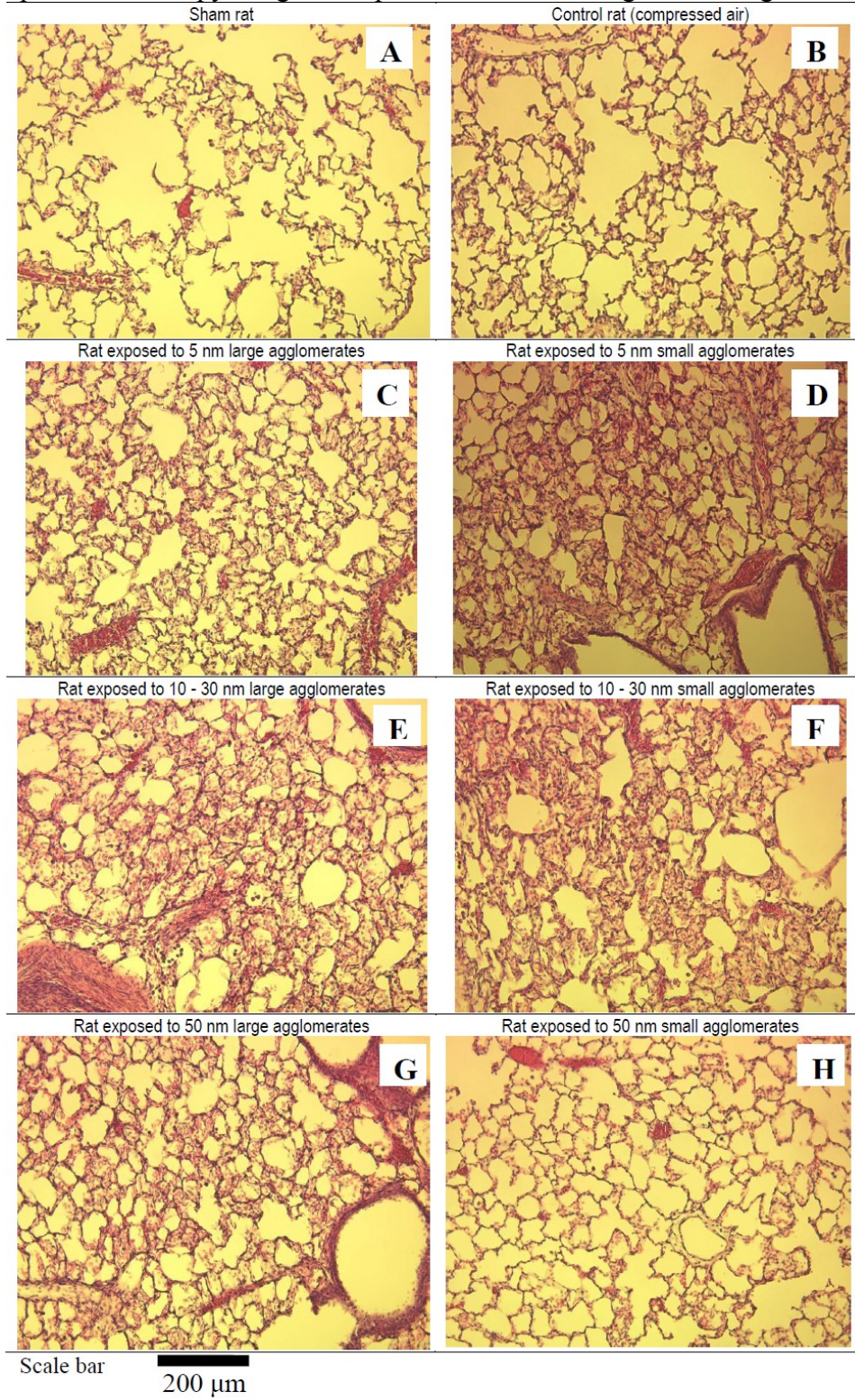
Figure 8. Representative cell morphology from BALF cytopreparations of rats



Optical microscopy (magnification 400-x) of cells cytopreparation collected in BALF of controls and exposed rats. For all nano-TiO₂ exposed groups, the images show giant foamy macrophages and the distribution of macrophages containing phagocytized TiO₂ NP (arrows).

Scale bar = 50 μm

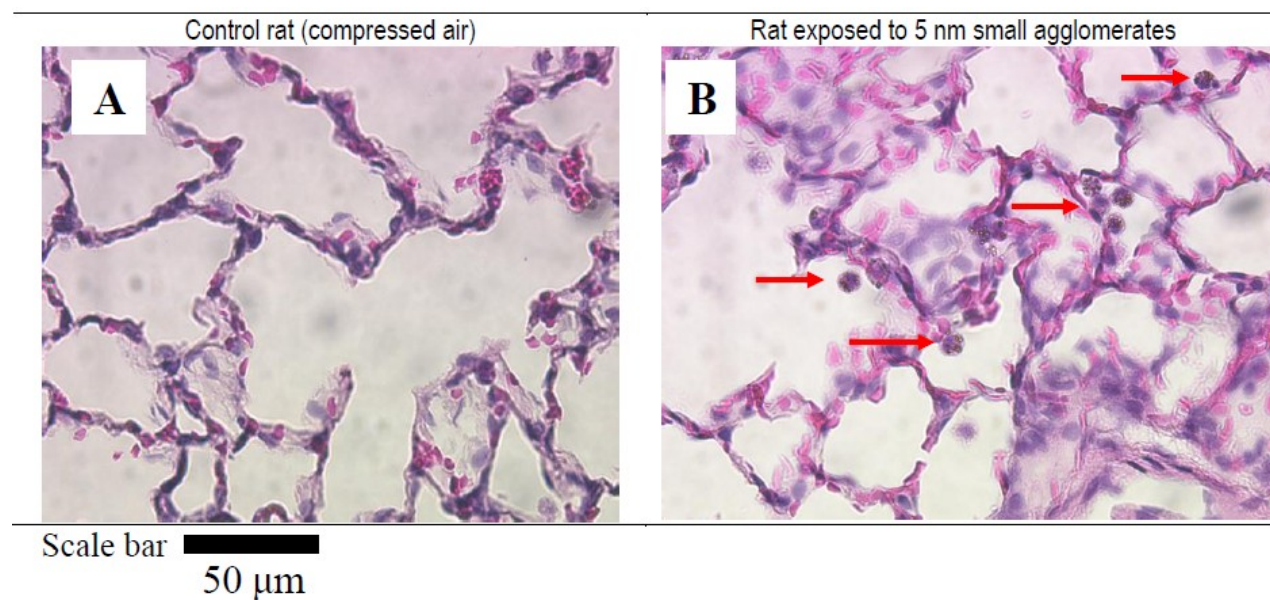
Figure 9. Optical microscopy images of representative caudal right lobe lung sections



Morphological assessments (100-x) of lung tissue stained with haematoxylin and eosin of sham, control (exposed to compressed air) and TiO₂ NP exposed rats by means of inhalation

for 6 hours. Responses to nano-TiO₂ (C to G) were different in intensity compared to the controls (B), except for the 50 nm SA group (H). The lungs of rats exposed to 5 and 10-30 nm SA nano-aerosols (D and F) as well as rats exposed to 10-30 and 50 nm LA nano-aerosols (E and G) showed more leukocyte infiltration compared to the control group (B).

Figure 10. Optical microscopy images of lung tissue sections

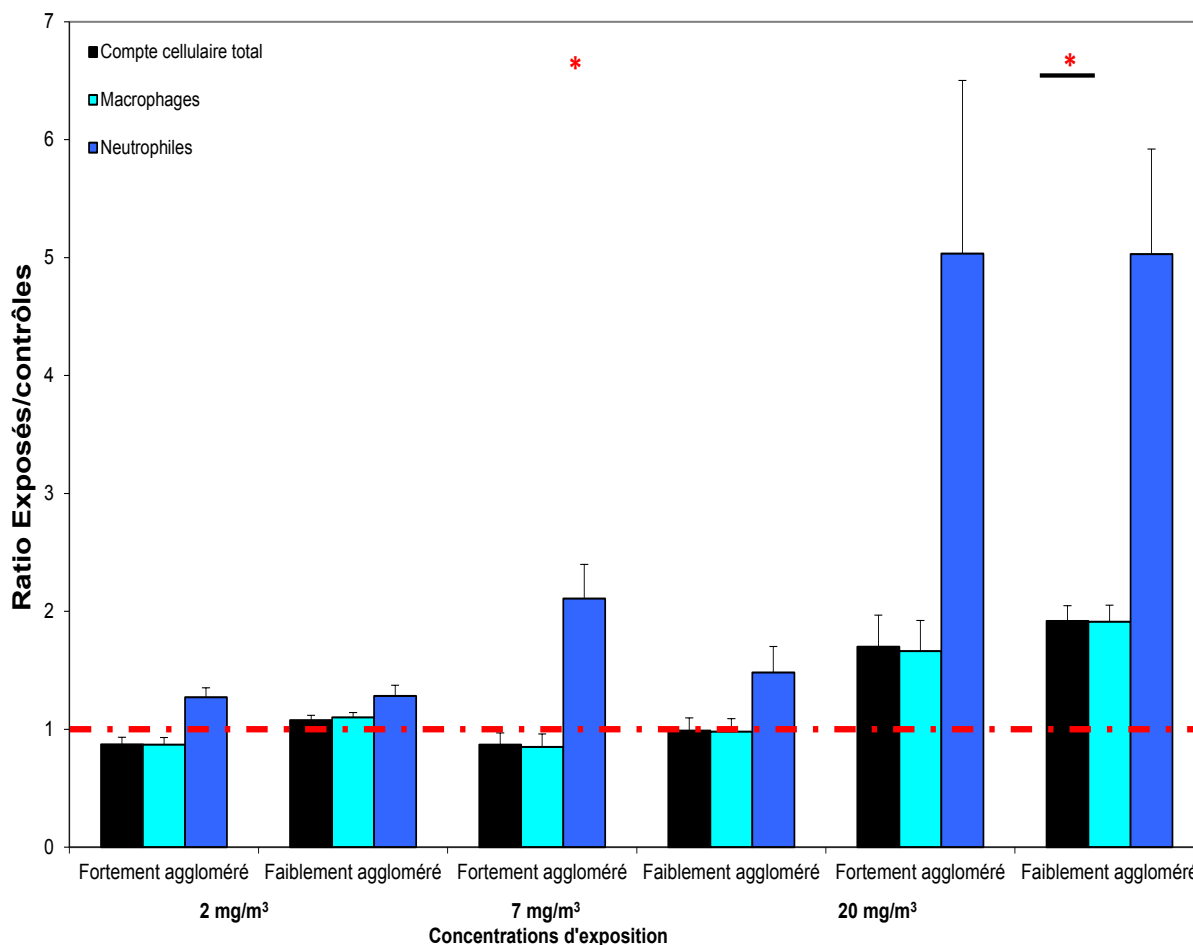


Higher magnification (400-x) of (A) lung of control rat exposed to compressed air. (B) Lung of a rat exposed to small agglomerates of 5 nm NP. This figure demonstrates TiO_2 NP engulfed by alveolar macrophages (arrows).

Chapitre 5 – Relation dose – réponse et métrique d'exposition pour les NP de TiO₂ de 5 nm

Les expositions animales aux NP de TiO₂ de taille de départ 5 nm ont été effectuées à trois concentrations massiques différentes, soient 2, 7 et 20 mg/m³ pour des nano-aérosols à la fois faiblement et fortement agglomérés. Ce chapitre présente donc une analyse complémentaire de l'ensemble des résultats pour les nano-aérosols composés de NP de TiO₂ de taille primaire 5 nm et discute des résultats portant sur la relation existant entre la dose d'exposition et la réponse pulmonaire. De plus, quelques résultats portant sur la relation entre des paramètres de toxicité et des métriques d'exposition sont également présentés. Les figures présentées ci-dessous résument les données obtenues dans cette thèse pour les NP de 5 nm.

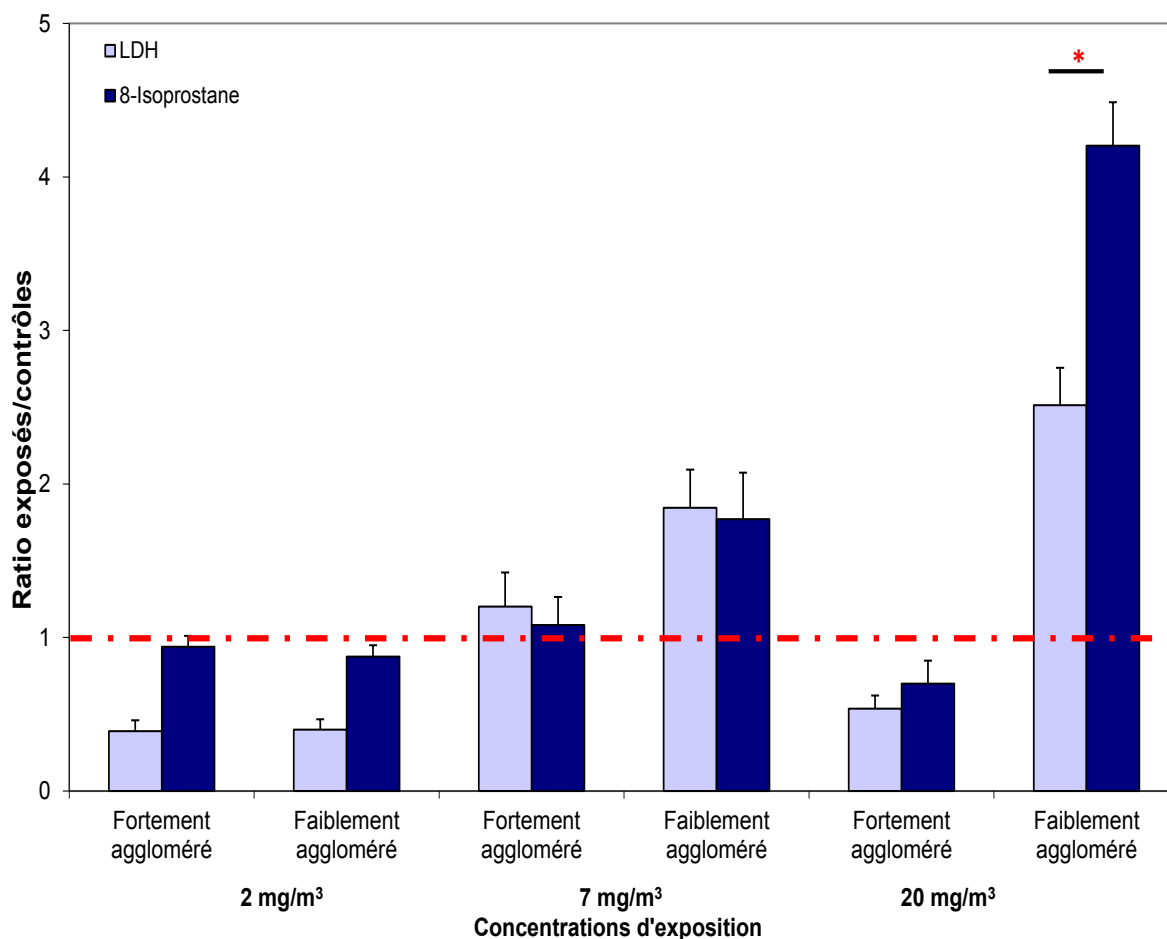
Figure 1. Cytologie des lavages broncho-alvéolaires



Cytologie des LBA analysée à l'aide de la méthode cytopspin. Les données sont exprimées en augmentation des ratios des groupes exposés comparativement aux groupes témoins. Les bandes représentent les valeurs moyennes et l'erreur type (n = 6) sur la moyenne. Procédures statistiques pour les aérosols à 2 et 7 mg/m³ : test de Kruskal Wallis suivi du test de Mann-Whitney; pour les aérosols à 20 mg/m³ : ANOVA suivi du test de Tukey (voir section matériels et méthodes des chapitres 3 et 4). * Résultats statistiquement différents du groupe témoin p < 0,05.

