

Université de Montréal

Effets des nanoparticules manufacturées sur les cellules pulmonaires humaines

par
Rajaa Tabbaa Chalabi

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès science (M.Sc.)
en Pharmacologie
option pharmacologie moléculaire

Août, 2015

© Rajaa Tabbaa Chalabi, 2015

Résumé

La détection et la caractérisation des nanoparticules manufacturées (NPM) est l'une des premières étapes pour contrôler et diminuer leurs risques potentiels sur la santé humaine et l'environnement. Différents systèmes d'échantillonnage dans l'air existent pour l'évaluation d'une exposition aux NPM. Cependant, ils ne mesurent pas le risque potentiel de cette exposition à la santé humaine ni les mécanismes cellulaires qui en seraient responsables. Nos objectifs de recherche sont 1) Évaluer les effets de différents types de nanoparticules sur des cellules pulmonaires humaines et 2) Identifier de nouveaux mécanismes intracellulaires activés lors de l'exposition à divers types de NPM. Méthodologie: La lignée de cellules A549 a été utilisée. Trois types de NPM ont été étudiés (différentes concentrations et temps d'exposition): les nanoparticules de dioxyde de titane de type anatase (TiO_2), les nanotubes de carbone simple paroi (NTCSP) et les nanoparticules de noir de carbone (NC). La viabilité cellulaire a été mesurée par le test MTS, le test PrestoBlue et le test d'exclusion du bleu de Trypan (uniquement pour les NTCSP). La mesure du stress oxydatif a été déterminée par la mesure des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) en utilisant l'essai DCFH-DA. L'activation d'une réponse anti-oxydative a été déterminée par la mesure de la forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG) du glutathion, ainsi que du ratio GSH/GSSG (seulement avec NTCSP et TiO_2). Résultats: Les trois nanoparticules ne semblent pas être toxiques pour les cellules A549 car il y a une diminution significative mais minime de la viabilité cellulaire. Cependant, elles induisent une augmentation du contenu intracellulaire en ROS qui est à la fois dépendante du temps et de la concentration. Aucun changement dans les concentrations de GSH et GSSG n'a été observé. En conclusion, nos données indiquent que la mesure de la viabilité n'est pas un critère suffisant pour conclure à la toxicité des NPM. La production de ROS est un critère intéressant, cependant il faudra démontrer l'activation de systèmes anti-oxydatifs pour expliquer l'absence de mortalité cellulaire suite à l'exposition aux NPM.

Ce projet est subventionné par NanoQuébec en partenariat avec l'institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST)

Mots-clés : nanoparticules manufacturées, cellules épithéliales alvéolaires (A549), nanotubes de carbone simple paroi, dioxyde de titane, noir de carbone, viabilité cellulaire, stress oxydatif, mécanismes intracellulaires, risque potentiel.

Abstract

Detection and characterization of manufactured nanoparticles (NPs) is one of the first steps to control and reduce potential risks to human health and the environment. Various sampling schemes in air exist for the evaluation of exposure to NPs. However, they do not measure the potential risk of this exposure to the human health and the cellular mechanisms that are responsible. Our research objectives are 1) To evaluate the effects of different types of nanoparticles on human lung cells and 2) Identify new intracellular mechanisms activated during exposure to various types of NPs. Methodology: The cell line A549 was used. Three types of NPs were studied (different concentrations and exposure time): titanium dioxide nanoparticles of anatase (TiO₂), the single wall carbon nanotubes (SWCN) and black carbon nanoparticles (BC). Cell viability was measured by the MTS assay, the PrestoBlue assay and the Trypan blue dye exclusion test (only for the SWCN). To investigate whether the NPs stimulated ROS generation in A549 cells, the intracellular ROS level was measured using the DCFH-DA assay. The potential induction of oxidative stress responses in cells when exposed to TiO₂ and SWCN was determined by the quantification of the extracellular levels of reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) forms. Results: The three nanoparticles do not appear to be toxic to A549 cells because there is a significant but small decrease in cell viability. However, they induce ROS production which is both time and concentration dependent. No change in the concentrations of GSH and GSSG were observed. In conclusion, our data indicate that measuring the cell viability is not a sufficient criterion for concluding if the NPs are toxic. ROS production is an interesting criterion, however, we have to demonstrate the activation of anti-oxidative systems to explain the absence of cell death following exposure to the NPs.

This project is supported by *NanoQuébec* in partnership with the *l'institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST)*.

Keywords : manufactured nanoparticles, alveolar epithelial cells (A549), simple wall carbon nanotubes, titanium dioxide nanoparticles, carbon black, cell viability, oxidative stress, intracellular mechanisms, potential risk.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles	xi
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xvi
Introduction	1
Chapitre 1. Nanoparticules.....	2
1.1 Définition.....	2
1.2 Origine des nanoparticules.....	2
1.3 Applications présentes et futures.....	3
Chapitre 2. Les nanoparticules manufacturées.....	5
2.1 Nanoparticule de dioxyde de titane.....	5
2.1.1 Généralités.....	5
2.1.2 Principales caractéristiques et applications.....	5
2.1.3 Risque sur la santé.....	6
a- Études <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	6
b- Études épidémiologiques.....	7
2.2 Nanotubes de carbone simple paroi.....	8
2.2.1 Généralité.....	8
2.2.2 Principales caractéristiques et applications.....	8
2.2.3 Risque sur la santé.....	9
a- Études <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	9
b- Comparaison entre nanotube de carbone et amiante.....	11
2.3 Noir de carbone.....	12
2.3.1 Généralités.....	12
2.3.2 Principales caractéristiques et applications.....	13
2.3.3 Risque sur la santé.....	14
a- Études <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	14
c- Études épidémiologiques.....	14
2.4 Différenciation entre les différentes études de nanotoxicité.....	15

Chapitre 3. Voies d'exposition aux nanoparticules	16
Chapitre 4. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	17
4.1 Définition.....	17
4.2 Sources de ROS.....	17
Chapitre 5. Système de défense contre les ROS.....	21
5.1 antioxydants.....	21
5.2 les antioxydants enzymatiques.....	21
5.3 les antioxydants non enzymatiques	23
Chapitre 6. Effets des ROS sur la cellule.....	24
6.1 Peroxydation lipidique.....	24
6.2 Oxydation des protéines.....	25
6.3 Dommages de l'ADN.....	25
Chapitre 7. Objectifs de recherche.....	26
Matériel et méthodes.....	27
1) Culture cellulaire.....	28
1.1 Décongélation des cellules.....	28
1.2 Passage cellulaire.....	28
1.3 Comptage cellulaire.....	29
2) Nanoparticules manufacturées.....	32
2.1 Dioxyde de titane de type anatase – TiO ₂	32
2.2 Nanotubes de carbone simple paroi – RN-000.....	32
2.3 Noir de carbone – LB101.....	32
2.4 Dispersion des nanoparticules manufacturées.....	33
3) Tests de viabilité cellulaire.....	34
3.1 Test MTS.....	34
3.2 Test PrestoBlue.....	35
3.3 Test d'exclusion du bleu de Trypan.....	36
4) Étude du stress oxydatif.....	37
4.1 Mesure du ROS intracellulaire.....	37
4.2 Mesure du glutathion.....	38
5) Analyse statistique.....	40

Résultats	41
Résultats avec les nanoparticules de dioxyde de titane de type anatase	42
1. Étude de la viabilité cellulaire.....	42
1.1 Test MTS.....	42
1.2 Test PrestoBLue.....	43
2. Étude du stress oxydatif	45
2.1 Mesure du ROS intracellulaire.....	45
2.1 Mesure du glutathion.....	47
Résultats avec les nanotubes de carbone simple paroi	49
1. Étude de la viabilité cellulaire.....	49
1.1 Test MTS.....	49
1.2 Test PrestoBLue.....	51
1.3 Test d'exclusion du bleu de Trypan.....	52
2. Étude du stress oxydatif.....	55
2.1 Mesure du ROS intracellulaire.....	55
2.1 Mesure du glutathion.....	57
Résultats avec les nanoparticules de noir de carbone	59
1. Étude de la viabilité cellulaire.....	59
1.1 Test MTS.....	59
1.2 Test PrestoBLue.....	60
2. Étude du stress oxydatif.....	62
2.1 Mesure du ROS intracellulaire.....	62
Discussion	64
1. Discussion méthodologique.....	65
1.1 Modèle <i>in vitro</i> utilisé.....	65
1.2 Nanoparticules manufacturées utilisées.....	65
2. Discussion des résultats.....	68
2.1- Effets du dioxyde de titane de type anatase sur les cellules pulmonaires humaines.....	68
2.2- Effets des nanotubes de carbone simple paroi sur les cellules pulmonaires humaines.....	69
2.3- Effets du noir de carbone sur les cellules pulmonaires humaines.....	71
2.4- Effets des nanoparticules étudiées.....	72
2.5- Perspectives	72
Conclusion	74
Bibliographie	76
Annexe I	88

Liste des tableaux

Tableau I. Les différents types de noir de carbone.

Tableau II. Détermination du facteur multiplicatif selon le nombre de lignes comptées d'un des quadrillages de l'hématimètre de Neubauer.

Tableau III. Les critères de classement des agents selon le degré d'indication de cancérogénicité par le CIRC*.

Liste des figures

Figure 1. Schéma des défenses par les antioxydants enzymatiques.

Figure 2. Hématimètre de Neubauer.

Figure 3. Effet de l'exposition des cellules A549 au dioxyde de titane, TiO₂ anatase. Test MTS.

Figure 4. Effet de l'exposition des cellules A549 au dioxyde de titane, TiO₂ anatase. Test PrestoBlue.

Figure 5. Effet de l'exposition des cellules A549 au dioxyde de titane, TiO₂ anatase, sur la production de ROS.

Figure 6. Effet de l'exposition des cellules A549 au dioxyde de titane, TiO₂ anatase pendant 24h sur la réponse anti-oxydative. Test de glutathion.

Figure 7. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000. Test MTS.

Figure 8. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000. Test PrestoBlue.

Figure 9. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000. Test Bleu de Trypan.

Figure 10. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000, sur la production de ROS.

Figure 11. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000 pendant 24h sur la réponse anti-oxydative. Test de glutathion.

Figure 12. Effet de l'exposition des cellules A549 au noir de carbone, LB101. Test MTS.

Figure 13. Effet de l'exposition des cellules A549 au noir de carbone, LB101. Test PrestoBlue.

Figure 14. Effet de l'exposition des cellules A549 au noir de carbone, LB101, sur la production de ROS.

Liste des sigles

°C	Degré celsius
λ	Longueur d'onde
cm ²	Centimètre carré
mg/L	Milligramme par litre
mL	Millilitre
nm	Nanomètre
RCF	Force Centrifuge Relative
U/mL	Unité par millilitre
$\mu\text{g/mL}$	Microgramme par millilitre
μL	Microlitre
μM	Micromolaire

Liste des abréviations

16HBE	Lignée de cellules épithéliales bronchiques
4-HNE	4-hydroxynonéal
A549	Lignée de cellules épithéliales alvéolaires de carcinome humain
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ATP	Adenosine Triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cu	Cuivre
CXCL	CXC-chemokine ligand
DCFH-DA	Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DO	Densité optique
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
E171	Dioxyde de titane
eNOS	Oxyde nitrique synthase forme endothéliale
FBS	Fetal bovine serum
FeTiO ₃	Ilméite
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion forme réduite
GSSG	Glutathion forme oxydée
GSTNB	Disulfure mixte
H ₂	Dihydrogène
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène

HeLa	Lignée de cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus
IL	Interleukine
IL-1 β	Interleukine-1 β êta
INF- γ	Interféron-gamma
iNOS	Oxyde nitrique synthase forme inductible
KCl	Chlorure de potassium
LB101	Noir de carbone de la compagnie 'Evonik Industries'
LOOH	Peroxyde lipidique
MDA	Malondialdéhyde
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
min	Minutes
Mn	Manganèse
MTS	(3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NaH ₂ PO ₄	Dihydrogénophosphate de sodium
Na ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de sodium
NC	Noir de carbone
NIOSH	Institut National pour la Sécurité et la Santé au Travail
nNOS	Oxyde nitrique synthase forme neuronale
NO	Oxyde nitrique
NO [•]	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOX	NADPH oxydase
NPs	Nanoparticules
NPM	Nanoparticule manufacturée
NTC	Nanotube de carbone
NTCMP	Nanotube de carbone multi parois
NTCSP	Nanotube de carbone simple paroi

O ₂	Dioxygène
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OECD	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
OH [•]	Radical hydroxyl
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PMS	Méthosulfate de phénazine
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
RN-000	Nanotubes de carbone simple paroi de la ‘société Raymor Nanotech’
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau foetal
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNB	5-thio-2-nitrobenzoïque
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TiO ₂	Dioxyde de titane
UV	UltraViolet
VP	Vinyl-pyridine
XO	Xanthine oxydase
Zn	Zinc

*Je dédie ce mémoire à ma très chère mère.
Qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude qui, si grande qu'elle puisse
être, ne sera à la hauteur de ses sacrifices et ses prières pour moi.*

Remerciements

Je dois tout d'abord remercier Dieu le tout puissant, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir cette maîtrise. À travers ces quelques lignes, je tiens à remercier aussi toutes les personnes qui ont participé à ce travail en m'apportant leur expertise, leurs conseils et leur soutien.

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Karim Maghni qui m'a accepté dans son laboratoire. Je tiens à remercier aussi tous les membres de mon jury. Je suis également très reconnaissante à mes encadrants, le Dr. René Cardinal et le Dr. Guy Rousseau. Si j'ai progressé durant mon mémoire, c'est en grande partie grâce à vous. Merci pour votre confiance, votre implication et votre disponibilité durant cette année. Les orientations scientifiques que vous m'avez proposées se sont toujours avérées enrichissantes, pertinentes et payantes.

Cette année de maîtrise n'aurait pas été la même sans la super équipe du centre de recherche de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal avec lesquels j'ai passé des moments inoubliables. Merci à Bouchra, Houda et Pierre, sans qui les journées auraient été plus longues. Mélanie, merci pour tout. C'est toi qui m'a appris quasiment tous les aspects du métier de chercheur, en me les expliquant avec une patience qui me laisse admirative. Ton esprit affuté a souvent permis d'améliorer mes protocoles ou de mieux expliquer mes résultats. Merci d'être une grande soeur. Merci de m'avoir écoutée et soutenue tout au long de ma maîtrise. Pour ça, et pour beaucoup plus encore, je te remercie.

Plus particulièrement, je pense à ma collègue Zeinab. Nous avons partagé des bureaux, des manips, des repas, etc. Avoir quelqu'un dans la même situation que moi m'a beaucoup aidé. Nos délires, nos larmes, nos photos, nos coups de folies et notre soutien mutuel resteront un excellent souvenir. Je te souhaite de la réussite dans tout ce que tu entreprends.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis qui ont été présents et m'ont soutenu, chacun à sa manière durant cette période. Kamal, Léa, Saja, Tala, Noura et Sara merci à vous d'avoir été là. Sans vous, je ne serais jamais arrivée à bout de ma maîtrise. Merci à ma meilleure amie, ma petite soeur et ma confidente Jana. Merci à Fady qui me motivait à chaque mardi et jeudi avant mes cours. Merci à ma tante préférée Dahouk pour tout le chocolat qu'elle m'apportait. Un grand merci à mon spécial Wissam pour tout son support et son aide.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour les deux plus fortes femmes dans ma vie: maman et grand-maman. Sans vous, je ne serai pas la personne que je suis aujourd'hui. Il n'y a pas de mots qui pourraient expliquer la gratitude et l'amour que j'éprouve envers vous. Votre présence et vos encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Merci d'avoir nourri mes ambitions et de m'avoir appris l'indépendance la débrouillardise.

Introduction

1) Nanoparticules

1.1 Définition

De nos jours, le monde fait face à une abondance de produits de nanotechnologie. La définition nanométrique considère le domaine de dimension compris entre 1 à 100 nm. La réduction d'une matière à l'échelle nanométrique permet l'apparition de propriétés nouvelles (physiques, chimiques, optiques, mécaniques, etc.) souvent différentes de celles des mêmes matériaux utilisés à une taille supérieure (Karmakar et al., 2014). La taille nanométrique de ces particules leur confère une grande aire de surface car la majorité des atomes les composant se retrouvent à leur surface. Ainsi, cette surface de particules génère une plus grande réactivité à l'environnement (Yang et al., 2008). Les applications dans le domaine des nanotechnologies sont à la base de ces nouvelles propriétés. Ainsi, on constate un progrès majeur dans le domaine de l'électronique, de l'industrie, de l'environnement ou de la médecine.

Si un nano-objet possède une seule dimension nanométrique, il est appelé un nanofeuillet (exemple : graphite). S'il dispose de deux dimensions nanométriques, il est appelé un nanotube (exemple: nanotubes de carbone). Une nanoparticule s'agit d'un nano-objet ayant trois de ses dimensions nanométriques (exemple: dioxyde de titane).

1.2 Origine des nanoparticules

Il existe plusieurs origines pour les nano-objets, soit des nanoparticules d'origine naturelle ou d'origine anthropique. Les nanoparticules d'origine naturelle sont produites par des phénomènes tels que l'activité volcanique, l'érosion, les feux, la condensation de gaz dans l'atmosphère, etc. Les nanoparticules d'origine anthropique sont produites suite à des activités humaines qui sont intentionnelles ou non. Les nano-objets non-intentionnels sont générés par la combustion des moteurs, les industries, etc. Les nanoparticules produites par l'humain d'une façon intentionnelle sont appelées des nanoparticules manufacturés (NPM). Ces dernières présentent des propriétés qui dépendent de leur processus de formation (propriétés physico-chimiques spécifiques). Ainsi, elles se trouvent appliquées à de nombreux produits: cosmétiques, textiles, médicaments, optique, électronique, afficheurs, équipements sportifs, etc. (Slezakova et al., 2013).

1.3 Applications présentes et futures

Nanomédecine : Les nanomatériaux sont utilisés en recherche biomédicale et en médecine (Emerich et Al., 2003). Dans la résonance magnétique, les nanoparticules magnétiques vont permettre de suivre les cellules. Des nanoparticules poreuses vont permettre de livrer des médicaments de façon sélective vers certains organes. Des particules pseudovirales sont utilisées pour le développement de nouveaux vaccins.

Électronique: Les structures des puces électroniques et les circuits électroniques utilisent les nanoparticules.

Environnement: Afin d'accroître l'efficacité des cellules solaires, du dioxyde de titane (TiO_2) est utilisé.

Industrie Aéronautique: Des nanomatériaux comme les nanotubes de carbones sont utilisés dans la fabrication des avions grâce à leurs propriétés physiques. Ils permettent de rendre les avions plus légers et plus résistants.

Textile: Des nanocomposites fibre-polymères sont utilisés pour améliorer la qualité textile. Ils assurent une résistance élevée et un faible poids.

Cosmétique: L'industrie cosmétique utilise des nanoparticules afin d'améliorer les propriétés des produits cosmétiques tel que la brillance, les propriétés optiques, la couleur, etc. On trouve, par exemple, l'utilisation du dioxyde de titane dans les crèmes solaires. Un autre exemple est la présence du noir de carbone dans le mascara.

Automobile: Afin de réduire le poids des véhicules, d'augmenter la résistance des pièces automobiles, d'augmenter la tenue à la température de certaines pièces, de diminuer la consommation d'énergie et d'augmenter la sécurité et le confort des passagers, l'industrie automobile utilise des nanomatériaux. Par exemple, les nanocomposites à matrice polymère augmentent la résistance des matériaux tout en diminuant le poids des pièces.

Alimentation: Dans les emballages alimentaires, les nanoparticules peuvent servir à barrer la route aux UV dans les emballages alimentaires. On s'en sert aussi comme filtre anti-microbien, agent anti-odeurs, ou capteur d'humidité. Par exemple, le nano-aluminium rend le papier aluminium plus réfléchissant et moins collant.