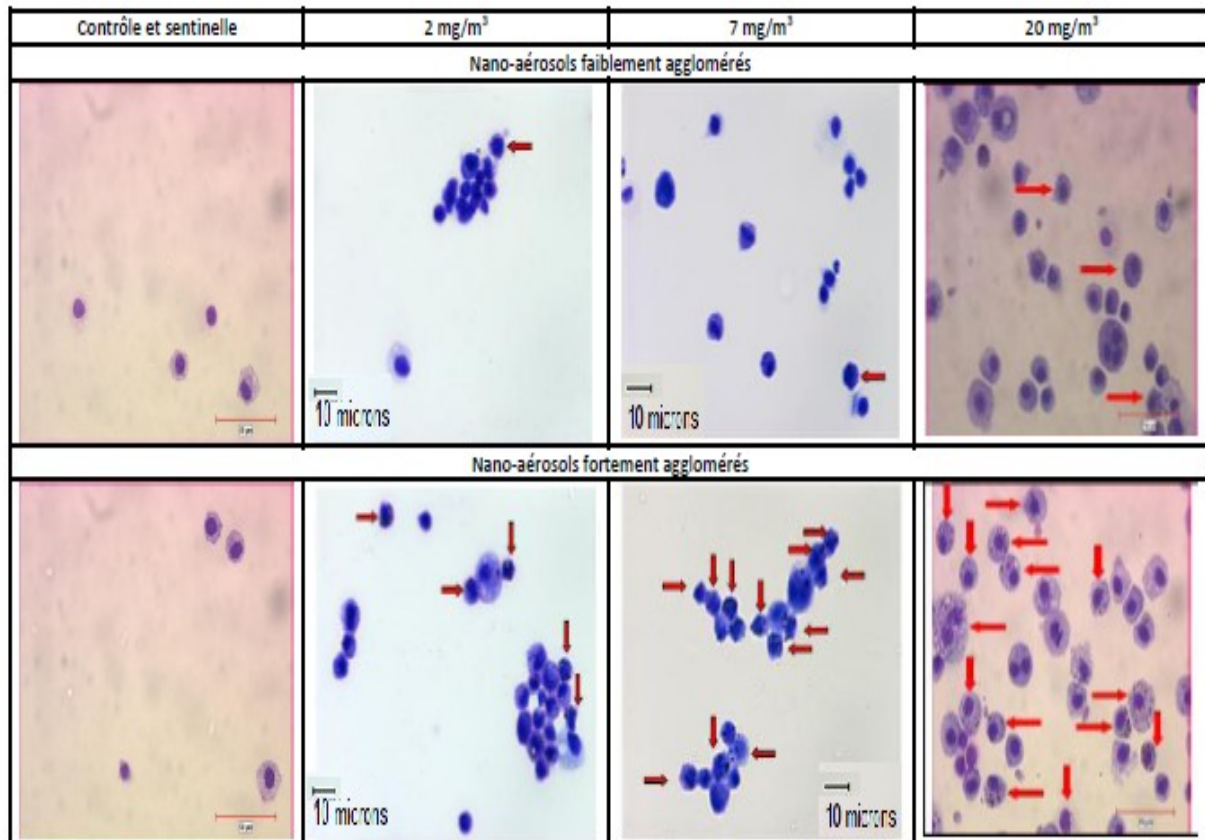
La Figure 1 permet de constater que l'exposition aux aérosols à 20 mg/m³ ainsi qu'à l'aérosol fortement aggloméré à 7 mg/m³ augmente le nombre de neutrophiles dans les LBA comparativement aux témoins respectifs. La Figure 2 montre que l'exposition aux aérosols faiblement agglomérés à 20 mg/m³ augmente significativement les niveaux de LDH et de 8-isoprostane dans les LBA. La Figure 3 montre des images représentatives prises par microscopie optique de la morphologie cellulaire des préparations cytologiques des LBA des rats. On remarque, pour tous les groupes exposés, que la répartition des macrophages ayant phagocyté des agglomérats de NP augmente en fonction de la dose (flèches). De plus, de façon générale, tous les groupes exposés aux nano-aérosols fortement agglomérés ont montré une présence plus importante de macrophages contenant des agglomérats de NP par rapport aux groupes faiblement agglomérés (Figure 3).



Figure 2. Marqueurs de cytotoxicité (LDH) et de stress oxydant (8-isoprostane)



Marqueurs de cytotoxicité (LDH) et de stress oxydant (8-Isoprostane) analysés à l'aide de kits spécifiques (voir les sections matériels et méthodes des chapitres 3 et 4). Les données sont exprimées en augmentation des ratios des groupes exposés comparativement aux groupes témoins. Les bandes représentent les valeurs moyennes et l'erreur type (n = 6) sur la moyenne. Procédures statistiques pour les aérosols à 2 et 7 mg/m³ : test de Kruskal Wallis suivi du test de Mann-Whitney; pour les aérosols à 20 mg/m³ : ANOVA suivi du test de Tukey (voir section matériels et méthodes des chapitres 3 et 4). * Résultats statistiquement différents du groupe témoin p < 0,05.

Figure 3. Images obtenues par microscopie optique de cellules recueillies dans les lavages broncho-alvéolaires de rats témoins et exposés aux NP de 5 nm



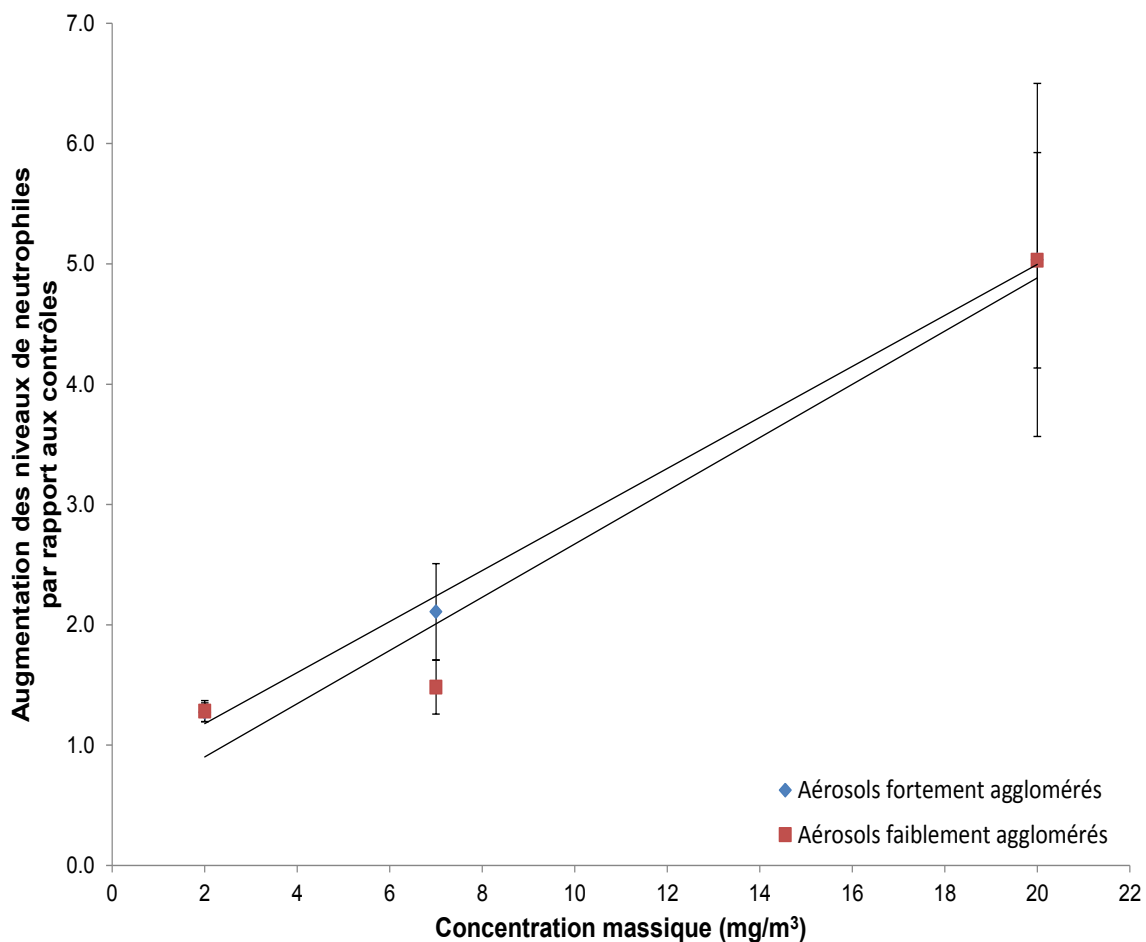
Échelles :  10 µm  50 µm

Microscopie optique des cellules recueillies dans les LBA et préparées par la méthode de cytopspin pour des rats exposés aux NP de TiO₂ de taille primaire de 5 nm et des rats témoins. Les flèches indiquent la répartition des macrophages ayant phagocyté des agglomérats de NP.

Les Figures 4, 5 et 6 montrent respectivement la relation entre un paramètre de l'inflammation (nombre de neutrophiles), de cytotoxicité (activité de la LDH) ainsi que de stress oxydant (concentration en 8-isoprostane) et la concentration massique en fonction de l'état d'agglomération, qui sont utilisés conjointement pour exprimer la dose. On peut observer de

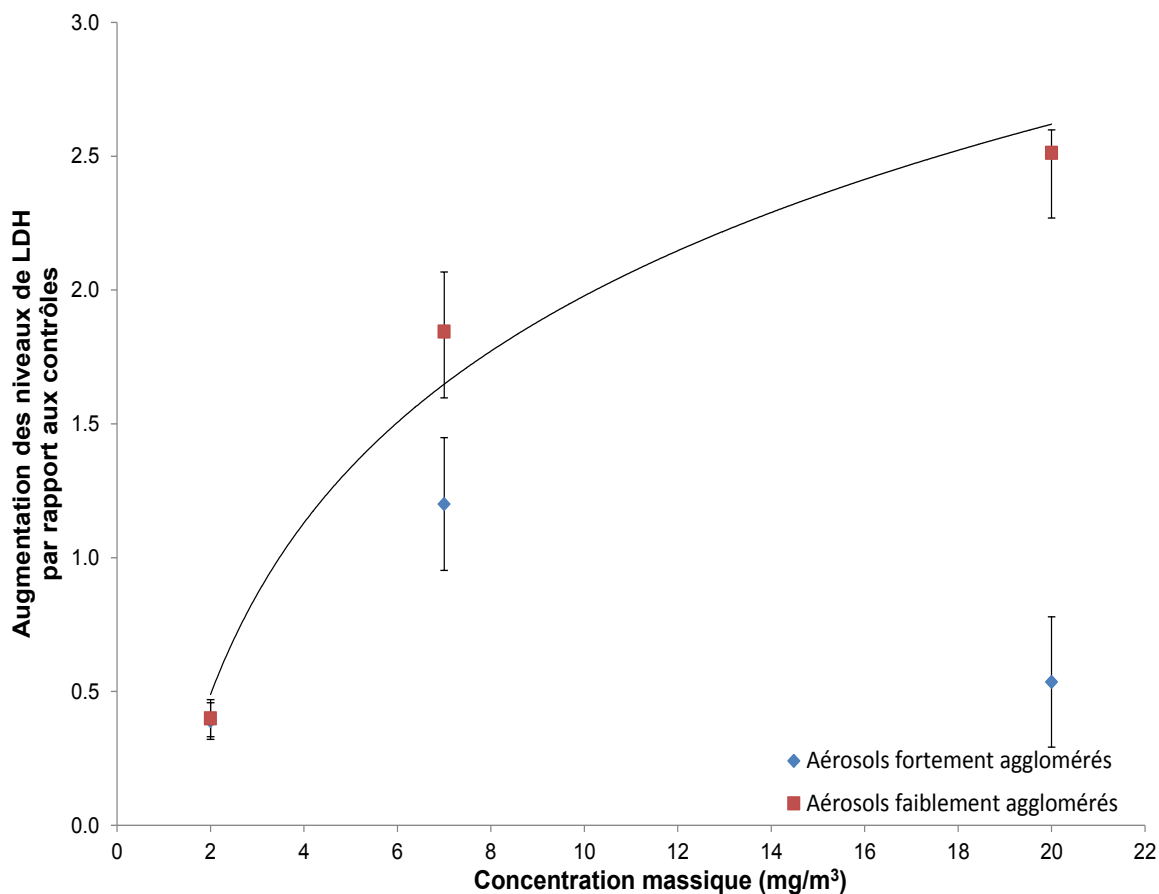
bonnes corrélations ($r = 0,9747$ et $r = 0,9983$) dans le cas de l'augmentation des niveaux de neutrophiles pour les aérosols faiblement et fortement agglomérés, respectivement. Quant aux relations avec la LDH et la 8-isoprostane, on remarque de bonnes corrélations ($r = 0,8958$ et $r = 0,9999$, respectivement) uniquement dans le cas des aérosols faiblement agglomérés. Aucune linéarité n'a été observée lorsque ces résultats ont été mis en relation avec la concentration en nombre (données non montrées).