2) Les nanoparticules manufacturées

2.1 Nanoparticules de dioxyde de titane

2.1.1 Généralités

Le dioxyde de titane, TiO_2 , est le 9^{ème} composant le plus abondant dans la croûte terrestre. Il a été découvert en 1791 en Angleterre. C'est de l'oxyde métallique qui est principalement présent sous 3 formes: rutile (le plus présent sur terre), anatase et brookite. Dans la nature, on retrouve le TiO_2 soit sous forme de rutile pur ou soit un mélange de FeTiO_3 et de TiO_2 . Plusieurs méthodes permettent de synthétiser du TiO_2 nanométrique. Par exemple, le procédé sol-gel consiste en une suite de polymérisation/hydrolyse à partir d'un précurseur inorganique. Une autre façon est le procédé sol. Il s'agit d'une série de réactions non hydrolytiques entre un précurseur de chlorure de titane et des molécules donneuses d'oxygène. Les nanoparticules de dioxyde de titane peuvent aussi être obtenues par oxydation directe de titane pur. Le choix du procédé de fabrication ainsi que les conditions de production comme la nature du précurseur ou les conditions de température permettent d'obtenir du TiO_2 ayant différentes caractéristiques physicochimiques (Chen et al., 2007).

2.1.2 Principales caractéristiques et applications

Les nanoparticules de dioxyde de titane sont les deuxièmes nanoparticules les plus manufacturées (Kansara et al., 2014). On estime une production annuelle d'environ 10 000 tonnes de TiO_2 (Piccinno et al., 2012). C'est grâce à ses caractéristiques qu'elles se trouvent appliquées dans plusieurs produits. Une des caractéristiques est sa couleur blanche. Le TiO_2 possède un fort indice de réfraction. Pour une longueur d'onde de 590 nm, l'indice de réfraction du rutile est de 2.7, celui de l'anatase est de 2.55. De ce fait, le TiO_2 est reconnu comme étant le pigment blanc le plus opaque parmi ceux disponibles. Ainsi, son indice de réfraction et sa blancheur font que cette nanoparticule est souvent utilisée comme pigment : peintures, encres, plastiques, dentifrices, médicaments (Medina-Reyes et al., 2015 ; Demilecamps et al., 2005). Pour les mêmes raisons, le TiO_2 est un colorant alimentaire, le E171 (Athinarayanan et al., 2015). De plus, cette nanoparticule a la propriété d'adsorber les rayons UV. Ainsi, elle est employée dans l'industrie cosmétique. Le TiO_2 se trouve dans presque toutes les crèmes solaires. Il a été démontré que les absorbeurs d'UV minéraux (à base de TiO_2 ou d'oxyde de zinc) entraînent moins de problèmes de photoallergie que les absorbeurs d'UV chimiques (Sambandan et al.

2011). Le dioxyde de titane a une capacité photocatalytique. En 1967, le chimiste Fujishima, sous la supervision du Dr Honda, a découvert que les UV adsorbés à la surface du TiO₂ nanométrique permettent d'oxyder l'eau en O₂ et H₂. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Honda-Fujishima ou photocatalyse (Fujishima et al., 1972). Dans l'étude de Mendonca, il a été démontré que l'utilisation du TiO₂ nanométrique dans les implants biologiques permet d'augmenter la prolifération et la différenciation cellulaire (Mendonca et al., 2008).

2.1.3 Risque sur la santé

a-Études *in vitro* / *in vivo*

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 2010) a classé le TiO₂ dans le groupe 2B (voir annexe I) étant possiblement cancérogène pour l'homme. L'Institut national pour la sécurité et la santé au travail (NIOSH, 2011) a déterminé que le TiO₂ a un potentiel carcinogène lorsqu'inhalé. En effet, il a été rapporté que lorsque des nanoparticules de dioxyde de titane sont inhalées, elles peuvent causer de l'inflammation, de la fibrose et des dommages pulmonaires (Afaq et al, 1998 ; Rahman et al, 2002). L'étude des effets suite à l'exposition au TiO₂ à long terme et ainsi que les études *in vivo* sont moins explorées (Medina-Reyes et al., 2015). Cependant, il a été démontré que les nanoparticules de dioxyde de titane causent de l'inflammation (Ponce, 2009; Bonner et al., 2013 ; Xia et al., 2013 ; Baisch et al., 2014) avec une augmentation des interleukines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 et une libération de TNF- α et IFN- γ . Des études ont montré que suite à l'inhalation du TiO₂, ces nanoparticules sont retenues dans les régions alvéolaires (Ferin et al., 1992 ; Oberdörster et al., 1990). Il est à noter que les résultats des études *in vitro* et *in vivo* sur la toxicologie et la biodistribution du TiO₂ sont souvent controversés. En général, les différentes études montrent que ces nanoparticules ne causent pas de létalité (Johntson et al., 2010). Le TiO₂ induit l'apoptose, augmente la production intracellulaire d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species: ROS). (Hussain et al., 2009, 2010 ; Liu et al., 2010) et cause le stress oxydatif (Borm et al., 2006 ; Pfuhler et al., 2013). Les radicaux libres (production d'O₂⁻) produits suite à l'exposition des cellules au TiO₂ interagissent avec les composants cellulaires (le noyau, les mitochondries, le cytoplasme, etc.) et induisent des dommages par oxydation des protéines (Gajjar et al., 2009). Plusieurs études indiquent que les nanoparticules de dioxyde de titane causent des cassures à l'ADN (Gurr et al., 2005; Kang et al., 2008 ; Falck et al., 2009). Il a été relevé que cette nanoparticule manufacturée crée des lésions

oxydatives à l'ADN (Jugan et al., 2011 ; Gurr et al., 2005). Il y a une corrélation entre les dommages à l'ADN causés par le TiO₂ et l'augmentation des ROS intracellulaires et du stress oxydatif (Shukla et al., 2011, 2013). Une récente étude sur des souris mâles montre que les nanoparticules de dioxyde de titane augmentent le stress oxydatif et induisent l'apoptose (Zhao et al., 2015).

b-Études épidémiologiques

Dans une ancienne étude publiée en 1972, il a été observé, chez des travailleurs, un dépôt de TiO₂ associé à une fibrose pulmonaire (Elo et al., 1972). Quelques années plus tard, dans une autre étude, un épaississement pleural a été observé chez des personnes travaillant dans une usine de TiO₂ (Garabrant et al., 1987). Cependant, ce résultat n'est pas très crédible car les travailleurs ont également été exposés à l'amiante. Une autre étude consistait à observer 1 576 ouvriers exposés à TiO₂ entre les années 1956 à 1985, afin de déterminer si ces derniers présentaient des risques significativement plus élevés de cancer du poumon, de maladies respiratoires chroniques, de fibrose pulmonaire, etc. (Chen et al., 1988). Les analyses suggèrent que les risques de développer un cancer du poumon ou d'autres maladies respiratoires mortelles n'étaient pas plus élevés que chez les groupes de référence. Aucun cas de fibrose pulmonaire n'a été déclaré parmi les employés exposés au TiO₂. Les données sur les risques de l'exposition de l'homme au TiO₂ sont très limitées. Une étude réalisée au États-Unis a montré qu'il n'y a pas de tendance significative associée aux travailleurs exposés au dioxyde de titane pour le cancer du poumon ou d'autres maladies respiratoires (Fryzek et al., 2003). Une étude de cohortes a été réalisée en 2010, sans trouver d'association entre l'exposition au TiO₂ et la mortalité (Ellis et al., 2010).

2.2 Nanotube de carbone simple paroi

2.2.1 Généralités

Les nanotubes de carbone (NTC) sont une des formes allotropiques du carbone. Il existe d'autres allotropes du carbone comme le diamant, le graphite, le carbone amorphe et les fullerènes. Les NTC ont été observés pour la première fois en 1974 (Endo et al., 2002). Iijima fut le premier à caractériser cette nanoparticule (Iijima et al., 1991). Le graphène constitue l'élément structurel de base des NTC. Un nanotube de carbone est composé d'une feuille de graphène enroulée sur elle-même. Les atomes de carbone sont hybridés sous forme sp^2 (Dresselhaus et al., 1996). Il existe deux types de nanotubes de carbone : nanotube de carbone simple paroi (NTCSP) et nanotube de carbone multi parois (NTCMP). Les NTCSP ne possèdent qu'une seule paroi alors que les NTCMP sont formés de plusieurs parois où les atomes de carbone sont organisés en réseaux d'hexagones. Lors de leur découverte, les NTC ont été produits par la méthode de décharge d'arc électrique (Iijima et al., 1991). Depuis, de nombreuses méthodes ont été mises au point, conduisant préférentiellement à la production de NTC simple ou multi-parois.

2.2.2 Principales caractéristiques et applications

Les NTC possèdent une forte rigidité due à la « forte » liaison carbone-carbone. Ils sont 100 fois plus résistants que l'acier (Yakobson et al., 1998). De plus, Les nanotubes de carbone sont d'une très grande flexibilité (Lu et al., 1997). Ceci est due à la possibilité pour les atomes d'une feuille de graphène de se réorganiser en formant des pentagones, heptagones (courbure locale) (Bernholc et al., 1998). Grâce à ces caractéristiques, ils sont utilisés dans l'élaboration de nouveaux matériaux composites qui soient à la fois légers et résistants. Par exemple, dans les articles de sport, ils sont utilisés dans les raquettes de tennis, les bâtons de hockey, les cadres des vélos, etc.

On les retrouve aussi dans l'automobile (les pneumatiques, les pièces de carrosserie). Les NTC sont des semi-conducteurs. Ils ont la capacité de réguler la quantité ainsi que la direction du courant d'un champ électrique (Heyd et al., 1997 ; Odom et al., 1998). De plus, ils possèdent une faible résistance électrique. De ce fait, ils sont capables d'annuler un champ magnétique (Brozdnicenko et al., 2007). Donc, leur utilisation permet de minimiser les pertes d'énergie. Outre les propriétés électriques, les NTC possèdent une conductivité thermique supérieure à celle du diamant. Les nanotubes de carbone sont capables d'absorber 99,9% de la lumière, ce qui fait qu'ils sont classés comme étant le matériau le plus sombre (Yang et al., 2008). La surface des

NTC peut être fonctionnalisée en y liant des groupements chimiques d'intérêt de manière covalente ou non-covalente. Lors de leurs travaux, Kam et al. (2005) ont fonctionnalisé un nanotube de carbone simple paroi avec une protéine spécifique des récepteurs aux folates présents au niveau des cellules cancéreuses. Ce groupe a montré que les NTCSP fonctionnalisés peuvent se retrouver dans le cytoplasme des cellules cancéreuses. Ainsi, et grâce à la capacité des NTCSP à absorber la lumière dans le proche infrarouge, les cellules cancéreuses peuvent être détruites (Kam et al., 2005). Les nanotubes de carbone sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique comme vecteur de médicament afin de faciliter le passage de la barrière hémato-encéphalique (Pantarotto et al., 2004). Une étude, publiée en 2003, a montré que les NTC peuvent interagir avec des protéines spécifiques et reconnaître les anticorps exprimés lors d'une maladie auto-immune. Ceci permettra le diagnostic de la maladie (Chen et al., 2003). Grâce à leurs propriétés physico-chimiques assez remarquables, les nanotubes de carbone se trouvent ainsi utilisés dans plusieurs domaines comme dans l'industrie textile, la science des matériaux, la microélectronique, l'industrie automobile et aussi dans la nanomédecine (Baughman et al. 2002; De Volder et al. 2013). En 2013, la production annuelle de nanotubes de carbone simple paroi était de 6 tonnes, alors que celle de nanotubes de carbone multi-parois était de 2000 tonnes (Nanotech Magazine., 2013).

2.2.3 Risque sur la santé

a-Études *in vitro* / *in vivo*

Les effets toxiques des nanotubes de carbone sur les cellules sont principalement axés sur l'apoptose, la toxicité, la production de ROS, les perturbations membranaires et la signalisation cellulaire (Hillegass et al., 2010). La cytotoxicité de NTC diffère selon le type de lignées cellulaires impliqué. Certaines toxicités pourraient être causées par des réactions inflammatoires, stress oxydatif et des réponses cytotoxiques (Kagan et al., 2006). Dans le répertoire des études réalisées *in vivo*, la majorité a observé une réponse inflammatoire (Osmond-McLeod et al. 2011; Pauluhn 2010; Porter et al. 2010; Shvedova 2005; Shvedova et al. 2008). Les macrophages jouent un rôle important dans l'élimination des nanoparticules de la surface cellulaire ou des tissus. Une étude publiée en 2005 montre que les nanotubes de carbone simple paroi sont toxiques dans les macrophages alvéolaires du cochon de Guinée. Cette toxicité est dépendante de la dose de NTCSP (Jia et al., 2005). Pour ce qui est des nanotubes de carbone multi-parois, ces derniers

induisent une nécrose et une dégénérescence dans les macrophages (Jia et al., 2005). Les NTC induisent le stress oxydatif en augmentant la production de ROS dans les macrophages (Pulskamp et al., 2007). De plus, il a été démontré que les nanotubes de carbone multi-parois pourraient induire des effets toxiques sur les cellules T humaines d'une manière dépendante de la concentration (Bottini et al., 2006). Les nanotubes de carbone simple paroi altèrent la viabilité cellulaire des fibroblastes des poumons (lignée V79) et causent des dommages à l'ADN (Kisin et al., 2007). Deckers et al (2008) ont rapporté que les NTCMP pourraient inhiber la prolifération cellulaire et induire la mort cellulaire (Simon-Deckers et al., 2008). Une étude *in vitro* a montré que l'exposition des cellules épithéliales alvéolaires A549 à des NTCSP déclenche des réponses inflammatoires, cause du stress oxydatif et induit des dommages à la membrane cellulaire (Choi et al., 2009). Une étude *in vivo* trouve qu'il n'y a pas d'inflammation mesurable observée dans l'espace bronchique suite à l'exposition des cobayes à des NTC (Huczko et al., 2001). Cependant, une autre étude montre les NTCSP induisent une réponse inflammatoire chez des souris (Lam et al., 2004). Les NTC pourrait provoquer des réactions inflammatoires par toxicité cutanée, augmenter le nombre de cellules susceptible dermiques et épaissir la peau (Koyama et al., 2009). Néanmoins, une étude sur des lapins montrent que les nanotubes de carbone simple paroi n'irritent pas la peau et ne causent pas de réactions allergiques (Huczko et al., 2001). Il a été constaté que l'inhalation des NTC provoque des lésions pulmonaires, de l'inflammation et la formation de tumeurs (Muller et al., 2006). Chez les souris, il a été observé que l'exposition respiratoire à des NTCSP forment des granulomes (Shvedova et al., 2005). En outre, l'inhalation de nanotubes de carbone provoque une toxicité pulmonaire (Carrero-Sanchez et al., 2006). Une étude publiée en 2004 rapporte que l'inhalation de NTCSP a provoqué la mortalité de 15% des rats (Warheit et al., 2004). Il a été constaté que les administrations répétées par injection intraveineuse de nanotubes de carbone chez des souris mâles pourraient causer des dommages aux testicules (Bai et al., 2010). Suite à l'exposition de souris à des nanotubes de carbone multi-parois par voie trachéale, il a été démontré qu'il y a une augmentation significative d'endommagement à l'ADN liée au stress oxydant dans les poumons de ces souris exposées (Kato et al., 2012). Sur le plan inflammatoire, différents travaux ont montré une augmentation de neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et macrophages alvéolaires chez des souris exposés à des nanotubes de carbone simple-paroi (Lam et al., 2004 ; Shvedova et al., 2005). Les mêmes observations ont été notées dans une étude qui expose des rats à des nanotubes de carbone multi-

parois (Muller et al., 2005). Ces observations sont associées à l'augmentation de la quantité de cytokines proinflammatoires et notamment du TNF α , de l'IL1b et de l'IL8 (Muller et al., 2005; Shvedova et al., 2005). L'exposition de cellules épithéliales humaines A549 à des NTCSP induit à une mortalité significative qui est de 41 à 52% (Davoren et al., 2007).

b-Comparaison entre nanotube de carbone et amiante

En raison de la structure fibrillaire des NTC, une hypothèse a été émise que leur toxicité pourrait être comparable à celle de l'amiante. *In vitro*, une étude sur des cellules mésothéliales humaines montre qu'un NTCSP avait une cytotoxicité équivalente à celle de l'amiante (Wick et al., 2007). Cependant, une autre étude sur les NTCSP montre que leur cytotoxicité est inférieure à celle de l'amiante (Pacurari et al., 2008). Dans une étude *in vivo*, des souris étaient exposées à de longues fibres d'amiante et à des NTCMP. Les effets observés étaient similaires pour l'amiante et uniquement pour les NTC de longue taille (13 à 56 μ m). Ce n'était pas le cas en présence de fibres de NTC de courte taille (1 à 5 μ m) (Poland et al., 2008). Les auteurs de cet article expliquent que ceci est dû à l'impossibilité des macrophages de phagocyter de trop gros agglomérats de NTC. L'influence de la taille et de l'état d'agglomération est donc un facteur important de l'effet des NTC.

2.3 Noir de carbone

2.3.1 Généralités

Le noir de carbone (NC) est constitué de carbone sous la forme amorphe. Le noir de carbone a été initialement produit en Chine par combustion incomplète dans des lampes à huile (noir de fumée). Le noir de carbone n'est pas produit naturellement dans l'environnement, mais il est fabriqué par pyrolyse contrôlée en phase vapeur et par combustion partielle d'hydrocarbures liquides ou gazeux. C'est une forme de carbone élémentaire obtenu industriellement qui est présente sous forme de particules sphériques agrégées. C'est la forme de carbone élémentaire la plus fortement répandue dû à sa grande utilisation. En 2009, il a été rapporté que la production actuelle de NC, à la fois micrométrique et nanométrique, dépassait les 8 millions de tonnes*. Le NC est contenu dans les gaz de combustion. Il existe divers procédés chimiques industriels produisant différents types de noir de carbone.

Tableau I. Les différents types de noir de carbone.

Type de noir de carbone	Diamètre (nm)	Produit de départ	Procédé chimique
Noir tunnel (Channel Black)	10-30	Gaz naturel	Combustion incomplète
Noir de fourneau (Furnace Black)	10-80	Gaz naturel Liquide aromatique	
Noir de fumée (Lamp black)	50-100	Hydrocarbures de goudron	
Noir d'acétylène (Acetylene Black)	35-70	Acétylène	Décomposition thermique
Noir thermique (Thermal Black)	150-500	Gaz naturel	

* Site internet <http://www.carbon-black.1> consulté en ligne le 13 juillet 2015

2.3.2 Principales caractéristiques et applications

À cause de sa couleur, il est employé comme pigment noir de l'encre de Chine. De plus, il est incorporé dans les encres d'imprimerie. Il est aussi utilisé comme pigment dans d'autres produits comme les peintures, les revêtements et les plastiques. On le retrouve aussi dans les produits cosmétiques comme le mascara et le vernis à ongles. Le noir de carbone est présent dans des produits alimentaires, des produits pharmaceutiques, des pesticides et des emballages alimentaires. En fait, la couleur noire qui est caractéristique du NC dépend de plusieurs caractéristiques physicochimiques, comme la taille des particules et leur état d'agglomération général. Plus le diamètre diminue, plus la couleur est intense. Une deuxième caractéristique du noir de carbone est sa conductivité. Ainsi, il est utilisé dans les piles électriques salines et les câbles souterrains de haut voltage. Le noir de carbone apporte de la résistance à l'usure et de la dureté. Grâce à ses caractéristiques, il est utilisé dans l'industrie du caoutchouc depuis 1972, comme charge renforçante, principalement dans les pneumatiques.