Figure 4. Relation entre les augmentations de niveaux de neutrophiles dans les LBA de rats exposés aux NP de 5 nm et la concentration massique fonction de l'état d'agglomération



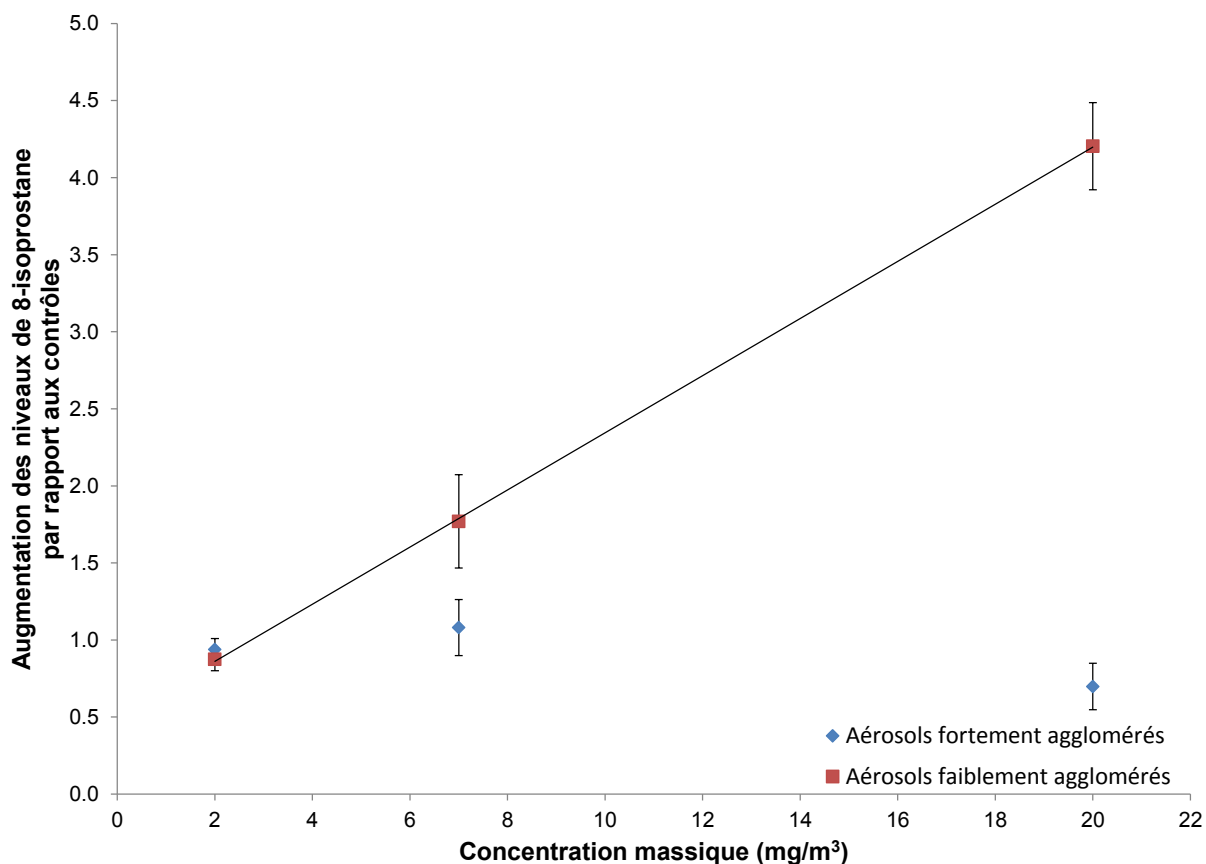
Relation entre la concentration massique fonction de l'état d'agglomération utilisée comme métrique d'exposition et le ratio d'augmentation des neutrophiles des rats exposés aux NP de TiO₂ de taille primaire 5 nm comparativement aux témoins. Chaque point représente les valeurs moyennes et l'erreur type (n = 6) sur la moyenne pour le nombre de neutrophiles provenant des LBA.

Figure 5. Relation entre les augmentations de niveaux de LDH dans les LBA de rats exposés aux NP de 5 nm et la concentration massique fonction de l'état d'agglomération



Relation entre la concentration massique fonction de l'état d'agglomération utilisée comme métrique d'exposition et le ratio d'augmentation des niveaux de LDH des rats exposés aux NP de TiO_2 de taille primaire 5 nm comparativement aux témoins. Chaque point représente les valeurs moyennes et l'erreur type ($n = 6$) sur la moyenne pour l'activité de la LDH mesurée dans les LBA.

Figure 6. Relation entre les augmentations de niveaux de 8-isoprostane dans les LBA de rats exposés aux NP de 5 nm et la concentration massique fonction de l'état d'agglomération



Relation entre la concentration massique fonction de l'état d'agglomération utilisée comme métrique d'exposition et le ratio d'augmentation des niveaux de 8-isoprostane des rats exposés aux NP de TiO₂ de taille primaire 5 nm comparativement aux témoins. Chaque point représente les valeurs moyennes et l'erreur type (n = 6) sur la moyenne pour la concentration en 8-isoprostane mesurée dans les LBA.

Chapitre 6 – Discussion générale

Les travaux expérimentaux présentés dans cette thèse portent sur l'évaluation de la toxicité pulmonaire des NP de TiO₂ en fonction de leur état d'agglomération. Ces travaux ont été effectués par inhalation sur un modèle animal de rats. L'inhalation est l'une des principales voies d'exposition en milieu de travail pour les NP. Bien que certaines études indiquent que la fraction de NP qui soit faiblement agglomérée (< 100 nm) en milieu de travail est faible (Curwing et Bertke, 2011; Lee *et coll.* 2011; Morfeld *et coll.* 2012), il semble que cette même fraction soit responsable de la translocation et de la biodistribution des NP tant au niveau systémique que pulmonaire (Oberdörster *et coll.* 2004; Elder *et coll.* 2006a; Kreyling *et coll.* 2009; Landsiedel *et coll.* 2012; Morfeld *et coll.* 2012). Il est donc pertinent de quantifier la fraction des NP faiblement agglomérée dans un aérosol et d'en évaluer sa toxicité pulmonaire. Cependant, le principal défi avec les NP d'oxyde métallique est de générer des aérosols faiblement agglomérés.

6.1 Développement de systèmes de génération et de caractérisation de nano-aérosols

Certains générateurs de NP disponibles commercialement peuvent générer des nano-aérosols à de très faibles granulométries (par exemple l'électrospray), mais échouent souvent à produire simultanément de fortes concentrations massiques pendant de longues périodes de temps (par

exemple 6 heures) (Schmoll *et coll.* 2009; Kim *et coll.* 2010). Dans la présente recherche, les systèmes que nous avons développés avec des NP de TiO₂ pour des expérimentations animales utilisant en parallèle une combinaison de différents générateurs sont prometteurs pour de futures expériences. Ils permettent d'obtenir, entre autres, un aérosol faiblement (diamètre médian < 100 nm) ou fortement aggloméré (> 100 nm), stable pendant au moins 6 heures pour une gamme de concentrations massiques (2, 7 et 20 mg/m³). De plus, l'emphase qui est mis sur la taille des agglomérats fait en sorte que ce modèle est hautement applicable à d'autres NP qui ont tendance à s'agglomérer dans les aérosols, notamment les oxydes de métaux et les nanotubes de carbone.

Par ailleurs, les travaux présentés dans cette thèse ont notamment montré que différentes techniques de génération, soient la nébulisation ou la dispersion à sec de nano-poudres de TiO₂, produisent de façon générale des types d'agglomérats distincts. La production de nano-aérosols de TiO₂ par la méthode de dispersion a produit des structures plus agglomérées avec des espaces vides entre les NP primaires comparativement à la nébulisation de suspensions de TiO₂ qui a donné des agglomérats compacts (Noël *et coll.* 2013a et 2013c). Collectivement, les données suggèrent que la taille et la structure des agglomérats peuvent varier en fonction de la taille initiale de la NP, de la méthode utilisée pour générer des aérosols ou selon les procédés industriels utilisés dans l'environnement de travail. De façon plus importante, ces travaux mettent en évidence les besoins d'une caractérisation qualitative et quantitative des agglomérats de NP ainsi que l'intégration de ce facteur dans l'analyse de la toxicité induite par les NP.

Étant donné que la taille des agglomérats est considérée comme un facteur clé ayant une influence sur la toxicité pulmonaire, ces différents systèmes de génération et de caractérisation de NP de TiO₂ ont permis de réaliser des études visant à documenter les relations entre les caractéristiques de la dose et les effets biologiques observés. Ces travaux novateurs en développement et en implantation de méthodes représentent ainsi une avancée et une contribution importante aux études *in vivo* sur les NP de TiO₂ (Noël *et coll.* 2012, 2013a et 2013c). En effet, les techniques de génération développées dans le cadre de cette recherche ont déjà été utilisées, en collaboration avec d'autres équipes, dans des projets d'envergure dont les résultats ont été publiés dans des revues scientifiques internationales (Mostofi *et coll.* 2012; Scarino *et coll.* 2012; Noël *et coll.* 2013b).

6.2 Toxicité pulmonaire induite par des nanoparticules de TiO₂ chez le rat

Les effets toxicologiques et la cinétique des NP sont complexes et impliquent une variété de facteurs, dont la voie et la dose d'exposition, les propriétés physico-chimiques et les interactions NP – cellules (Warheit, 2010). Les recherches portant sur les propriétés physico-chimiques des NP qui sont pertinentes quant à l'induction d'effets toxiques *in vivo* sont nombreuses (Warheit *et coll.* 2006, 2007a et b; Grassian *et coll.* 2007a et b; Ma-Hock *et coll.* 2009). En effet, plusieurs de ces études ont examiné les effets pulmonaires toxiques des NP de TiO₂ basées sur leurs habiletés pro-inflammatoires (Seaton *et coll.* 2010), alors qu'aucune

d'entre elles n'a évalué l'influence de la taille des agglomérats de NP, inférieure et supérieure à 100 nm, sur la toxicité pulmonaire en analysant également les réponses cytotoxiques et oxydantes. Or, l'état d'agglomération des NP est un facteur significatif qui détermine i) la taille réelle à laquelle se produit la biointeraction, facteur clé en lien avec la translocation au travers des barrières cellulaires, ii) le lieu de dépôt et iii) la rétention au niveau des voies respiratoires. Cette mesure est donc essentielle pour l'interprétation des données toxicologiques (Oberdörster, 2010).

Actuellement, peu de données sont disponibles sur le devenir des agglomérats de NP en milieu physiologique. Toutefois, le processus de dé-agglomération en milieu biologique peut être étudié par une caractérisation approfondie de l'aérosol inhalé, consistant à déterminer la distribution granulométrique des agglomérats de NP dans la zone respiratoire, puis en effectuant une comparaison de ces résultats avec la taille des agglomérats retrouvés dans l'environnement physiologique (tissus pulmonaires, macrophages, cellules épithéliales) à l'aide de la microscopie électronique à transmission (MET). À partir de NP de TiO₂ (20-30 nm), Morfeld *et coll.* (2012) ont ainsi montré que la taille des agglomérats de NP trouvés dans le tissu pulmonaire était similaire à celle des agglomérats dans les aérosols, ce qui suggère qu'il y avait peu ou pas de dé-agglomération dans le milieu physiologique. Bien qu'à ce sujet une seule étude par inhalation sur le TiO₂ ait été effectuée, la question à savoir si les NP inhalées sous forme de gros agglomérats se dé-agglomèrent en petits agglomérats, semblable à la taille primaire des NP est d'une importance primordiale, car cela a un impact sur leur possible translocation extra-pulmonaire et leur biodisponibilité systémique.

Cependant, ce phénomène d'agglomération ou de dé-agglomération des NP de TiO₂ *in vivo* peut dépendre de la taille des agglomérats, de leur structure, ainsi que de leur forme (Grassian *et coll.* 2007b) et doit être documenté davantage.

Nos travaux chez le rat ont montré qu'un nano-aérosol composé de NP TiO₂ de taille de départ de 5 nm à 7 mg/m³ inhalé sous forme de petits agglomérats (< 100 nm) entraîne une légère augmentation non significative des réponses cytotoxiques et oxydantes (Noël *et coll.* 2012), par contre ces augmentations sont significatives à 20 mg/m³ (Noël *et coll.* 2013c), ce qui suggère que ces petits agglomérats échappent à la surveillance des macrophages alvéolaires dans le poumon et ont un plus grand accès aux cellules et aux tissus pulmonaires. À 7 mg/m³, le nano-aérosol composé de plus gros agglomérats (> 100 nm) de ces mêmes NP a pour sa part été plus facilement phagocyté et a induit une réaction inflammatoire statistiquement significative dont l'intensité a été qualifiée de légère (Noël *et coll.* 2012). Ainsi, ces travaux ont montré que les réponses biologiques aux NP de TiO₂ peuvent dépendre à la fois de la concentration et de la dimension des agglomérats de NP.

À une concentration massique de 20 mg/m³, nos travaux confirment qu'une réponse inflammatoire aiguë (augmentation du nombre de neutrophiles) est induite suite à l'exposition des rats à des nano-aérosols composés de NP de TiO₂ inhalés sous forme de gros agglomérats (> 100 nm). Des effets de stress oxydants (concentration en 8-isoprostane) ont été notés suite à l'exposition aux nano-aérosols composés des mêmes NP mais sous une forme faiblement agglomérée (Noël *et coll.* 2013c). Dans l'ensemble, les résultats des deux derniers articles

indiquent qu'une exposition aiguë à de gros agglomérats de NP induit une faible réponse inflammatoire, réversible selon la littérature (Ferin *et coll.* 1992; Grassian *et coll.* 2007a et b; Johnston *et coll.* 2009; Ma-Hock *et coll.* 2009; Rossi *et coll.* 2010) et que ce type de nano-aérosol n'implique pas nécessairement les mêmes mécanismes que celui faiblement aggloméré, qui montre clairement l'induction de dommages cytotoxiques et oxydants. Basé sur la mesure du nombre de neutrophiles et des niveaux de cytokines inflammatoires, nos travaux indiquent également que les NP TiO₂ de taille de départ 10 – 30 nm induisent des effets pro-inflammatoires plus prononcés (Noël *et coll.* 2013c).

Pour les nano-aérosols faiblement agglomérés, nos travaux démontrent aussi un effet dépendant de la taille des NP de TiO₂. Nos données nous ont menés à formuler l'hypothèse que les plus petites NP peuvent subir une translocation extra-pulmonaire rapide une fois déposées dans les poumons en pénétrant plus efficacement dans les cellules, entraînant une cytotoxicité et diminuant l'interaction à l'interface NP — cellules. Nos résultats semblent aller dans le sens de cette hypothèse et suggèrent que les plus petites particules de 5 nm peuvent potentiellement poser de plus grands risques à la santé, particulièrement en ce qui a trait aux effets systémiques, comparativement aux NP de 10 – 30 et 50 nm (Noël *et coll.* 2013c). Ainsi, ces travaux suggèrent qu'à l'échelle nanométrique (1 à 100 nm), une différence de taille de départ des NP de TiO₂ peut influencer les effets toxicologiques surtout ceux en lien avec la cytotoxicité, qui serait associée à la pénétration intracellulaire des NP (Noël *et coll.* 2013c). En conséquence, malgré la dimension nanométrique des trois NP étudiées (5, 10 – 30 et 50 nm), elles n'étaient pas toutes équivalentes à induire de la cytotoxicité et du stress oxydant.