2.2.3 Risque sur la santé

a-Études *in vitro* / *in vivo*

Le noir de carbone peut atteindre la région alvéolaire des poumons, en raison de sa petite taille (CIRC, 1996). Lorsque ces particules sont inhalées, elles sont éliminées du poumon principalement par l'arbre bronchique et par un transport transépithélial via les cellules alvéolaires de type I (CIRC, 1996). Il s'agit du processus de clairance alvéolaire par phagocytose macrophagique. Si ce processus est altéré, une surcharge de particule peut se produire (Oberdörster, 2002). En ce qui concerne la cytotoxicité des nanoparticules de noir de carbone, les résultats sont controversés. Des études montrent que l'exposition d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques, 16HBE, au noir de carbone aboutit à une diminution des cellules vivantes. (Hussain et al., 2012; Val et al., 2009). L'étude du Dr Hussain montre aussi que l'exposition de cette lignée cellulaire induit une apoptose qui est liée à un dysfonctionnement des mitochondries (Hussain et al., 2009, 2010). Toutefois, dans une étude publiée en 2010, il a été démontré qu'il n'y a pas de cytotoxicité suite à l'exposition des cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549) au noir de carbone. Il a été démontré que les nanoparticules de noir de carbone causent de l'inflammation (Li et al., 1999). Ces nanoparticules entraînent la sécrétion de facteurs proinflammatoires comme le GM-CSF (Hussain et al., 2009). Une étude montre que le noir de

carbone est la cause de l'augmentation des interleukines (IL-1 β , IL-6 et IL-8) et une libération de TNF- α et CXCL2 (Val et al., 2009). Une exposition de cellules issues des lignées A549 et BEAS-2B à des nanoparticules de noir de carbone provoque une surexpression de CXCL8, CXCL10 (Øvrevik et al., 2009). Le noir de carbone entraîne des dommages à l'ADN (Mroz et al., 2007 ; Carero et al., 2001). Outre les dommages à l'ADN, l'étude du groupe du Dr Mroz a rapporté une modification de la cinétique du cycle cellulaire suite à l'exposition des cellules A549 au noir de carbone (Mroz et al., 2007). Le noir de carbone a été considéré comme « faiblement mutagène » dans la lignée des cellules épithéliales des souris, plus précisément dans les gènes lacZ et cII (Jacobsen et al., 2007). De nombreuses études *in vitro* ont montré que l'exposition au noir de carbone provoque une augmentation des ROS, ainsi que d'autres indicateurs de stress oxydatif et d'inflammation (Yang et al., 2009; Hussain et al., 2009; Aam et al., 2007; Monteiller et al., 2007; Koike et al., 2006). Les résultats des essais *in vitro* et *in vivo* indiquent clairement que le noir de carbone peut causer des dommages à l'ADN et aux chromosomes. Cependant, l'ensemble des données sur la génotoxicité révèle que la mutagénicité du noir de carbone n'est pas directe en tant que composant réagissant avec l'ADN, mais plutôt secondaire liée aux processus du stress oxydatif et inflammatoire.

b-Études épidémiologiques

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 1996) a classé le noir de carbone dans le groupe 2B (voir annexe I) comme une substance peut-être cancérigène pour l'homme. La principale voie d'exposition au noir de carbone liée à la santé humaine est l'inhalation. Ceci vient du fait que le noir de carbone n'est pas soluble, ainsi l'absorption cutanée a peu de chances de se produire. Il a été démontré que l'exposition au noir de carbone par inhalation est associée à des effets pulmonaires. Cependant, aucun effet n'a été signalé après une exposition aiguë ou chronique par voie orale ou cutanée (OCDE, 2006). Une étude sur les travailleurs d'usines de fabrication de noir de carbone réalisée au Royaume-Uni de 1951 jusqu'à la fin de 1996 rapporte un risque augmenté avec excès de mortalité liée au cancer du poumon (Sorahan et al., 2001). Cette tendance a été observée aussi dans une autre étude de cohorte de travailleurs allemands (Wellmann et al., 2006). Néanmoins, aucun risque en excès de mortalité liée au cancer du poumon n'a été observé dans une étude sur 5 011 employés de 18 usines de production de noir de carbone aux États-Unis (Dell et al., 2006). En 2007, le CIRC signale que

les données sur l'usage de tabac (statut de fumeur) n'ont pas été pris en compte dans les études citées ci-dessus (Baan, 2007). De la sorte, les données scientifiques sont insuffisantes pour conclure que le noir de carbone est une substance cancérigène pour l'homme.

2.4 Différenciation entre les différentes études de nanotoxicité

Une des grandes limitations des études de toxicité *in vitro* des nanoparticules est l'absence de standardisation sur le choix des tests, des concentrations, de la dispersion des nanoparticules ou du temps d'exposition aux cellules (Schweinberger et al., 2011; Krug et al., 2011). Ainsi, la comparaison entre les études est moins pertinentes. La problématique associée à la difficulté de faire des analogies entre les études est aussi justifiée par la différence des propriétés physicochimiques entre les nanoparticules. En fait, pour une même nanoparticule, ses caractéristiques changent tout dépendamment de sa forme (taille, morphologie). Un autre point important à considérer est l'état d'agglomération de ces NPs. En fait, les particules se trouvent rarement sous forme individuelle. Elles ont tendance à former des agglomérats et des agrégats.

3) Voies d'exposition

Il y a une exposition large aussi bien des travailleurs que des utilisateurs (Wand et al., 2007). Il y a différents types d'exposition aux nanoparticules telles qu'une exposition respiratoire (voies respiratoires), une exposition cutanée (peau), une exposition par ingestion (voie gastrointestinale) et par injection (circulation sanguine) (Jin et al., 2008; Oberdoster et al., 2005). Ainsi, en cas d'exposition à des nanoparticules, les organes cibles sur lesquels les effets toxiques pourraient apparaître sont le poumon, la peau et les organes du système gastro-intestinal. Dû à leur petite taille et leur grand coefficient de diffusion, les NPM peuvent rapidement migrer dans l'air (Aitken et al., 2008). Ainsi, il a été démontré que l'exposition respiratoire est la voie d'exposition la plus importante (Kansara et al, 2015). Si les NPM s'avèrent traverser les barrières physiologiques, des organes cibles secondaires pourraient être affectés comme le foie, le cerveau et les reins.

4) Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

4.1 Définition

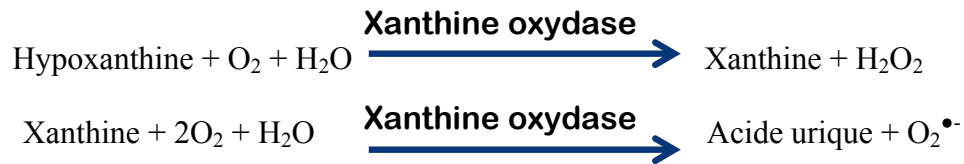
Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, instable, contenant un électron non apparié. Afin de se stabiliser, ce composé réagit avec les molécules les plus stables pour appairier son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant comme un réducteur). Les espèces oxydantes de l'oxygène sont les principales sources pro-oxydantes. L'O₂ est à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species: ROS). Les ROS au sens large regroupent les radicaux libres primaires : anion superoxyde O₂^{•-}, radical hydroxyle OH[•], monoxyde d'azote NO[•] et certaines espèces non-radicalaires : peroxyde d'hydrogène H₂O₂, peroxyde d'azote ONOO⁻, oxygène singulet ¹O₂, peroxyde lipidique LOOH, etc.

4.2 Sources de ROS

Il existe plusieurs sources de ROS comme l'auto-oxydation des petites molécules, la xanthine oxydase, la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et la lipoxygénase. La réaction chimique de Fenton produit des ROS dans la cellule. Les autres sources cellulaires de ROS sont enzymatiques et non-enzymatiques. (Droge et al., 2002; Thannickal et al., 2000).

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones produit du O₂^{•-} (Freeman et al., 1981).

La xanthine oxydase (XO), est une oxydoréductase qui génère des ROS (Harrison et al., 2002). Elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine. Au cours de cette réaction, il y a formation de peroxyde d'hydrogène. De plus, XO catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique en cas de stress comme l'ischémie-reperfusion ou l'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène agit comme un accepteur d'électron formant ainsi l'anion superoxyde O₂^{•-} (McKelvey et al., 1988; Parks et al., 1988).



La NADPH oxydase (NOX) est un complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydo-réductases. Cette enzyme est liée à la membrane plasmique. Elle est un élément clef de la défense immunitaire (Babior et al., 1999). Il a été démontré que la NADPH oxydase phagocytaire représente une source majeure de production de ROS dans le poumon dans le cadre de la réponse immunitaire (Piotrowski et al., 2000). Elle est très présente dans les polynucléaires neutrophiles et les monocytes. En effet, lors de la phagocytose pour la lutte contre les micro-organismes, cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène et produit ainsi du NADP^+ , du H^+ et l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$).



Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Freeman et al., 1983; Turrens et al., 1982). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques et produit ainsi des ROS (Morel et al., 1999).

Les peroxysomes permettent la détoxification de la cellule. Ceci se fait par dégradation du peroxyde d'hydrogène très toxique produit par les peroxysomes grâce à l'importation de dioxygène provenant des mitochondries, par dégradation des acides gras à très longue chaîne ou par synthèse d'acides gras polyinsaturés. Donc, elles sont une source importante de production d' H_2O_2 cellulaire (Bonekamp et al., 2009). Toutefois, l' H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Il se peut qu'une faible quantité H_2O_2 , produit au niveau du peroxysome, échappe à la catalase.

La lipoxygénase est une enzyme qui contient du fer. Elle catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Brash, 1999). L'acide arachidonique, provenant de l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A2, est le substrat de la lipoxygénase pour la synthèse des leucotriènes. Cette synthèse met en jeu une série d'oxydations qui implique la production de ROS (Chen et al., 2014).