L'ensemble des résultats pour les dix expositions aiguës est résumé dans le Tableau III. Ce tableau montre, entre autres, que certaines cytokines ou biomarqueurs de cytotoxicité et de stress oxydant n'ont pas été décelés. Il est difficile de savoir si ceci est attribuable à une absence de réponse ou à un trop court délai entre l'exposition et le moment du sacrifice. Cependant, l'étude de Grassian *et coll.* (2007a) a dosé chez la souris les cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α immédiatement et 20 h après l'exposition à des NP de TiO₂ par voie d'inhalation à 7 mg/m³ et toutes ces cytokines avaient des valeurs en dessous de la limite de détection. Dans une seconde étude, Grassian *et coll.* (2007b) ont dosé ces mêmes cytokines 24 h post instillation. Ils ont observé aux doses moyennes et fortes des augmentations statistiquement significatives des cytokines IL-1 β , IL-6 et LDH par rapport au groupe témoin. Ces études montrent donc qu'il est possible de déceler des augmentations statistiquement significatives pour des cytokines dans des LBA 24 h post instillation. La cascade d'évènements biochimiques menant à l'induction de ces médiateurs est donc possible 24 h post exposition, possiblement en raison de l'instillation qui permet le dépôt d'une dose suffisante à l'organe cible. Bien que certains paramètres de toxicité semblent augmenter dans un court délai suite à l'exposition aux NP de TiO₂, plus d'études sont nécessaires pour évaluer si c'est une question de dose, de temps ou une combinaison des deux.

De plus, dans ces études, une caractérisation rigoureuse et continue des NP présentes dans les aérosols prélevés en zone respiratoire des animaux a été effectuée. Ceci a permis de prendre en compte, dans un premier temps, de l'ensemble des facteurs pouvant influencer les caractéristiques de l'aérosol généré (taux d'humidité, agrégation/agglomération pendant

l'expérimentation) et dans un deuxième temps, de l'influence des caractéristiques des aérosols inhalés, comme la distribution granulométrique, sur la réponse biologique mesurée. Toutefois, il existe toujours une incertitude associée aux résultats d'études toxicologiques celle-ci étant notamment attribuables à la variabilité biologique de même qu'aux incertitudes analytiques reliées aux différents biomarqueurs mesurés. Pour cette raison, la prudence s'impose toujours lors de l'interprétation de données issues d'une seule étude.

Dans cette lignée, une généralisation du comportement toxicologique des NP de TiO₂ à l'heure actuelle doit être abordée avec précaution. En effet, plusieurs études tant *in vivo* qu'*in vitro* ont démontré que la toxicité des NP de TiO₂ augmente avec une diminution de la taille de la NP (Kobayashi *et coll.* 2009; Zhang *et coll.* 2011). Selon la littérature, les plus petites NP ont une plus grande distribution tissulaire et systémique, sont internalisées dans les cellules de façon plus importante et ont un plus grand potentiel toxique (Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.* 2005a; Kreyling *et coll.* 2009; Landsiedel *et coll.* 2012). Toutefois, d'autres travaux ont mis en évidence qu'en plus de la taille, d'autres propriétés physico-chimiques des NP contribuaient également à la toxicité comme la taille des agglomérats, la phase cristalline et les caractéristiques de surface, incluant le revêtement (Grassian *et coll.* 2007a et b; Warheit *et coll.* 2006, 2007a et b). De fait, puisque les études *in vivo* utilisant une voie d'exposition physiologiquement représentative pour les NP de TiO₂ sont encore en nombre limité et montrent quelquefois une caractérisation incomplète, la prudence est de mise quant à la généralisation d'un comportement cinétique et toxicologique commun pour les NP de TiO₂.

Tableau III Résumé des résultats des 10 expositions aiguës aux NP de TiO₂

Paramètres de toxicité pulmonaire analysée dans les LBA	TiO ₂ 5 nm 2 mg/m ³		TiO ₂ 5 nm 7 mg/m ³		TiO ₂ 5 nm 20 mg/m ³		TiO ₂ 10-30 nm 20 mg/m ³		TiO ₂ 50 nm 20 mg/m ³	
	Dans l'aérosol D ₅₀ = 30 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 185 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 31 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 194 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 48 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 369 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 65 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 255 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 85 nm	Dans l'aérosol D ₅₀ = 321 nm
Compte cellulaire total	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
Nombre de macrophages	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
Nombre de neutrophiles	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
LDH	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8-isoprostane	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Concentration en protéines totales	-	-	-	-						
ALP	-	-	-	-						
Hème oxygénase - 1	-	-	-	-						
Glutathion	-	-	-	-						
MIP-1α	-	-	-	-						
MIP-3α					+	-	+	+	+	+
MCP-1	-	-	-	-						
IL-1α	-	-	-	-						
IL-1β										
IL-6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TNF-α	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IFN-γ					+	+	-	+	-	-
CXCL7					+	+	+	+	+	-
L-selectin					-	-	+	+	+	-
TIMP-1					-	-	+	+	-	-
CCL5					-	-	-	+	-	-
CX3CL1					-	-	-	+	-	-
sICAM-1					-	-	-	+	-	-

Case noire : biomarqueur non évalué

- : pas d'effet statistiquement significatif par rapport au groupe témoin

+ : augmentation statistiquement significative par rapport au groupe témoin ou ratio exposé/témoin supérieur à 1,2, donc une réponse positive, pour les cytokines suivantes : CCL5, CXCL7, TIMP-1, TNF-α, L-selectin, MIP-1α, MIP-3α, IL-1β, IL-6, CINC-3, CXCL1, sICAM, IFN-γ.

Les travaux présentés dans cette thèse sont originaux et permettent de répondre à un questionnement de la communauté scientifique en démontrant clairement l'importance de la taille de départ et celle des agglomérats de NP de TiO₂ sur la toxicité pulmonaire *in vivo*. Ces caractéristiques ont une influence significative sur la toxicocinétique et la toxicodynamique des NP. De plus, pris collectivement, les résultats de ces travaux convergent avec les mécanismes hypothétiques actuels de toxicité pulmonaire des NP, basés sur le paradigme de l'inflammation et du stress oxydant (Donaldson *et coll.* 2001; Donaldson et MacNee, 2001; Oberdörster *et coll.* 2005a; Xia *et coll.* 2006a et b; Scherbart *et coll.* 2011; Landsiedel *et coll.* 2012).

6.3 Relations dose-réponses pour les nanoparticules de TiO₂ de taille de départ 5 nm

Les expositions animales aux NP de TiO₂ de taille de départ de 5 nm effectuées à trois concentrations massiques permettent d'explorer des relations dose-réponse pour cette NP.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux révèle, en fonction de la concentration massique, une relation dose-dépendante pour la phagocytose par les macrophages alvéolaires, ainsi que le recrutement et l'activation des neutrophiles dans le cas d'une exposition à des nano-aérosols faiblement ou fortement agglomérés, alors qu'elle est associée à la cytotoxicité et au stress oxydant pour une exposition à de plus petits agglomérats (Figures 1, 2 et 3 - Chapitre 5,

pages 211; 213-214). Il semble que les différents types de toxicité induits par les aérosols faiblement ou fortement agglomérés à 7 et 20 mg/m³ soient fonction essentiellement de la taille des agglomérats qui sont en théorie principalement détectés par les macrophages alvéolaires à partir de 250 nm (Kanapilly *et coll.* 1982 ; Oberdörster *et coll.* 2000 ; Yang *et coll.* 2008 ; Geiser, 2010). Ces travaux indiquent aussi que la toxicité des NP de TiO₂ augmente de pair avec la concentration massique et corroborent les résultats d'autres études (Bermudez *et coll.* 2004; Ma-Hock *et coll.* 2009). Pour les six nano-aérosols générés à partir de la même NP de 5 nm, on remarque aussi que parmi les populations cellulaires recueillies dans les LBA, l'augmentation du nombre de neutrophiles est le premier effet statistiquement significatif observé (Figure 1 - Chapitre 5, page 211, Tableau III page 227). En effet, la réponse inflammatoire ressort distinctement des études ayant investigué la toxicité pulmonaire des NP de TiO₂ fortement agglomérés dans des aérosols. L'infiltration neutrophilique s'est rapidement démarquée comme étant caractéristique de cette réaction en plus d'un nombre élevé de macrophages contenant des NP (Ferin *et coll.* 1992; Grassian *et coll.* 2007a et b; Ma-Hock *et coll.* 2009; Van *et coll.* 2009; Rossi *et coll.* 2010; Halappanavar *et coll.* 2011). De fait, cette réponse a été mise en évidence chez différents rongeurs (rat et souris) ainsi qu'en utilisant différents types de NP de TiO₂ (taille de départ, phase cristalline et revêtement) démontrant que ces effets ne sont pas seulement spécifiques à l'espèce animale ou à l'échantillon de NP de TiO₂ étudié (Johnston *et coll.* 2009). Ainsi, les données de la littérature et nos résultats indiquent que l'activation et l'augmentation du nombre de neutrophiles dans les LBA de rongeurs exposés par inhalation à des NP de TiO₂ fortement agglomérés (> 100 nm) peuvent servir d'indicateur sensible et prédictif d'une réaction inflammatoire.

Bien que trois doses différentes aient été utilisées dans cette thèse pour exposer des rats par inhalation et que la plus faible dose, soit 2 mg/m^3 , n'ait pas induit d'effets pulmonaires significatifs ou prononcés par rapport au groupe témoin pour les paramètres qui ont été dosés, on ne peut se servir de ces résultats pour établir ou estimer un niveau (ou dose) sans effet nocif observé (NOAEL). En effet, l'objectif de cette thèse était d'évaluer l'influence de la taille de départ et de l'état d'agglomération des NP de TiO_2 sur la toxicité pulmonaire. Le devis de recherche expérimental n'a donc pas été conçu pour définir des doses seuils (NOAEL ou un niveau avec le plus petit effet nocif observé (LOAEL) et représente une limite à l'approche d'établissement de la relation dose-réponse. De fait, d'autres études ayant exposé des rats de façon similaire aux NP de TiO_2 pour des durées d'exposition subaiguë ou sub-chronique ont montré à cette même concentration de 2 mg/m^3 que la réplication cellulaire au niveau des bronches et des bronchioles terminales était un effet pulmonaire significatif (Bermudez *et coll.* 2004; Ma-Hock *et coll.* 2009). Ainsi, s'il existe une dose seuil où il n'y aurait pas d'effet nocif observé pour les NP de TiO_2 , celle-ci devrait se situer en dessous de 2 mg/m^3 et la LOAEL pourrait être de 2 mg/m^3 pour les NP de TiO_2 selon les études de Bermudez *et coll.* (2004) et de Ma-Hock *et coll.* (2009).

6.4 Mécanismes d'action hypothétiques des nanoparticules de TiO_2

Selon les données de la littérature, la toxicité des NP est associée à plusieurs facteurs, dont leur aire de surface, leur habilité à passer au travers de membranes cellulaires, leurs

interactions avec des structures subcellulaires (organelles) ainsi que leur habileté à activer les macrophages et les neutrophiles puis à stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Hubbs *et coll.* 2011). Par conséquent, il est pertinent d'étudier les interactions NP – cellule dans un modèle *in vivo* afin de mieux cerner les mécanismes d'action de ces NP. Bien que réalisés à des concentrations massiques réalistes pour des expositions animales, mais légèrement élevées relativement aux niveaux d'exposition susceptibles d'être rencontrés en milieu de travail (0,00247 à 4,99 mg/m³), les résultats obtenus ont une implication de nature mécanistique et servent à démontrer un principe, confirmant *in vivo* une partie des mécanismes d'action des NP (Curwin et Bertke, 2011; Lee *et coll.* 2011).

En se rapportant au paradigme basé sur l'inflammation et le stress oxydant, les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires sont les premières cellules des voies respiratoires à entrer en contact avec les particules inhalées (Donaldson *et coll.* 2008; Oberdörster *et coll.* 2005a). Cette interaction est donc un élément clé des mécanismes d'action des NP et s'explique au travers de différentes voies de signalisation intracellulaire (Donaldson *et coll.* 2003 et 2008; Donaldson et Stone, 2003; Oberdörster *et coll.* 2005a). Effectivement, à l'intérieur d'un macrophage, une première voie de signalisation serait mise en contribution via l'activation de la phagocytose par les NP, en tant que processus d'élimination. Une autre voie de signalisation peut mettre en cause des interactions de surface entre les NP et les cellules du poumon, notamment les cellules épithéliales, produisant du stress oxydant. Ces deux voies de signalisation, entre autres, mèneraient à une cascade d'évènements intracellulaires résultant en la libération de médiateurs pro-inflammatoires (voir Figure 2 – Chapitre 1, page 36)