La NOS appartient à une famille enzymatique qui catalyse la conversion de la L-arginine en L-citrulline. Cette réaction se fait en produisant de l'oxyde nitrique (NO). Il existe 3 isoformes de NOS: une forme neuronale (nNOS), une forme endothéliale (eNOS) et une forme inductible (iNOS). Pour être active, eNOS se couple à des cofacteurs. Il a été observé que lorsque eNOS est découplée, cette dernière réduit une molécule d'oxygène plutôt qu'une molécule de L-arginine et qu'ainsi l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est produit (Vasquez-Vivar et al., 1998).

La mitochondrie est la principale source de ROS par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. 90% des ROS cellulaires sont produits par les mitochondries (Balaban et al., 2005). Une étude *in vitro* a montré qu'environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie ne sont pas complètement réduits. Cette réduction incomplète génère des ROS (Boveris et al., 1972). La mitochondrie est un organite intracellulaire responsable de la majorité de la production de l'énergie sous forme d'ATP pour la cellule. Ainsi, cet organite représente une structure cruciale du fonctionnement cellulaire. L'association d'une cinquantaine de polypeptides forme les quatre complexes qui constituent la chaîne respiratoire mitochondriale. Chaque complexe est indépendant et contient des groupements prosthétiques engagés dans une série de réactions d'oxydo-réduction.

Complexe I : NADH-Ubiquinone oxydoréductase

Complexe II : Succinate-ubiquinone oxydoréductase

Complexe III : Complexe b-c1 (ubiquinol-cytochrome C réductase)

Complexe IV : Cytochrome c oxydase

La phosphorylation oxydative est à l'origine de la production d'ATP. Elle se fait via le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire. Ce flux établit un gradient de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie. Au cours de la réduction de substrats, les électrons sont

extraits et transférés à une molécule d'oxygène à travers la chaîne enzymatique formant le complexe I à IV. À la dernière étape, la cytochrome c oxydase assure la réduction complète de l'O₂ en eau. Il arrive que des électrons échappent de la chaîne de transfert d'électrons et réagissent avec une molécule d'oxygène et forment un anion superoxyde. Les deux sites où les électrons s'échappent le plus sont les complexes I et III (Cadenas et al., 1977; Turrens et al., 1980). L' O₂^{•-} est immédiatement transformé en H₂O₂ par la manganèse superoxyde dismutase dans la matrice mitochondriale (Chance et al., 1979).

De plus, il a été démontré que lorsque la mitochondrie utilise le palmitoyl-carnitine comme substrat pour sa respiration, elle produit du H₂O₂ (Boveris et al., 1972 ;1973).

Les ROS peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. L'O₂⁻ peut réagir avec l'oxyde d'azote (NO) et produire du peroxynitrite (ONOO⁻). Ce produit inhibe la chaîne respiratoire (Shiva et al., 2004). De plus, il endommage les différents composants mitochondriaux comme la membrane et l'ADN mitochondrial. Une altération de l'ADN mitochondrial (ADNmt) pourrait à son tour altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire et déclencher un cercle vicieux augmentant la production de ROS.

5) Système de défense contre les ROS

5.1 Antioxydants

L'exposition aux ROS oblige les cellules à développer des systèmes de défense. Il s'agit des mécanismes antioxydants. Ces mécanismes permettent de maintenir un niveau non cytotoxique de ROS. Ainsi, un antioxydant est défini comme toute substance capable d'entrer en compétition avec des substrats oxydables pour retarder ou empêcher leur oxydation (Comhair, 2002; Droge, 2002; Mates et al 1999; Powers et al., 1999). Les mécanismes antioxydants sont des mécanismes préventifs, de défense et de réparation. Les antioxydants peuvent être enzymatiques : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), la catalase, l'hème-oxygénase, la glutathion réductase ; ou non enzymatiques : le glutathion (GSH), la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (tocophérol), les caroténoïdes, les flavonoïdes, etc.

5.2 Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase, l'hème-oxygénase, la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense contre les ROS.

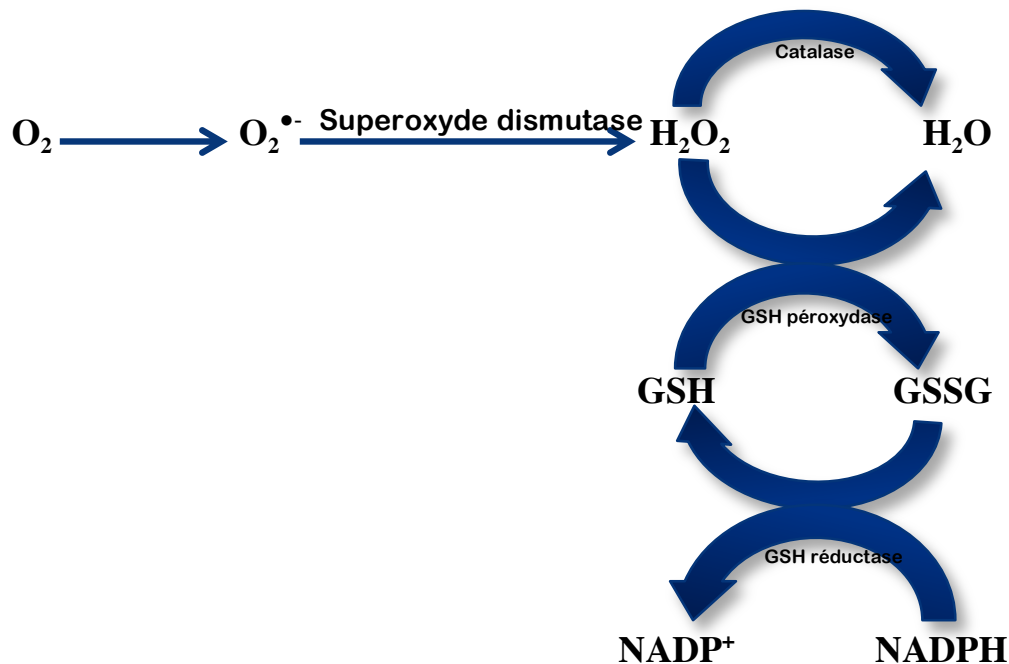


Figure 1. Schéma des defences par les antioxydants enzymatiques

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il y a trois isoformes de SOD : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été démontré que la forme cytosolique Cu/Zn-SOD est un élément clef dans l'élimination des ROS (Li., 1995).

La catalase contrôle la concentration intracellulaire en peroxyde d'hydrogène (Gaetani et al., 1996; Mueller et al., 1997). Elle est localisée principalement dans les peroxysome, mais se trouve aussi dans le cytoplasme en plus faible quantité. Elle joue un rôle important en présence de forte concentration en H_2O_2 . En d'autres mots, contrairement à la GPx, son affinité pour l' H_2O_2 est élevée seulement lorsque les teneurs en H_2O_2 sont accrue (Mates et al., 1999 ; Powers et al., 1999).

La glutathion peroxydase (GPx) catalyse la réduction de l' H_2O_2 et des hydroperoxydes. La prise en charge de l' H_2O_2 par la GSH peroxydase prévient la formation de composés réactifs comme OH^{\bullet} (216). Face au stress oxydant, cette enzyme est considérée comme étant plus

protectrice que la catalase ou la SOD (Toussaint et al., 1993). GPx nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron (Mates et al., 1999). Le glutathion disulfure (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par le glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron. Ces deux enzymes (GPx et GR) sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule (Jones et al., 2003; Nogueira et al., 2004). Un ratio (GSH/GSSG) ≥ 1 détermine une réponse anti-oxydative. Donc la cellule compense pour le stress oxydatif. Un ratio (GSH/GSSG) < 1 détermine une réponse oxydative non compensée par la cellule.

5.3 Antioxydants non enzymatiques

Le glutathion (GSH) est un tripeptide qui se trouve dans le cytosol, le noyau et la mitochondrie. Il est synthétisé dans le cytosol. Sa forme oxydée est le glutathion disulfure (GSSG). Tel qu'expliqué avant, le ratio GSH/GSSG est un bon marqueur du stress oxydant intracellulaire (Ji et al., 1992). GSH est un cofacteur d'enzymes antioxydantes comme GPx. Il protège la cellule en éliminant directement le radical hydroxyle et l'anion superoxyde. De plus, il détoxifie le peroxyde d'hydrogène et les lipides peroxydés par l'action de la glutathione peroxydase (Masella et al., 2005). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamine E et C (Packer et al., 1997). En fait, il est capable de régénérer la vitamine C et E en restituant leur forme active.

La vitamine E (α -tocophérol) est liposoluble. Elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Evans., 2000; Packer et al., 1997). Cependant, à forte concentration, la vitamine E oxydée peut avoir des propriétés prooxydantes (Dillard, 1980).

La vitamine C (acide ascorbique) est hydrosoluble. Elle se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut capter directement l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyl OH^{\bullet} . Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Evans., 2000; Packer et al., 1997).

6) Effets des ROS sur la cellule

Les ROS sont constamment produits sous condition normale en conséquence de la respiration aérobie. Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre de la balance entre les sources prooxydantes et les systèmes antioxydants, et ce, en faveur des oxydants qui mènent potentiellement à des dommages cellulaires (Sies, 1997). En d'autres mots, une production accrue de ROS cause le stress oxydatif. La production de ROS est en général considérée comme une réponse adaptative aux événements toxiques induits par les nanoparticules. Ainsi, la production intra et extracellulaire de ROS pourrait être à l'origine des lésions intracellulaires: dégradations moléculaires et protéiques, peroxydation lipidique, endommagement de l'ADN ; et des dysfonctionnements cellulaires : excès de la prolifération, apoptose, dépôts lipidiques anormaux, mutagénicité. La balance entre les sources pro-oxydantes et antioxydants déterminerait le type de réponse, adaptative pour une production de ROS. Une production faible de ROS induit la mort cellulaire par apoptose alors qu'une forte production cause la nécrose. De façon chronique, le stress oxydatif peut favoriser l'apparition de fibroses et emphysèmes pulmonaires, cancers, troubles cardio-vasculaires ou neurodégénératifs (Favier, 2006).

6.1 Peroxydation lipidique

La peroxydation entraîne la conversion des lipides insaturés en lipides hydroperoxydes. Les membranes deviennent plus fluides. Quant à l'activité des protéines membranaires, elle est modifiée. Le flux des solutés cytosoliques se trouve modifié aussi. Une peroxydation massive des lipides entraîne la mort cellulaire (Mattie et al., 2001). Les acides gras polyinsaturés (polyunsaturated fatty acids, PUFA) sont plus susceptibles aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont eux-même très réactifs. La peroxydation de lipides est accompagnée d'une production d'une grande variété de produits qui réagissent avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés, on cite l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4- HNE) (Marnett, 1999). Une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA cause la mutagénicité. Le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule.

6.2 Oxydation des protéines

Comme les lipides, les ROS peuvent oxyder les protéines. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine., 2002; Peng et al., 2000). Il existe deux sortes d'oxydation des protéines: 1) briser les liaisons peptidiques et modifier la chaîne protéique, 2) modifier les peptides en ajoutant des produits issus de la peroxydation lipidique. Les lésions oxydatives entraînent des clivages peptidiques, des ponts disulfures, des modifications de la chaîne des acides aminés (Davies et al., 1999; 2005). Ces changements conduisent à une modification structurale des protéines. Les conséquences issues de ces changements sont la perte de fonction catalytique, l'augmentation de la sensibilité aux protéases, etc. (Levine, 2002). Ceci peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (Grune et al., 2003; Stadtman et al., 2006).

6.3 Dommage de l'ADN

Les ROS altèrent directement l'ADN. Il existe deux type d'ADN: l'ADN nucléaire (ADNn) et l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'ADN mitochondrial est plus susceptible au stress oxydant. Ainsi, le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn (Stevnsner, 2002). Donc, L'ADNmt est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de: 1) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, 2) sa localisation proche de la membrane interne, 3) des mécanismes de réparations frustrés, et 4) une structure circulaire sans intron augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Ames et al, 1993; Cann & Wilson, 1983; Cortopassi et al 1992; Richter et al, 1988). Les ROS causent des cassures doubles et simples brins à l'ADN, entraînent des réarrangements et des ajouts de sucre ou de phosphate au niveau des nucléotides (Friedberg et al., 2004). De plus, des études ont montré que les ROS peuvent léser les protéines nécessaires à la préservation de l'intégrité de l'ADN (Serero et al., 2008; Youn et al., 2008). Ils sont également à l'origine d'une instabilité chromosomique notamment par lésions des télomères (Stratton et al, 1994).

7) Objectifs de recherche

Les nanotechnologies semblent avoir pris pied dans notre vie quotidienne. Il n'existe pas actuellement de normes établies pour déterminer si les valeurs d'exposition aux diverses nanoparticules manufacturées constitueraient un risque pour les personnes exposées. De plus, la conséquence de l'exposition à ces NPM sur le développement d'une ou plusieurs maladies à plus ou moins long terme n'a pas été actuellement démontrée. L'étude de Song et collaborateurs attribuant le décès de deux ouvrières suite à leur exposition à des NPM de polyacrylate dans l'environnement de travail est controversée (Song et al., 2009). En effet, le Dr Bryony Ross, expert et éditeur du centre international SAFENANO, a montré que cette étude comporterait plusieurs éléments de controverses qui ne permettraient pas de conclure avec certitude d'une relation de cause à effet (Ross, 2009). Bien que le risque sur la santé des travailleurs reste à démontrer, l'ensemble de la littérature des études de nanotoxicologie dans des modèles animaux (*in vivo*) et des modèles cellulaires (*in vitro*) indiquent un risque élevé de toxicité chez l'humain dans le cas d'une exposition à un vaste nombre de NPM de divers types comme les nanotubes de carbone (Bakand et al., 2012). La détection et la caractérisation des nanoparticules manufacturées (NPM) est l'une des premières étapes pour contrôler et diminuer leurs risques potentiels sur la santé humaine et l'environnement. Différents systèmes d'échantillonnage dans l'air existent pour l'évaluation d'une exposition aux NPM. Cependant, ils ne mesurent pas le risque potentiel de cette exposition à la santé humaine ni les mécanismes cellulaires qui en seraient responsables. Nos objectifs de recherche sont 1) Évaluer les effets de différents types de nanoparticules sur des cellules pulmonaires humaines et 2) identifier de nouveaux mécanismes intracellulaires activés lors de l'exposition à divers types de NPM. Pour ce travail, 3 types de NPM ont été choisis sur la base de leur production mondiale et leur utilisation importante dans les produits dérivés de la nanotechnologie : nanoparticule de dioxyde de titane de type anatase (TiO_2), noir de carbone et nanotubes de carbone simple paroi (NTCSP). Nous avons étudié la viabilité cellulaire et le stress oxydatif suite à l'exposition de cellules épithéliales alvéolaires, lignée A549, aux NPM. La lignée A549 est le modèle cellulaire majeur utilisé dans les études de biosécurité des nanomatériaux (Jugan et Al., 2012). Cette lignée est utilisée comme modèle de pneumocytes de type II. Ce sont des cellules épithéliales alvéolaires issues d'un adénocarcinome humain.

Matériel et Méthodes

1) Culture cellulaire

Les cellules A549 utilisées dans notre laboratoire provenaient de la compagnie de ‘American Type Culture Collection’ (ATCC) (Manassa, VA, États-Unis). Les cellules A549 sont stockées à l’azote liquide dans des tubes de 1 mL à raison de 2×10^6 cellules par tube contenant 10% de DMSO.

1.1 Décongélation des cellules

Le tube de 1 mL contenant les cellules A549 congelées est mis au bain-marie à 37 °C de 2 à 5 min. Après décongélation, le volume de 1 mL de cellules est mis dans un tube de 15 mL avec 7 mL de milieu de culture. Le milieu de culture dans lequel sont cultivées les cellules est le milieu DMEM-F12 (HyClone, Logan, UT, États-Unis), supplémenté avec 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) inactivé (HyClone), 2 mM de L-glutamine (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), 100 U/mL de pénicilline (Life technologies) et 100 µg/mL de streptomycine (Life technologies). Ensuite, elles sont centrifugées à 400 rcf (rcf-relative centrifugal force) pendant 3 min, à 20°C. Après centrifugation, le surnageant est jeté car il contient du DMSO, qui est toxique pour les cellules. Pour resuspendre le culot, le tube est gratté sur la grille de la hotte et 5 mL de milieu complet sont ajoutés. La suspension cellulaire est remplie dans une flasque de culture à bouchon filtrant de 25 cm² et placée dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d’humidité. Le volume de milieu recommandé est de 0.2 mL/cm², soit 5 mL pour les flasques utilisées. Les cellules consomment les nutriments du milieu et produisent des métabolites. Il faut donc renouveler le milieu de culture régulièrement. Le lendemain de la décongélation des cellules, le milieu est changé.

1.2 Passage cellulaire

Grâce à leurs protéines d’adhérence, les cellules A549 peuvent adhérer fortement aux parois de la flasque. Ainsi, ces cellules vont croître et tapisser le fond de la flasque. Lorsque ces dernières recouvrent 80% de la surface de culture (80% de confluence), il faut procéder au passage cellulaire. Pour ce faire, tout d’abord, le contenu de la flasque est vidé dans un béccher réservé aux déchets liquides. Les cellules adhérentes sont lavées avec 5 mL du tampon phosphate salin (PBS 1X- voir annexe II) qui permet d’enlever toute trace du milieu de culture. Afin de décoller les cellules du fond de la flasque, 2 mL d’une solution de trypsine (HyClone) sont ajoutés et la

flasque est placée dans l'incubateur pendant 2h à 37°C, 5% CO₂. La trypsine permet l'hydrolyse des liaisons peptidiques responsables de l'adhérence cellulaire. Cette réaction enzymatique est inactivée suite à l'ajout de 2 mL de milieu complet. En fait, le sérum de veau fœtal (SVF) contenu dans le milieu complet inactive la trypsine. Par la suite, le volume total (trypsine + milieu complet) est prélevé et mis dans un tube stérile de 15 mL. Les cellules contenues dans le tube de 15 mL sont centrifugées à 400g durant 3 minutes. Le culot de cellules est resuspendu par grattage après avoir vidé le surnageant et homogénéisé dans un volume de 2 mL de milieu complet permettant le compte cellulaire.

1.3 Comptage cellulaire

Dans les expériences décrites ci-dessous, des échantillons sont définis en fonction du nombre de cellules qui a été évalué comme suit. D'un point de vue statistique, le comptage cellulaire se base sur la numération d'un prélèvement de cet échantillon, dans le but d'estimer la taille globale de l'échantillon. Pour compter les cellules, 100 µL de la suspension cellulaire sont prélevés et mis dans un tube Eppendorf. On ajoute 15 µL de la solution de bleu de Trypan 0,4% (Sigma Aldrich®). La coloration au bleu de Trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. Le bleu de Trypan a la capacité de rentrer dans les cellules. Une fois dans la cellule, ce réactif entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter la molécule en question dans le milieu extérieur. Ce mécanisme d'exclusion nécessite de l'énergie, soit de l'ATP. Ainsi, seulement les cellules vivantes expulseront la molécule et resteront incolores au microscope. Contrairement à cela, une cellule morte deviendra bleue. Une fois que l'Eppendorf contenant les cellules et le bleu de Trypan a bien été mélangé, 15 µL du mélange sont ajoutés dans le sillon de chargement d'une chambre de l'hématimètre de Neubauer, recouverte d'une lamelle (Figure 2). Le comptage se fait visuellement à l'aide d'un microscope (Leica Microsystems, Canada).