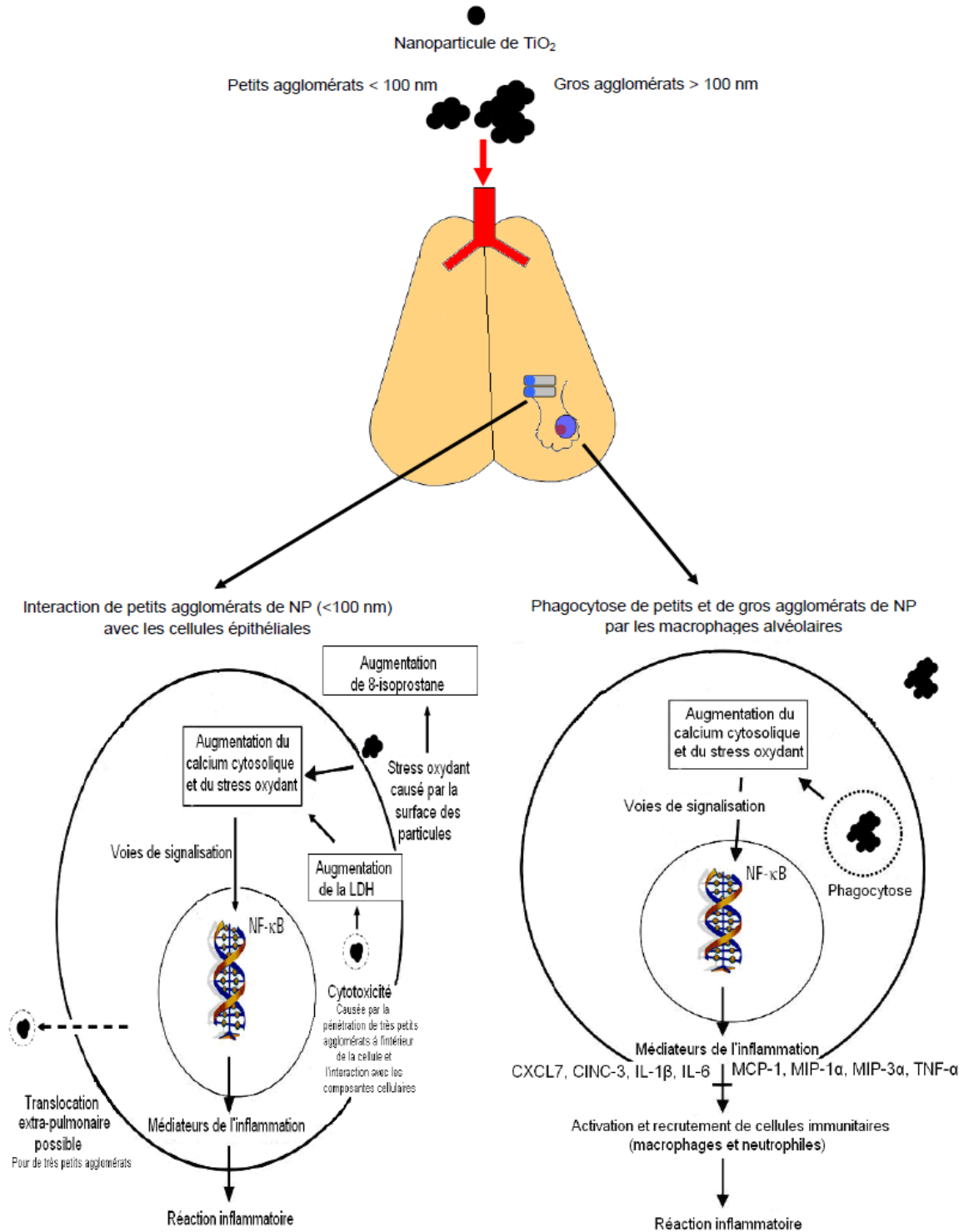
(Donaldson et Stone, 2003; Oberdörster *et coll.* 2005a). De plus, alors que l'activité phagocytaire par les macrophages alvéolaires est optimale pour les particules micrométriques, elle serait moins efficace pour les particules appartenant à l'échelle nanométrique (Takenaka *et coll.* 2001; Geiser *et coll.* 2008). En fonction de la taille (< 100 nm) et de la chimie de surface, des particules non parfaitement sphériques peuvent exercer de la toxicité en diffusant au travers de membranes cellulaires (Elder *et coll.* 2009; Seaton *et coll.* 2010). En effet, l'accès des NP à l'espace interstitiel est plus élevé comparativement aux particules plus grosses (Ferin *et coll.* 1992; Oberdörster *et coll.* 2005a; Kreyling *et coll.* 2009; Landsiedel *et coll.* 2012). Ainsi, la petite taille des NP signifie également que les interactions tissulaires et subcellulaires peuvent représenter d'autres éléments critiques de leurs mécanismes d'action (Hubbs *et coll.* 2011). De fait, les NP ou petits agglomérats (< 100 nm) qui ne sont pas efficacement phagocytés par les macrophages alvéolaires pourraient persister plus longtemps dans le tissu pulmonaire, interagir avec l'épithélium et même migrer par translocation vers des compartiments extra-pulmonaires (Oberdörster, 2001; Kreyling *et coll.* 2002).

De concert avec ces hypothèses, l'examen des données présentées dans cette thèse montre que la toxicité des NP de TiO₂ semble conduite par leurs natures oxydante et pro-inflammatoire ainsi que par leurs effets cytotoxiques dus, entre autres, à leur petite taille. En conséquence, on pourrait croire que les NP de TiO₂ exercent leur toxicité de manière spécifique à leur taille de départ et à celle des agglomérats. Ainsi, les petits agglomérats de NP de TiO₂ (< 100 nm) induiraient leur toxicité principalement par le biais de mécanismes impliquant i) les interactions de leur grande aire de surface avec les membranes cellulaires, décelables via des

indicateurs de stress oxydant; ii) la pénétration, en raison de leur petite taille, dans les cellules épithéliales pouvant être décelée par des marqueurs de cytotoxicité, et iii) par la translocation extra-pulmonaire, détectable par dosage dans des matrices biologiques, telles que le sang, la rate, le foie et les reins. Quant aux plus gros agglomérats de NP de TiO₂ (> 100 nm), leur toxicité serait produite via une autre voie de signalisation faisant appel, entre autres, à la phagocytose par les macrophages alvéolaires, à l'activation de ces derniers, au recrutement des neutrophiles et aux effets pro-inflammatoires visant à éliminer l'agression. Cette séquence d'évènements pour les aérosols fortement agglomérés se retrouve également dans de nombreuses autres études (Ferin *et coll.* 1992; Bermudez *et coll.* 2004; Grassian *et coll.* 2007a et b; Ma-Hock *et coll.* 2009; Van *et coll.* 2009; Rossi *et coll.* 2010; Halappanavar *et coll.* 2011; Lindberg *et coll.* 2012; McKinney *et coll.* 2012). En fait, ces données représentent, dans leur ensemble, un raffinement des mécanismes d'action hypothétiques actuels des NP (Figure 2 – Chapitre 1, page 36) et sont illustrées à la Figure 1 ci-après.

Figure 1. Mécanismes d'action hypothétiques de NP de TiO₂ en fonction de la taille des agglomérats

(Figure adaptée d'Oberdörster *et coll.* 2005a et de Donaldson *et coll.* 2012).



Cette figure illustre les mécanismes d'action hypothétiques des NP au travers de différentes voies de signalisation intracellulaires que peuvent emprunter les NP de TiO₂ en fonction de la taille résultante des agglomérats. Les gros agglomérats de NP (> 100 nm) seraient plus facilement détectés et phagocytés par les macrophages alvéolaires, initiant ainsi un début de réaction inflammatoire. Les plus petits agglomérats de NP (< 100 nm), pour leur part, échapperaient en partie aux mécanismes de défense et de clairance pulmonaire, leur permettant ainsi d'interagir avec les membranes cellulaires et d'induire des réponses de stress oxydant et de cytotoxicité. LDH : lactate déshydrogénase.

En résumé, ces travaux montrent pour la première fois la concordance entre les mécanismes d'action hypothétiques des NP et des résultats *in vivo* (Noël *et coll.* 2012 et 2013c). Par ailleurs, tel que suggéré par Seaton *et coll.* (2010), les recherches futures devraient chercher à comprendre les bases fondamentales en lien avec l'activité de surface ainsi que la taille des agglomérats et les interactions avec le matériel biologique, particulièrement les composantes intracellulaires.

6.5 Réflexion sur les métriques d'exposition pour les nanoparticules de TiO₂

Bien que le paradigme stress oxydant et inflammation puisse servir de base lors de l'évaluation toxicologique, l'ensemble des données de la littérature et celles présentées dans cette thèse appellent à une réflexion en matière d'analyse du risque. Une constatation inévitable nous mène à un questionnement portant sur l'adéquation des normes d'exposition en milieu de travail. De fait, si la nature de la substance et la masse ne sont plus suffisantes pour déterminer un niveau d'intervention pour les NP, puisqu'à cette dimension les

comportements cinétiques et toxiques différents, comment est-il possible de concilier les informations toxicologiques pour les substances de taille fine avec celle de taille ultrafine? (Gwinn et Vallyathan, 2006; Stone *et coll.* 2007) De fait, une nouvelle façon d'appréhender le principe de la dose d'exposition découle des travaux de recherche en nanotoxicologie, qui ne se fient plus uniquement à la traditionnelle concentration massique, mais qui envisagent plutôt de considérer d'autres paramètres physiques tels que : la surface totale de la particule, le nombre, le volume, etc. (Oberdörster, 2001; Oberdörster *et coll.* 2005a; Stoeger *et coll.* 2006; Warheit *et coll.* 2006; Donaldson et Seaton 2007; Wittmaack, 2007; Sager *et coll.* 2008; Pauluhn, 2009b, 2010 et 2011). En fait, les données probantes justifiant l'utilisation d'une métrique plutôt qu'une autre sont toujours manquantes dans la littérature. Au meilleur de notre connaissance, il n'existe pas de consensus sur la mesure la plus précise pour exprimer la dose d'exposition aux NP. Beaucoup de travaux menés sur les NP d'oxyde métallique (Oberdörster, 2001; Oberdörster *et coll.* 2005a; Monteiller *et coll.* 2007), semblent indiquer que l'aire de surface totale est la mesure la plus appropriée pour faire une corrélation avec l'inflammation pulmonaire (mesurée par le nombre de neutrophiles des LBA) chez le rat. L'infiltration de neutrophiles induite par les NP semble donc être le critère le plus sensible pour définir le seuil d'une réaction inflammatoire (Pauluhn, 2011). Toutefois, la métrique représentée par la surface totale n'a pas été validée pour d'autres types d'effets comme la cytotoxicité, le stress oxydant ou la translocation (Hervé-Bazin, 2007). Il est à noter que l'aire de surface, en tant que métrique d'exposition, n'a pas été étudiée comme telle dans cette thèse, l'emphase a plutôt été mise sur l'état d'agglomération dans les aérosols et la taille primaire des NP. En effet, d'autres propriétés d'intérêt toxicologique, notamment la structure cristalline et l'état

d'agglomération des NP, pourraient également être déterminantes quant à l'induction de dommages pulmonaires autres que l'inflammation.

De prime abord, il est important de trouver un critère commun pour comparer les données de toxicité provenant de différentes études. De façon conventionnelle, la métrique basée sur la masse représente ce dénominateur commun pour les expositions par inhalation (Pauluhn, 2009b). Toutefois, il est peu probable que les effets des NP d'oxyde métallique soient la conséquence unique de leur masse. En effet, la taille des agglomérats de NP représente la dimension effective qui délimite la surface interagissant avec le matériel biologique (Donaldson *et coll.* 2012). Pour cette dernière raison et en plus du fait que l'agglomération des NP de TiO₂ survient lors de sa génération en aérosol, il est justifié d'utiliser ou d'étudier la distribution granulométrique en combinaison avec la masse pour exprimer la dose des NP de TiO₂. En effet, les données de la littérature semblent montrer qu'il ne faut plus considérer une NP comme une entité seule, mais bien comme une somme d'attributs particuliers qui dirigent la réponse toxicologique une fois en milieu physiologique (Donaldson *et coll.* 2012; Donaldson et Seaton, 2012).

Dans cette lignée, les études fondamentales comme celles présentées dans cette thèse cherchent tout d'abord à étudier les mécanismes de toxicité en fonction de la taille de départ et celle des agglomérats des NP de TiO₂ pour ensuite proposer des pistes de recherche intéressantes quant aux métriques qui semblent les plus adéquates et biologiquement

pertinentes pour l'évaluation de l'exposition professionnelle et l'analyse du risque. Selon nos résultats (Noël *et coll.* 2012 et 2013c), il y a une relation dose-dépendante linéaire entre le nombre de neutrophiles dans les LBA et la concentration massique (Figure 4 – Chapitre 5, page 216). Cependant, il semble que l'utilisation de la concentration massique seule ne soit pas suffisante pour discriminer les effets cytotoxiques et oxydants liés à l'état d'agglomération dans l'aérosol. Effectivement, une métrique basée uniquement sur la masse ne peut distinguer ces deux types d'effets (Figure 2 – Chapitre 5, page 213). Quant à l'interprétation des données sur la base de la concentration en nombre seule, elle devrait également se faire avec prudence, car l'utilisation de cette mesure ne permet pas de distinguer entre les NP individuelles et celles se regroupant en de gros agglomérats et donc entre les effets dus à la répartition globale de la taille des particules dans l'aérosol et ceux qui se produisent en raison de la taille unique des particules aux extrémités de la distribution. Par contre, les données de la mesure de la distribution granulométrique peuvent permettre une discrimination plus mécaniste des effets toxiques pulmonaires basés sur la dimension des agglomérats. Dans cette optique, la masse, utilisée conjointement ou de manière intégrée avec la distribution granulométrique des NP, donne des pistes de recherche intéressantes. En effet, les corrélations entre les effets toxiques et cette métrique combinée utilisée pour exprimer la dose montrent que la meilleure corrélation ($r = 0,9983$) pour les aérosols fortement agglomérés est faite avec le nombre de neutrophiles retrouvé dans les LBA (Figure 4 – Chapitre 5, page 216), alors que la 8-isoprostane est le biomarqueur le mieux corrélé avec l'exposition aux aérosols faiblement agglomérés ($r = 0,9999$) (Figure 6 – Chapitre 5, page 218). De plus, ces figures montrent qu'il n'y a pas de relation linéaire entre l'exposition aux aérosols fortement agglomérés et les mesures de LDH et de 8-isoprostane. Ces résultats suggèrent que l'utilisation uniquement de la

masse comme métrique d'exposition ne permet pas de prédire avec fidélité les effets attendus puisque ces derniers dépendent, pour une même masse, de la distribution granulométrique des particules.

Étant donné que nous avons utilisé seulement trois doses, il y a plusieurs limites à l'interprétation de ces courbes dose-réponses. Toutefois, l'ensemble de ces données semble indiquer que la mesure de la masse conjointement avec la distribution granulométrique dans les aérosols peut être utilisée comme métrique pour évaluer les effets des NP comme le TiO_2 . De plus, comparativement à l'aire de surface, l'avantage d'utiliser cette métrique réside principalement dans le fait que l'on conserve l'utilisation de la masse, dénominateur commun de toutes les différentes substances chimiques. Ainsi, comme le montrent ces résultats intéressants, plus de recherches basées sur des expositions chroniques sont nécessaires sur la combinaison de propriétés ou de métriques pouvant représenter une mesure globale plus intégrée et donc plus appropriée pour exprimer la dose des NP.

Chapitre 7 - Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de constater dans un premier temps, que la taille et la structure des agglomérats de NP de TiO₂ peuvent varier en fonction de la taille initiale de la NP ainsi que de la méthode utilisée pour générer des aérosols, dans un deuxième temps, que la taille initiale des NP de TiO₂ et leur état d'agglomération dans les aérosols sont des déterminants essentiels des réponses pulmonaires à caractères inflammatoire, cytotoxique et oxydant. Les expositions aiguës aux NP de TiO₂ inhalées chez le rat sous forme de gros agglomérats (> 100 nm) induisent principalement une réponse inflammatoire aiguë, mesurée par une augmentation du nombre de neutrophiles, tandis que les expositions aux plus petits agglomérats (< 100 nm) produisent de plus des dommages de natures cytotoxiques et oxydantes mesurés dans les LBA. Ces résultats indiquent que les modes de toxicité des NP de TiO₂ sont différents selon qu'elles soient inhalées sous deux états distincts d'agglomération, inférieur ou supérieur à 100 nm. De plus, ces études indiquent qu'il peut y avoir un effet de la taille primaire des NP. Les petites NP (5 nm) peuvent provoquer une plus grande cytotoxicité en pénétrant plus facilement dans les cellules, réduisant ainsi leur interaction avec la membrane cellulaire à l'interface NP — cellule. En outre, les NP dont la taille était de 10-30 nm ont induit les effets pro-inflammatoires les plus prononcés. Les effets toxiques des NP de TiO₂ sont donc dépendants de la taille initiale de la NP, de la taille des agglomérats dans les aérosols et de la concentration d'exposition. De plus, nos résultats sont les premiers à appuyer *in vivo* la théorie sous-jacente aux mécanismes d'action hypothétiques des NP. Également, l'ensemble de ces données semble indiquer que la masse, utilisée de manière intégrée avec la

distribution granulométrique des NP dans les aérosols, peut représenter une métrique potentielle pour des NP comme le TiO₂. De façon plus importante, le travail significatif effectué dans cette thèse pour générer et caractériser les nano-aérosols, a permis de mettre en évidence le rôle de l'état d'agglomération des NP dans le processus toxicologique et le développement d'effets nocifs faisant suite à des expositions aiguës.

Dans un contexte de recherche en santé au travail cherchant à identifier quelle(s) propriété(s) physico-chimique(s) des NP ou quelle(s) caractéristique(s) de l'aérosol généré est responsable de la toxicité, des études mettant l'accent sur une caractérisation rigoureuse, comme celle-ci, sont essentielles et constituent l'une des premières étapes de l'évaluation du continuum exposition – effets des NP. Ces travaux contribuent donc à l'acquisition de nouvelles données biologiques sur les NP de TiO₂ visant à mieux documenter le profil toxicologique et les interactions biologiques de ces NP, permettant ainsi une meilleure évaluation du risque. L'élaboration de stratégies fiables et validées pour caractériser l'exposition aux NP et leurs effets sur la santé humaine est incontournable, compte tenu des développements importants attendus du côté des nanotechnologies au niveau mondial.

Les pistes de recherche soulevées par ces études prises conjointement avec les autres études faites de façon subaiguë ou sub-chronique sur le sujet (Bermudez *et coll.* 2004; Ma-Hock *et coll.* 2009; Van *et coll.* 2009) permettent de croire qu'il y a lieu d'étudier plus en profondeur la toxicité pulmonaire des NP de TiO₂. En effet, les réponses globales observées pour les

différents nano-aérosols, ainsi que l'effet de la taille primaire des NP, doivent être validées dans des études futures incorporant des doses multiples, des temps d'exposition variés et différentes phases cristallines de TiO₂. De plus, afin de mieux comprendre l'influence de ces facteurs sur la cinétique et les mécanismes de toxicité de ces NP, les effets systémiques et la translocation extra-pulmonaire doivent également être évalués.

L'extrapolation des données de l'animal à l'humain doit se faire avec prudence. Cependant, puisque les NP de TiO₂ semblent induire divers effets pulmonaires chez le rat, il peut être judicieux de recommander que des mesures de protection individuelles et collectives visant à prévenir le développement de maladies pulmonaires professionnelles chez les travailleurs soient adoptées, et ce, en attendant que des données toxicologiques supplémentaires sur ces NP soient recueillies.

Bibliographie

Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**, 593-623.

Agence Française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET). (2006). Rapport: "Les nanomatériaux effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement." 248 pp.

Agence Française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET). (2008). Rapport: "Les nanomatériaux Sécurité au travail." 247 pp.

Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., and Hong, Y. (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **233**, 404-410.

Alessandrini, F., Schulz, H., Takenaka, S., Lentner, B., Karg, E., Behrendt, H., and Jakob, T. (2006). Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 824-830.

Asgharian, B., and Price, O. T. (2007). Deposition of ultrafine (nano) particles in the human lung. *Inhal Toxicol* **19**, 1045-1054.

Ayres, J. G., Borm, P., Cassee, F. R., Castranova, V., Donaldson, K., Ghio, A., Harrison, R. M., Hider, R., Kelly, F., Kooter, I. M., Marano, F., Maynard, R. L., Mudway, I., Nel, A., Sioutas, C., Smith, S., Baeza-Squiban, A., Cho, A., Duggan, S., and Froines, J. (2008). Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential--a workshop report and consensus statement. *Inhal Toxicol* **20**, 75-99.

Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El, G. F., and Coglianò, V. (2006). Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol* **7**, 295-296.

Baggs, R. B., Ferin, J., and Oberdorster, G. (1997). Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol* **34**, 592-597.

Balbus, J. M., Maynard, A. D., Colvin, V. L., Castranova, V., Daston, G. P., Denison, R. A., Dreher, K. L., Goering, P. L., Goldberg, A. M., Kulinowski, K. M., Monteiro-Riviere, N. A., Oberdorster, G., Omenn, G. S., Pinkerton, K. E., Ramos, K. S., Rest, K. M., Sass, J. B.,

Silbergeld, E. K., and Wong, B. A. (2007). Meeting report: hazard assessment for nanoparticles--report from an interdisciplinary workshop. *Environ Health Perspect* **115**, 1654-1659.

Behnajady, M. A., Modirshahla, N., Shokri, M., Elham, H., and Zeininezhad, A. (2008). The effect of particle size and crystal structure of titanium dioxide nanoparticles on the photocatalytic properties. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **43**, 460-467.

Bermudez, E., Mangum, J. B., Asgharian, B., Wong, B. A., Reverdy, E. E., Janszen, D. B., Hext, P. M., Warheit, D. B., and Everitt, J. I. (2002). Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmented titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* **70**, 86-97.

Bermudez, E., Mangum, J. B., Wong, B. A., Asgharian, B., Hext, P. M., Warheit, D. B., and Everitt, J. I. (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* **77**, 347-357.

Bérubé, K., Balharry, D., Sexton, K., Koshy, L., and Jones, T. (2007). Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 1044-1050.

Boutou-Kempf, O., Marchand, J. L., Radauceanu, A., Witschger, O., and Imbernon, E. (2011). Development of a French epidemiological surveillance system of workers producing or handling engineered nanomaterials in the workplace. *J Occup Environ Med* **53**, S103-S107.

Brouwer, D. H., Gijsbers, J. H., and Lurvink, M. W. (2004). Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *Ann Occup Hyg* **48**, 439-453.

Brown, D. M., Wilson, M. R., MacNee, W., Stone, V., and Donaldson, K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**, 191-199.

Castranova V. (2011). Overview of current toxicological knowledge of engineered nanoparticles. *J Occup Environ Med* **53**:S14-S17.

Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Yuan, H., Zhao, F., Liu, R., Chang, X., Gao, X., Wang, T., Jia, G., Ye, C., Chai, Z., and Zhao, Y. (2008). Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: nanotoxicity has susceptible population. *Environ Sci Technol* **42**, 8985-8992.

Cho, W. S., Duffin, R., Poland, C. A., Howie, S. E., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I. L., and Donaldson, K. (2010). Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* **118**, 1699-1706.

Choi, H. S., Ashitate, Y., Lee, J. H., Kim, S. H., Matsui, A., Insin, N., Bawendi, M. G., Semmler-Behnke, M., Frangioni, J. V., Tsuda, A. (2010). Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol* **28**: 1300-1304.

Chopra, M., Reuben, J.S., Sharma, A.C. (2009). Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. *Exp Biol Med* **234**: 361-371.

Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37-44.

Coudray, N., Dieterlen, A., Roth E., and Trouvé, G. (2009). Density measurement of fine aerosol fractions from wood combustion sources using ELPI ditributions and image processing techniques. *Fuel* **88**, 947-954.

Curwin, B., and Bertke, S. (2011). Exposure characterization of metal oxide nanoparticles in the workplace. *J Occup Environ Hyg* **8**, 580-587.

DeCarlo, P.F., Slowik, J.G., Worsnop, D.R., Davidovits, P. and Jimenez, J.L. (2004). Particle morphology and density characterization by combined mobility and aerodynamic diameter measurements. Part 1: Theory. *Aerosol Sci Technol* **38**, 1185-1205.

Dekati Ltd. (2003). Electrical Low Pressure Impactor User Manuel version 4.0.

Dick, C. A., Brown, D. M., Donaldson, K., and Stone, V. (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* **15**, 39-52.

Diebold, U. (2003). The surface science of titanium dioxide. *Surface Science Reports* **48**: 53-229.

Donaldson, K., Beswick, P. and Gilmour, P. (1996) Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Tox Lett* **88**, 293-298.

Donaldson, K., Li, X. et MacNee, W. (1998). Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* **29**, 553-560.

Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., and MacNee, W. (2001). Ultrafine particles. *Occup Environ Med* **58**, 211-6, 199.

Donaldson, K., and MacNee, W. (2001). Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *Int J Hyg Environ Health* **203**, 411-415.

Donaldson, K., and Stone, V. (2003). Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* **39**, 405-410.

Donaldson, K., Stone, V., Borm, P. J., Jimenez, L. A., Gilmour, P. S., Schins, R. P., Knaapen, A. M., Rahman, I., Faux, S. P., Brown, D. M., and MacNee, W. (2003). Oxidative stress and

calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med* **34**, 1369-1382.

Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., and Borm, P. J. (2004). *Nanotoxicology. Occup Environ Med* **61**, 727-728.

Donaldson, K., and Borm, P. (2007). *Particle toxicology*, CRC Press, Florida, USA, 434 pp.

Donaldson, K., and Seaton, A. (2007). The Janus faces of nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* **7**, 4607-4611.

Donaldson, K., Borm, P. J., Oberdorster, G., Pinkerton, K. E., Stone, V., and Tran, C. L. (2008). Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: the key role of the proximal alveolar region. *Inhal Toxicol* **20**, 53-62.

Donaldson, K., Schinwald, A., Murphy, F., Cho, W. S., Duffin, R., Tran, L., and Poland, C. (2012). The Biologically Effective Dose in Inhalation Nanotoxicology. *Acc Chem Res*. DOI : 10.1021/ar300092y

Donaldson, K., and Seaton, A. (2012). A short history of the toxicology of inhaled particles. *Part Fibre Toxicol* **9**, 13.

Dorries, A.M. and Valberg, P.A. (1992). Heterogeneity of phagocytosis for inhaled versus instilled material. *AM Rev Respir Dis* **146**, 831-837.

Dutta, D., Sundaram, S. K., Teeguarden, J. G., Riley, B. J., Fifield, L. S., Jacobs, J. M., Addleman, S. R., Kaysen, G. A., Moudgil, B. M., and Weber, T. J. (2007). Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sci* **100**, 303-315.

Elder, A., Gelein, R., Silva, V., Feikert, T., Opanashuk, L., Carter, J., Potter, R., Maynard, A., Ito, Y., Finkelstein, J., and Oberdorster, G. (2006a). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* **114**, 1172-1178.

Elder, A., and Oberdorster, G. (2006b). Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clin Occup Environ Med* **5**, 785-796.

Elder, A., Vidyasagar, S., and DeLouise, L. (2009). Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Wiley Interdiscip.Rev Nanomed.Nanobiotechnol.* **1**, 434-450.

Ferin, J., Oberdorster, G., and Penney, D. P. (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**, 535-542.

Fischer, H. C., and Chan, W. C. (2007). Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 565-571.

Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., and Sundblad, A. (2005). Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* **298**, 315-322.

Friedlander, S. K. (2000). *Smoke, dust and haze*. 2ième édition, John Wiley & Sons, New-York, 338 pp.

Fuchs, N. A. and Sutugin, A. G. (1966). Generation and use of monodisperse aerosols. Aerosol Science, C.N. Davies. Ed. Academic Press, New York.

Garnett, M. C., and Kallinteri, P. (2006). Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup Med (Lond)* **56**, 307-311.

Geiser, M., Schurch, S., and Gehr, P. (2003). Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. *J Appl Physiol* **94**, 1793-1801.

Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im, H., V, Heyder, J., and Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* **113**, 1555-1560.

Geiser, M., Casaulta, M., Kupferschmid, B., Schulz, H., Semmler-Behnke, M., and Kreyling, W. (2008). The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**, 371-376.

Geiser, M. (2010). Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* **23**, 207-217.

Geraets, L., Oomen, A. G., Schroeter, J. D., Coleman, V. A., and Cassee, F. R. (2012). Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study. *Toxicol Sci* **127**, 463-473.

Gojova, A., Guo, B., Kota, R. S., Rutledge, J. C., Kennedy, I. M., and Barakat, A. I. (2007). Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect* **115**, 403-409.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., and Osborne, B.A., 2000. *Immunologie le cours de Janis Kuby*. W.H. Freeman and Company, New-York and Basingstoke, 660 pp.

Grassian, V. H., O'shaughnessy, P. T., mcakova-Dodd, A., Pettibone, J. M., and Thorne, P. S. (2007a). Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect* **115**, 397-402.

Grassian, V. H., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J. M., O'Shaughnessy, P. T. and Thorne, P. S. (2007b). Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicol* **1**, 211-226.

Glignouski, S., Van Elteren, J. T. and Grggic, I. (2008). A multi-element mapping approach for size-segregated atmospheric particles using laser ablation ICP-MS combined with image analysis. *Sci Total Environ* **407**, 594-602.

Gurr, J. R., Wang, A. S., Chen, C. H., and Jan, K. Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* **213**, 66-73.

Gwinn, M. R., and Vallyathan, V. (2006). Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect* **114**, 1818-1825.

Hagens, W. I. , Oomen, A. G., de Jong, W. H., Cassee, F. R., Sips, A. J. A. M. (2007). What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Reg Tox and Pharmacol* **49**, 217-229.

Halappanavar, S., Jackson, P., Williams, A., Jensen, K. A., Hougaard, K. S., Vogel, U., Yauk, C. L., and Wallin, H. (2011). Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. *Environ Mol Mutagen* **52**, 425-439.

Hervé-Bazin, B. (2007). *Les nanoparticules un enjeu majeur pour la santé au travail?* EDP Sciences, France, 701 pp.

Hester, R. E., Harisson, R. M. (2007). *Nanotechnology Consequences for human health and the environment.* The royal society of chemistry, RSC Publishing, United Kingdom, 134 pp.

Hinds, W.C. (1999). *Aerosol Technology – Properties, Behavior and Measurement of Airborne Particles.* Wiley-Interscience, 483 pp.

Heinrich, U., Fuhst, R., Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Koch, W., and Levsen, K. (1995). Chronic inhalation exposure of Wistar rats and 2 different strains of mice to diesel-engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* **7**, 533–556.

Ho, M., Wu, K. Y., Chein, H. M., Chen, L. C., and Cheng, T. J. (2011). Pulmonary toxicity of inhaled nanoscale and fine zinc oxide particles: mass and surface area as an exposure metric. *Inhal Toxicol* **23**, 947-956.

Hoet, P. H., Bruske-Hohlfeld, I., and Salata, O. V. (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* **2**, 12.

Höhr, D., Steinfartz, Y., Schins, R. P., Knaapen, A. M., Martra, G., Fubini, B., and Borm, P. J. (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health* **205**, 239-244.

Holsapple, M. P., Farland, W. H., Landry, T. D., Monteiro-Riviere, N. A., Carter, J. M., Walker, N. J., and Thomas, K. V. (2005). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicol Sci* **88**, 12-17.

Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Benkovic, S. A., Harkema, J., Sriram, K., Schwegler-Berry, D., Goravanahally, M. P., Nurkiewicz, T. R., Castranova, V., and Sargent, L. M. (2011). Nanotoxicology--a pathologist's perspective. *Toxicol Pathol* **39**, 301-324.

Hussain, S., Boland, S., Baeza-Squiban, A., Hamel, R., Thomassen, L. C., Martens, J. A., Billon-Galland, M. A., Fleury-Feith, J., Moisan, F., Paireon, J. C., and Marano, F. (2009). Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* **260**, 142-149.

Iavicoli, I., Lesco, V., Bergamaschi, A. (2012). Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles : a review of *in vivo* studies. *J Nanomater* ID 964381, 36 pp. Doi : 10.1155/2012/964381

Industries Canada [En ligne]. Répertoires d'entreprises pour les nanotechnologies [Modifié le 2011/11/08; cité le 2013/04/23]. Disponible: <http://www.ic.gc.ca/eic/site/aimb-dgami.nsf/fra/03503.html>.

International agency for research on cancer (IARC). (2006). Titanium dioxide group 2B Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Monographs Volume 93*, 193-214.

Disponible : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/mono93-7A.pdf>

Jacobsen, N. R., Moller, P., Jensen, K. A., Vogel, U., Ladefoged, O., Loft, S., and Wallin, H. (2009). Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Part Fibre Toxicol* **6**, 2.

Jankovic, J. T., Zontek, T. L., Ogle, B. R., Hollenbeck, S. M. (2010). Characterizing Aerosolized Particulate as Part of a Nanoprocess Exposure Assessment. *Int J Occup Environ Health* **16**, 451–457.

Janssen, Y. M., Marsh, J. P., Driscoll, K. E., Borm, P. J., Oberdorster, G., and Mossman, B. T. (1994). Increased expression of manganese-containing superoxide dismutase in rat lungs after inhalation of inflammatory and fibrogenic minerals. *Free Radic Biol Med* **16**, 315-322.

Jiang, J., Oberdorster, G., Elder, A., Gelein, R., Mercer, P., and Biswas, P. (2008). Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase? *Nanotoxicology* **2**, 33-42.

Jiang, W., Kim, B. Y., Rutka, J. T., and Chan, W. C. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol.* **3**, 145-150.

Johnston, H. J., Hutchison, G. R., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., and Stone, V. (2009). Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol* **6**, 33.

Kaewamatawong, T., Shimada, A., Okajima, M., Inoue, H., Morita, T., Inoue, K., and Takano, H. (2006). Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol Pathol* **34**, 958-965.

Kanapilly, G. M., Wolff, R. K., DeNee, P. B., and McClellan, R. O. (1982). Generation, characterization and inhalation deposition of ultrafine aggregate aerosols. *Ann Occup Hyg* **26**, 77-91.

Kanj, R. S., Kang, J. L., Castranova, V. (2005). Measurement of the release of inflammatory mediators from rat alveolar macrophages and alveolar type II cells following lipopolysaccharide or silica exposure: a comparative study. *J Toxicol Environ Health A* **68**: 187-205.

Kim, H. R., Andrieux, K., Gil, S., Taverna, M., Chacun, H., Desmaele, D., Taran, F., Georjgin, D., and Couvreur, P. (2007). Translocation of poly(ethylene glycol-co-hexadecyl)cyanoacrylate nanoparticles into rat brain endothelial cells: role of apolipoproteins in receptor-mediated endocytosis. *Biomacromolecules* **8**, 793-799.

Kim, S. C., Chen, D. R., Qi, C., Gelein, R. M., Finkelstein, J. N., Elder, A., Bentley, K., Oberdorster, G., and Pui, D. Y. (2010). A nanoparticle dispersion method for in vitro and in vivo nanotoxicity study. *Nanotoxicology* **4**, 42-51.

Klaassen, C. D. (2001). *Casarett and Doull's Toxicology The basic science of poisons*. Sixth Edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division, USA, 1236 pp.

Kobayashi, N., Naya, M., Endoh, S., Maru, J., Yamamoto, K., and Nakanishi, J. (2009). Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology* **264**, 110-118.

Koike, E. and Kobayashi, T. (2006). Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere* **65**, 946-951.

Kondej, D., and Sosnowski, T. R. (2010). Aerosol generation and identification for model studies of particle-lung interactions. *Int J Occup Saf Ergon* **16**, 41-48.

Kreyling, W. G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdorster, G., and Ziesenis, A. (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1513-1530.

Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Seitz, J., Scymczak, W., Wenk, A., Mayer, P., Takenaka, S., and Oberdorster, G. (2009). Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol* **21 Suppl 1**, 55-60.

Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., and Moller, W. (2012). Differences in the Biokinetics of Inhaled Nano- versus Micrometer-Sized Particles. *Acc Chem Res*. DOI : 10.1021/ar300043r

Kurath, M. and Maasen, S. (2006). Toxicology as a nanoscience? – Disciplinary identities reconsidered. *Part fibre Toxicol* **3**, 6 doi:10.1186/1743-8977-3-6.

Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Haussmann, H. J., van, R. B., Kayser, M., and Wiench, K. (2012). Inhalation studies for the safety assessment of nanomaterials: status quo and the way forward. *Wiley Interdiscip.Rev Nanomed.Nanobiotechnol.* **4**, 399-413.

Lechner, M. D. and Mächtle, W. (1999). Determination of the particle size distribution of 5-100-nm nanoparticles with the analytical ultracentrifuge: consideration and correction of diffusion effects. *Progr Colloid Polym Sci* **113**, 37-43.

Lee, J. H., Kwon, M., Ji, J. H., Kang, C. S., Ahn, K. H., Han, J. H., and Yu, I. J. (2011). Exposure assessment of workplaces manufacturing nanosized TiO₂ and silver. *Inhal Toxicol* **23**, 226-236.

Lehnert, B. E., Ortiz, J. B., London, J. E., Valdez, Y. E., Cline, A. F., Sebring, R. J., Tietjen, G. F. (1990). Migratory behaviors of alveolar macrophages during the alveolar clearance of light to heavy burdens of particles. *Exp Lung Res* **16**, 451-479.

Leppänen, M., Korpi, A., Miettinen, M., Leskinen, J., Torvela, T., Rossi, E.M., Vanhala, E., Wolff, H., Alenius, H., Kosma, V.M., Joutsensaari, J., Jokiniemi, J., Pasanen, P. (2011). Nanosized TiO₂ caused minor airflow limitation in the murine airways. *Arch Toxicol* **85**, 827-839.

Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* **4**, 26-49.

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., and Nel, A. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111**, 455-460.

Li, J.J., Muralikrishnan, S., Ng, C.T., Yung, L.Y., and Bay, B.H. (2010). Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 1025-1033.

Liao, C. M., Chiang, Y. H., and Chio, C. P. (2008). Model-based assessment for human inhalation exposure risk to airborne nano/fine titanium dioxide particles. *Sci Total Environ* **407**, 165-177.

Lindberg, H. K., Falck, G. C., Catalan, J., Koivisto, A. J., Suhonen, S., Jarventaus, H., Rossi, E. M., Nykasenoja, H., Peltonen, Y., Moreno, C., Alenius, H., Tuomi, T., Savolainen, K. M., and Norppa, H. (2012). Genotoxicity of inhaled nanosized TiO₂ in mice. *Mutat Res* **745**, 58-64.

MacNee, W., Selby, C. (1990), Neutrophil kinetics in the lungs. *Clin Sci. (Lond)* **79**: 97-107.

Ma-Hock, L., Gamer, A. O., Landsiedel, R., Leibold, E., Frechen, T., Sens, B., Linsenbuehler, M., and van, R. B. (2007). Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials. *Inhal Toxicol* **19**, 833-848.

Ma-Hock, L., Burkhardt, S., Strauss, V., Gamer, A. O., Wiench, K., van, R. B., and Landsiedel, R. (2009). Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol* **21**, 102-118.

Maier, M., Hannebauer, B., Holldorff, H., and Albers, P. (2006). Does lung surfactant promote disaggregation of nanostructured titanium dioxide? *J Occup Environ Med* **48**, 1314-1320.

Maier, K. L., Alessandrini, F., Beck-Speier, I., Hofer, T. P., Diabate, S., Bitterle, E., Stoger, T., Jakob, T., Behrendt, H., Horsch, M., Beckers, J., Ziesenis, A., Hultner, L., Frankenberger, M., Krauss-Etschmann, S., and Schulz, H. (2008). Health effects of ambient particulate matter--biological mechanisms and inflammatory responses to in vitro and in vivo particle exposures. *Inhal Toxicol* **20**, 319-337.

Majestic, B.J., Erdakos, G.B., Lewandowski, M., Oliver, K.D., Willis, R.D., Kleindienst, T.E., Bhave, P.V. (2010). A Review of Selected Engineered Nanoparticles in the Atmosphere. Sources, Transformations, and Techniques for Sampling and Analysis. *Int J Occup Environ Health*. **16**, 488–507.

Mansour, H. M., Rhee, Y. S., and Wu, X. (2009). Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int J Nanomedicine* **4**, 299-319.

Marquis, B. J., Love, S. A., Braun, K. L., and Haynes, C. L. (2009). Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* **134**, 425-439.

Maynard, A. (2002). Experimental determination of ultrafine TiO₂ deagglomeration in a surrogate pulmonary surfactant: preliminary results. *Ann Occup Hyg*. **46 suppl. 1**, 197-202.

McIntyre, R. A. (2012). Common nano-materials and their use in real world applications. *Sci Progress* **95**, 1-22.

McKinney, W., Jackson, M., Sager, T. M., Reynolds, J. S., Chen, B. T., Afshari, A., Krajnak, K., Waugh, S., Johnson, C., Mercer, R. R., Frazer, D. G., Thomas, T. A., and Castranova, V.

(2012). Pulmonary and cardiovascular responses of rats to inhalation of a commercial antimicrobial spray containing titanium dioxide nanoparticles. *Inhal Toxicol* **24**, 447-457.

McMurry, P. H., Ghimire, A., Ahn, H. K., Sakurai, H., Moore, K., Stolzenburg, M., and Smith, J. N. (2009). Sampling nanoparticles for chemical analysis by low resolution electrical mobility classification. *Environ Sci Technol* **43**, 4653-4658.

Methner, M., Hodson, L., Dames, A., and Geraci, C. (2010a). Nanoparticle Emission Assessment Technique (NEAT) for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials--Part B: Results from 12 field studies. *J Occup Environ Hyg* **7**, 163-176.

Methner, M., Hodson, L., and Geraci, C. (2010b). Nanoparticle emission assessment technique (NEAT) for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials--part A. *J Occup Environ Hyg* **7**, 127-132.

Ministère du Développement économique, de l'innovation et de l'exportation (MDEIE) [En ligne]. Communiqué de presse Programme d'infrastructure du savoir [Modifié le 2012/07/31;

cité le 2013/04/23]. Disponible : http://www.economie.gouv.qc.ca/ministere/salle-de-presse/communiqués-de-presse/communiqué-de-presse/?tx_ttnews%5Btt_news%5D=7577&cHash=0e5c8e6b6fdd834f47b426f3f941f05a.

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

Monteiro-Riviere, N. A. and Tran, L. C. (2007). *Nanotoxicology characterization, dosing and health effects*, Informa Healthcare, USA, 434 pp.

Morawska, L. (2001). [En ligne]. *Environmental aerosol physics*. [Modifié le 2008/06/26; cité le 2013/04/17]. International Laboratory for Air Quality and Health Aerosol Physics 42 pp.
Disponible : <http://www.biophysics.sbg.ac.at/home.htm>

Morfeld, P., Treumann, S., Ma-Hock, L., Bruch, J., and Landsiedel, R. (2012). Deposition behavior of inhaled nanostructured TiO₂ in rats: fractions of particle diameter below 100 nm (nanoscale) and the slicing bias of transmission electron microscopy. *Inhal Toxicol* **24**, 939-951.

Morimoto, Y., Oyabu, T., Ogami, A., Myojo, T., Kuroda, E., Hirohashi, M., Shimada, M., Lenggoro, W., Okuyama, K., and Tanaka, I. (2011). Investigation of gene expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA in rat lung in inhaled nickel oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Ind Health* **49**, 344-352.

Morrow, P. E. (1988). Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* **10**, 369-384.

Moss, O. R., and Wong, V. A. (2006). When nanoparticles get in the way: impact of projected area on in vivo and in vitro macrophage function. *Inhal Toxicol* **18**, 711-716.

Mossman, B. T., Borm, P. J., Castranova, V., Costa, D. L., Donaldson, K., and Kleeberger, S. R. (2007). Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases. *Part Fibre Toxicol* **4**, 4.

Mostofi, R., Noël, A., Haghghat, F., Bahloul, A., Lara, J., and Cloutier, Y. (2012). Impact of two particle measurement techniques on the determination of N95 class respirator filtration performance against ultrafine particles. *J Hazard Mater* **217-218**, 51-57.

Mühlfeld, C., Geiser, M., Kapp, N., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. (2007). Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the "relative deposition index": Evidence for clearance through microvasculature. *Part Fibre Toxicol* **4**, 7.

Mühlfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Vanhecke, D., Ochs, M., and Gehr, P. (2008). Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L817-L829.

Murr, L. E., Esquivel, E. V., and Bang, J. J. (2004). Characterization of nanostructure phenomena in airborne particulate aggregates and their potential for respiratory health effects. *J Mater Sci Mater Med* **15**, 237-247.

Myojo, T., Oyabu, T., Nishi, K., Kadoya, C., Tanaka, I., Ono-Ogasawara, M., Sakae, H. and Shirai, T. (2009). Aerosol generation and measurement of multi-wall carbon nanotubes. *J Nanopart Res* **11**, 91-99.

NanoQuébec. (2010). Bilan des réalisations majeures 2001 – 2010. [En ligne] [cité le 2012/08/25]. Disponible : <http://www.nanoquebec.ca/fr/les-nanos-au-quebec.php>

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (2011). Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention: DHHS. Publication No. 2011-160. Current intelligence bulletin 63.

Disponible : <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf>

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

Nemmar, A., Hoylaerts, M. F., Hoet, P. H., Vermylen, J., and Nemery, B. (2003). Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol Appl Pharmacol* **186**, 38-45.

Noël, A. et Truchon, G. (2009). Mécanismes de toxicité pulmonaire *in vitro* des particules ultrafines : synthèse et revue de la littérature. *Travail et Santé* **25**, S2-S9.

Noël, A., Maghni, K., Cloutier, Y., Dion, C., Wilkinson, K. J., Halle, S., Tardif, R., and Truchon, G. (2012). Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs. *Toxicol Lett* **214**, 109-119.

Noël, A., Cloutier, Y., Wilkinson, K. J., Dion, C., Halle, S., Maghni, K., Tardif, R., and Truchon, G. (2013a). Generating Nano-Aerosols from TiO₂ (5 nm) Nanoparticles Showing Different Agglomeration States. Application to Toxicological Studies. *J Occup Environ Hyg* **10**, 86-96.

Noël, A., L'esperance, G., Cloutier, Y., Plamondon, P., Boucher, J., Philippe, S., Dion, C., Truchon, G., and Zayed, J. (2013b). Assessment of the contribution of electron microscopy to nanoparticle characterization sampled with two cascade impactors. *J Occup Environ Hyg* **10**, 155-172.

Noël, A., Charbonneau, M., Cloutier, Y., Tardif, R., and Truchon, G. (2013c). Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO₂: effect of primary particle size and agglomeration state. *Soumis dans Part and Fibre Toxicol*.

Nurkiewicz, T. R., Porter, D. W., Hubbs, A. F., Cumpston, J. L., Chen, B. T., Frazer, D. G., and Castranova, V. (2008). Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Part Fibre Toxicol* **5**, 1.

Oberdörster, G. (1988). Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *J Aerosol Med* **1**, 289-329.

Oberdörster, G., Ferin, J., Gelein, R., Soderholm, S. C., and Finkelstein, J. (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.

Oberdörster, G., Ferin, J., and Lehnert, B. E. (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 5**, 173-179.

Oberdörster, G. (1995). Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul Toxicol Pharmacol* **21**, 123-135.

Oberdörster, G., Cox, C., and Gelein, R. (1997). Intratracheal instillation versus intratracheal-inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. *Exp Lung Res* **23**, 17-34.

Oberdörster, G., Finkelstein, J. N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Elder, A. C. (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* **96**, 5-74.

Oberdörster, G. (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* **74**, 1-8.

Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., and Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1531-1543.

Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., and Cox, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* **16**, 437-445.

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

Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., and Yang, H. (2005b). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* **2**, 8.

Oberdörster, G., Oberdorster, E., and Oberdorster, J. (2007). Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. *Environ Health Perspect* **115**, A290.

Oberdörster, G. (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med* **267**, 89-105.

Occupational Safety & Health Administration (OSHA). 2006. [En ligne]. [cité le 2012/08/25]. 29 CFR 1910.1000 Z-1 Table: Limits for air contaminants.

Disponible: http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=STANDARDS&p_id=9992&p_text_version=FALSE Page Internet consulté 18/04/2013

Ogami, A., Yamamoto, K., Morimoto, Y., Fujita, K., Hirohashi, M., Oyabu, T., Myojo, T., Nishi, K., Kadoya, C., Todoroki, M., Yamamoto, M., Murakami, M., Shimada, M., Wang, W. N., Shinohara, N., Endoh, S., Uchida, K., Nakanishi, J., and Tanaka, I. (2011). Pathological features of rat lung following inhalation and intratracheal instillation of C(60) fullerene. *Inhal Toxicol* **23**, 407-416.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2010). List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme

for the testing of manufactured nanomaterials: revision. Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27

Ostraat, M. L., Swain, K. A., Small, R. J. (2010). Insight into the Behavior of Engineered Aerosolized Nanoparticles. A Method for Understanding their Fate from an Aerosol Release in the Workplace Environment. *Int J Occup Environ Health* **16**, 458–466.

Park, S., Lee, Y. K., Jung, M., Kim, K. H., Chung, N., Ahn, E. K., Lim, Y., and Lee, K. H. (2007). Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal Toxicol* **19 Suppl 1**, 59-65.

Pauluhn, J., and Mohr, U. (2000). Inhalation studies in laboratory animals--current concepts and alternatives. *Toxicol Pathol* **28**, 734-753.

Pauluhn, J. (2005). Overview of inhalation exposure techniques: strengths and weaknesses. *Exp Toxicol Pathol* **57 Suppl 1**, 111-128.

Pauluhn, J. (2008). Inhalation toxicology: methodological and regulatory challenges. *Exp Toxicol Pathol* **60**, 111-124.

Pauluhn, J. (2009a). Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. *Toxicol Sci* **109**, 152-167.

Pauluhn, J. (2009b). Retrospective analysis of 4-week inhalation studies in rats with focus on fate and pulmonary toxicity of two nanosized aluminum oxyhydroxides (boehmite) and pigment-grade iron oxide (magnetite): the key metric of dose is particle mass and not particle surface area. *Toxicology* **259**, 140-148.

Pauluhn, J. (2010). Multi-walled carbon nanotubes (Baytubes): approach for derivation of occupational exposure limit. *Regul Toxicol Pharmacol* **57**, 78-89.

Pauluhn, J. (2011). Poorly soluble particulates: searching for a unifying denominator of nanoparticles and fine particles for DNEL estimation. *Toxicology* **279**, 176-188.

Peters, T. M., Elzey, S., Johnson, R., Park, H., Grassian, V. H., Maher, T., and O'Shaughnessy, P. (2009). Airborne monitoring to distinguish engineered nanomaterials from incidental particles for environmental health and safety. *J Occup Environ Hyg* **6**, 73-81.

Powers, K.W., S.C. Brown, V.B. Krishna, S.C. Wasdo, B.M. Moudgil, S.M. Roberts. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part IV. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Tox Sci* **90**, 296-303.

Powers, K.V., Palazuelos, M., Moudgil, B.M. and Roberts, S.M. (2007). Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicol* **1**, 42-51.

Pratten, M. K., and Lloyd, J. B. (1986). Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Biochim Biophys Acta* **881**, 307-313.

Preining, E. (1998). The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *J Aerosol Sci* **29**, 481-495.

Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biol* **5**, 85-87.

Renwick, L. C., Donaldson, K., and Clouter, A. (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**, 119-127.

Renwick, L. C., Brown, D., Clouter, A., and Donaldson, K. (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* **61**, 442-447.

Research and Markets. (2011). *Global Funding of Nanotechnologies - 2011 Edition*, Cientifica Ltd, 82 pp.

Rossi, E. M., Pylkkanen, L., Koivisto, A. J., Vippola, M., Jensen, K. A., Miettinen, M., Sirola, K., Nykasenoja, H., Karisola, P., Stjernvall, T., Vanhala, E., Kiilunen, M., Pasanen, P., Makinen, M., Hameri, K., Joutsensaari, J., Tuomi, T., Jokiniemi, J., Wolff, H., Savolainen, K., Matikainen, S., and Alenius, H. (2010). Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci* **113**, 422-433.

Royal Society. (2004). *Nanoscience and nanotechnology : opportunities and uncertainties*, RS Policy Document 19/04.

Sager, T. M., Kommineni, C., and Castranova, V. (2008). Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol* **5**, 17.

Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., Liu, Y., West, J. L., Ausman, K. D., Warheit, D. B., and Colvin, V. L. (2006). Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* **92**, 174-185.

Scarino, A., Noël, A., Renzi, P. M., Cloutier, Y., Vincent, R., Truchon, G., Tardif, R., and Charbonneau, M. (2012). Impact of emerging pollutants on pulmonary inflammation in asthmatic rats: ethanol vapors and agglomerated TiO₂ nanoparticles. *Inhal Toxicol* **24**, 528-538.

Scherbart, A.M., Langer, J., Bushmelev, A., van Berlo, D., Haberzettl, P., Van Schooten, F.J., Schmidt, A.m., Rose, C.R., Schins, R.P.F., Albrecht, C. (2011). Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. *Part and Fibre Toxicol* **8**, 31.

Schmid, O., Moller, W., Semmler-Behnke, M., Ferron, G.A., Karg, E., Lipka, J., Schulz, H., Kreyling, W.G., and Stoeger, T. (2009). Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers* **14 Suppl 1**, 67-73.

Schmoll, L. H., Elzey, S., Grassian, V. H., O'Shaughnessy, P. T. (2009). Nanoparticle aerosol generation methods from bulk powders for inhalation exposure studies. *Nanotoxicol* **3**, 265-275.

Seaton, A., and Donaldson, K. (2005). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *Lancet* **365**, 923-924.

Seaton, A., Tran, L., Aitken, R., and Donaldson, K. (2010). Nanoparticles, human health hazard and regulation. *J R Soc Interface* **7 Suppl 1**, S119-S129.

Seipenbusch, M., Binder, A., and Kasper, G. (2008). Temporal evolution of nanoparticle aerosols in workplace exposure. *Ann Occup Hyg* **52**, 707-716.

Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., Fertsch, S., Wenk, A., Seitz, J., Mayer, P., Oberdorster, G., and Kreyling, W. G. (2007). Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the

alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect* **115**, 728-733.

Semmler, M., Seitz, J., Erbe, F., Mayer, P., Heyder, J., Oberdorster, G., and Kreyling, W. G. (2004). Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* **16**, 453-459.

Serita, F., Homma, K., Fukuda, K., Sawatari, K., Suzuki, Y., and Toya, T. (1990). Development of an inhalation system of high melting point metal fumes and its use for exposure of rats to chromium and nickel fumes. *Ind Health* **28**, 185-197.

Shimada, A., Kawamura, N., Okajima, M., Kaewamatawong, T., Inoue, H., and Morita, T. (2006). Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. *Toxicol Pathol* **34**, 949-957.

Shimada, M., Wang, W. N., Okuyama, K., Myojo, T., Oyabu, T., Morimoto, Y., Tanaka, I., Endoh, S., Uchida, K., Ehara, K., Sakurai, H., Yamamoto, K., and Nakanishi, J. (2009). Development and evaluation of an aerosol generation and supplying system for inhalation experiments of manufactured nanoparticles. *Environ Sci Technol* **43**, 5529-5534.

Simeonova, P. P., Opopol, N., Luster, M. I. (2007). Nanotechnology – Toxicological issues and environmental safety, Springer Netherlands, 276 pp.

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

Skebo, J. E., Grabinski, C. M., Schrand, A. M., Schlager, J. J., and Hussain, S. M. (2007). Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. *Int J Toxicol* **26**, 135-141.

Soto, K., Garza, K. M., and Murr, L. E. (2007). Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater* **3**, 351-358.

Srinivas, A., Rao, P. J., Selvam, G., Murthy, P. B., and Reddy, P. N. (2011). Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicol Lett* **205**, 105-115.

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

Stone, V., Johnston, H., and Clift, M. J. (2007). Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience*. **6**, 331-340.

Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, M. A., Chilvers, E.R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* **31**: 318-324.

Takenaka, S., Dornhöfer-Takenaka, H. Muhle, H. (1986). Alveolar distribution of fly ash and of titanium dioxide after long-term inhalation by Wistar rats. *J Aerosol Sci* **17**, 361-364.

Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., and Heyder, J. (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 4**, 547-551.

Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W. G., Lentner, B., Schulz, H., Ziesenis, A., Schramel, P., and Heyder, J. (2004). Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* **16 Suppl 1**, 83-92.

Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W. G., Lentner, B., Moller, W., Behnke-Semmler, M., Jennen, L., Walch, A., Michalke, B., Schramel, P., Heyder, J., and Schulz, H. (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* **18**, 733-740.

Takenaka, S. Möller, W., Semmler-Behnke, M., Karg, E., Wenk, A., Schmid, O., Stoeger, T., Jennen, L., Aichler, M., Walch, A., Pokhrel, S. Mädler, L., Eickelberg, O., Kreyling, W.G. (2012). Efficient internalization and intracellular translocation of inhaled gold nanoparticles in rat alveolar macrophages. *Nanomedicine* **7**, 855-865.

Tetley, T. D. (2007). Health effects of nanomaterials. *Biochem Soc Trans* **35**, 527-531.

Thomas, K., and Sayre, P. (2005). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part I: evaluating the human health implications of exposure to nanoscale materials. *Toxicol Sci* **87**, 316-321.

Thomas, K., Aguar, P., Kawasaki, H., Morris, J., Nakanishi, J., and Savage, N. (2006a). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VIII: International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials. *Toxicol Sci* **92**, 23-32.

Thomas, T., Thomas, K., Sadrieh, N., Savage, N., Adair, P., and Bronaugh, R. (2006b). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VII: evaluating consumer exposure to nanoscale materials. *Toxicol Sci* **91**, 14-19.

Tillery, M. I., Wood, G. O., and Ettinger, H. J. (1976). Generation and characterization of aerosols and vapors for inhalation experiments. *Environ Health Perspect* **16**, 25-40.

United-States Environmental Protection Agency (EPA). (2009). Nanomaterial Research Strategy Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Washington, D.C. Report no EPA620/K-09/011.

van, R. B., Landsiedel, R., Fabian, E., Burkhardt, S., Strauss, V., and Ma-Hock, L. (2009). Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz. *Toxicol Lett* **186**, 152-159.

Wang, J., Liu, Y., Jiao, F., Lao, F., Li, W., Gu, Y., Li, Y., Ge, C., Zhou, G., Li, B., Zhao, Y., Chai, Z., and Chen, C. (2008). Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* **254**, 82-90.

Warheit, D. B., Brock, W. J., Lee, K. P., Webb, T. R., and Reed, K. L. (2005). Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci* **88**, 514-524.

Warheit, D. B., Webb, T. R., Sayes, C. M., Colvin, V. L., and Reed, K. L. (2006). Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci* **91**, 227-236.

Warheit, D. B., Webb, T. R., Reed, K. L., Frerichs, S., and Sayes, C. M. (2007a). Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* **230**, 90-104.

Warheit, D. B., Webb, T. R., Colvin, V. L., Reed, K. L., and Sayes, C. M. (2007b). Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci* **95**, 270-280.

Warheit, D. B., Hoke, R. A., Finlay, C., Donner, E. M., Reed, K. L., and Sayes, C. M. (2007c). Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* **171**, 99-110.

Warheit, D. B. (2008). How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci* **101**, 183-185.

Warheit, D. B. (2010). Assessing health risks of inhaled nanomaterials: development of pulmonary bioassay hazard studies. *Anal Bioanal Chem* **398**, 607-612.

Willeke, K., and Baron, P. (1993). *Aerosol Measurement Principles, Techniques and Applications*. Isbn-0-442-00486-9. Van Nostrand Reinhold, New York, 876 pp.

Wittmaack, K. (2007). In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area, or what? *Environ Health Perspect* **115**, 187-194.

Wong, B. A. (2007). Inhalation exposure systems: design, methods and operation. *Toxicol Pathol* **35**, 3-14.

Xia, T., Kovoichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., and Nel, A. E. (2006a). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* **6**, 1794-1807.

Xia, T., Kovoichich, M., and Nel, A. (2006b). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in mediating particulate matter injury. *Clin Occup Environ Med* **5**, 817-836.

Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Madler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., Zink, J. I., and Nel, A. E. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* **2**, 2121-2134.

Yang, W., Peters, J. I., and Williams, R. O., III (2008). Inhaled nanoparticles--a current review. *Int J Pharm* **356**, 239-247.

Yazdi, A. S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S. K., Tardivel, A., Couillin, I. and Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 19449-19454.

Zhang, Y., Yu, W., Jiang, X., Lv, K., Sun, S., and Zhang, F. (2011). Analysis of the cytotoxicity of differentially sized titanium dioxide nanoparticles in murine MC3T3-E1 preosteoblasts. *J Mater Sci: Mater Med* **22**, 1933-1945.

Zook, J. M., MacCuspie, R. I., Locascio, L. E., Halter, M. D., Elliott, J. T. (2011). Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on haemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicol* **5**, 514-530.

Zwilling, B. S. and Eisenstein, T. K. (1994). *Macrophage – Pathogen Interactions*. Immunology series; V. 60. Marcel Dekker Inc. ISBN 0-8247-9124-X.