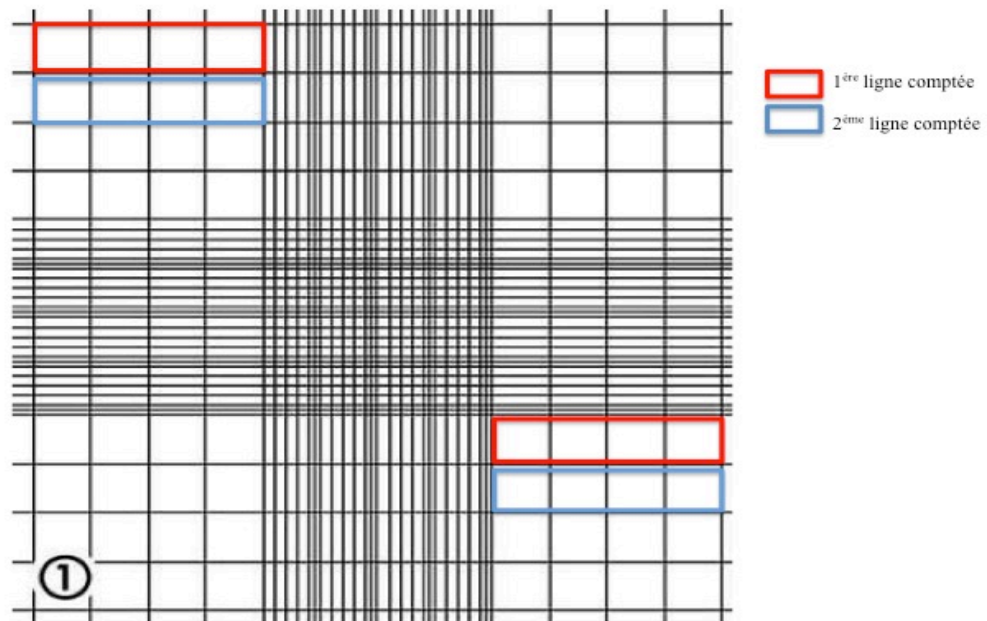


Figure 2. Hématimètre de Neubauer

Tout d'abord, il faut compter le nombre de cellules vivantes présentes sur la première ligne d'un des quadrillages de l'hématimètre. Cette ligne correspond aux 4 carreaux en haut à gauche et aux 4 carreaux en bas à droite, tel qu'indiqué sur la figure ci-dessus en rouge. En fonction du nombre de cellules comptées sur la première ligne, il faut se référer au tableau suivant. Ainsi, selon le nombre de lignes comptées, il faut déterminer le facteur multiplicatif.

Tableau II. Détermination du facteur multiplicatif selon le nombre de lignes comptées d'un des quadrillages de l'hématimètre de Neubauer.

Nombre de cellules comptées sur la 1ère ligne	Nombre de ligne à compter	Facteur multiplicatif
> 40 cellules	1	8
≈ 20 cellules	2	4
< 20 cellules	4	1

Une fois le facteur multiplicatif déterminé, le nombre de cellule contenu dans l'échantillon peut être calculé grâce à la formule suivante :

Nombre de cellules vivantes dans l'échantillon = $3000 * d * n * f * v$

Avec d : facteur de dilution

n : nombre de cellules vivantes comptées

f : facteur multiplicatif

v : volume de l'échantillon

2) Nanoparticules manufacturées

Trois types de nanoparticules ont été choisies sur la base de leur production mondiale et leur utilisation importante dans les produits dérivés de la nanotechnologie : nanoparticules de dioxyde de titane de type anatase, nanotubes de carbone simple paroi et noir de carbone.

2.1 Dioxyde de titane de type anatase – TiO₂

Le dioxyde de titane de type anatase TiO₂ produit par la compagnie ‘Nanostructured & Amorphous Materials, Inc’ (Houston, Texas, États-Unis) a été utilisé pour cette étude. Sa taille varie entre 5 et 30 nm. Il s’agit d’un liquide blanc transparent. Les concentrations utilisées pour les différents tests sont de 10 à 100 µg/mL. Les concentrations choisies ont été définies en se basant sur plusieurs études de nanotoxicologie (Jugan et al., 2012 ; Barillet et al., 2010).

2.2 Nanotubes de carbone simple paroi – RN000

Les nanotubes de carbone simple paroi, RN-000, sont fournis par la ‘Société Raymor Nanotech’ (Boisbriand, Québec, Canada). Ils contiennent 40% de NTC et le reste, soit le 60 %, est constitué d’impuretés qui sont composées d’un mélange de catalyseurs (Nickel et Yttrium) et de carbone amorphe. Leur taille est comprise entre 10 à 15 nm. Les concentrations préparées pour les différents tests effectués varient de 10 à 1000 µg/mL. Les concentrations ont été choisies en se basant sur l’étude de Mueller et al. (2008) et l’étude de Davoren et al. (2007).

2.3 Noir de carbone – LB101

Le noir de carbone, LB101, synthétisé par la compagnie ‘Evonik Industries’ (Rellinghauser Straße, Allemagne) a été utilisé pour les expériences. Cette nanoparticule a une taille de 95nm. C’est une poudre noire. Pour notre étude, nous avons préparé des concentrations de LB101 qui varient de 1.25 à 80 µg/mL. Les concentrations ont été choisies en se basant sur l’étude de L’Azou et al. (2008).

2.4 Dispersion des nanoparticules manufacturées

Les nanotubes de carbone simple paroi et le noir de carbone sont sous forme solide (cristaux-poudre). Afin de préparer les concentrations à étudier, il faut disperser ces deux nanoparticules et bien les homogénéiser. Ainsi, pour disperser 2 mg/mL de NPM, une suspension composée de 0,05% BSA et de 0,5% d'éthanol (pureté : 96-100%) contenu dans de l'eau distillée est ajoutée. Ensuite, la suspension de NPM est dispersée pendant 16 minutes, à l'aide du sonicateur Ultrasonic cleaner Branson 200 (Process Equipment & Supply, Cleveland, OH, USA).

3) Tests de viabilité cellulaire

3.1 Test MTS

Le test MTS est une méthode de dosage par colorimétrie utilisée pour évaluer la viabilité cellulaire grâce à l'activité déshydrogénase des mitochondries des cellules vivantes. Le réactif MTS (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium de couleur jaune pâle peut traverser la membrane cellulaire. Dans la cellule, ce dernier est réduit par la succinate déshydrogénase des cellules vivantes actives en formazan. Ainsi, la quantité de formazan produite est proportionnelle au nombre de cellules viables. Le formazan, de couleur jaune foncé, est un composé soluble dans le milieu de culture cellulaire. La production de ce produit est suivie en mesurant l'absorbance par spectrophotométrie.

Protocole

La trousse employée est le CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA) qui comprend les réactifs PMS, un réactif de couplage d'électron (méthosulfate de phénazine) et MTS (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, sel interne). Pour effectuer le test, des cellules A549 sont ensemencées sur une plaque transparente stérile de 96 puits à raison de 5000 cellules/puits pendant 24h à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, le milieu est aspiré. Un lavage est fait avec 100 µL de PBS 1X. Ensuite, les cellules adhérentes au fond des puits sont exposées aux NPM pour différentes durées de temps (1 plaque par temps d'exposition). Suite à l'exposition aux NPM, un mélange 1 :20 (PMS: MTS) est préparé et 20 µL de ce mélange est ajouté à chaque puits. Après 90 min d'incubation de la plaque à 37°C, 5% CO₂, la densité optique est mesurée à 490 nm avec une longueur d'onde de référence de 690 nm en utilisant un lecteur de microplaques ELISA Ultra Microplate Reader ELX808IU (Bio-Tek Instruments, USA) et du logiciel KC4 (version 2.7 rev 8). Chaque condition d'exposition est effectuée en duplicata et 4 expériences distinctes ont été réalisées. Chaque expérience comporte deux témoins. Le premier est un témoin positif où les cellules sont exposées au peroxyde d'hydrogène H₂O₂; Le second est un témoin négatif où les cellules ne sont pas exposées aux NPM. Cependant, le second témoin n'est pas présenté car les résultats sont exprimés en forme de pourcentage relatif par rapport à ce témoin.

La viabilité cellulaire est calculée comme suit:

% Viabilité cellulaire = [(DO des cellules exposées aux NPM) / (DO des cellules de contrôle sans NPM)] x 100

où DO est la densité optique.

3.2 Test PrestoBlue®

Ce test permet de mesurer la viabilité cellulaire grâce au pouvoir réducteur de la cellule. Pour cet essai, le réactif résazurine (7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one 10-oxyde), un composé de couleur bleue perméable aux cellules est ajouté aux cellules après leur exposition aux NPM. Si les cellules sont viables, l'environnement réducteur dans le cytosol de la cellule va permettre de réduire le résazurine (non fluorescent) en résorufine qui est d'une couleur rouge et fortement fluorescent.

Protocole

La trousse utilisée est le PrestoBlue® Cell Viability Reagent (Life technologies, Canada).

Pour effectuer le test, des cellules A549 sontensemencées sur une plaque noire stérile de 96 puits en raison de 5000 cellules/puits pendant 24h à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, le milieu est aspiré. Un lavage est fait avec 100 µL de PBS 1X. Ensuite, les cellules adhérentes au fond des puits sont exposées aux NPM pour différentes durées (1 plaque par temps d'exposition). Suite à l'exposition aux NPM, 10 µL de la solution de la trousse est ajouté à chaque puits et la plaque est incubée pendant 30 min à 37°C, 5% CO₂. La lecture de la fluorescence est faite grâce au POLARstar Optima de BMG LABTECH (Guelph, ON, CA) par le logiciel OPTIMA Control (version 2.00 rev 3). L'intensité de fluorescence est mesurée à une $\lambda_{\text{excitation}} = 560 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 690 \text{ nm}$. Chaque condition d'exposition est effectuée en duplicata et 4 expériences distinctes ont été réalisées. Chaque expérience comporte deux témoins. Le premier est un témoin positif où les cellules sont exposées au peroxyde d'hydrogène H₂O₂; Le second est un témoin négatif où les cellules ne sont pas exposées aux NPM. Cependant, le second témoin n'est pas présenté car les résultats sont exprimés en forme de pourcentage relatif par rapport à ce témoin.

La viabilité cellulaire est calculée comme suit:

% Viabilité cellulaire = [(intensité de la fluorescence des cellules exposées aux NPM) / (intensité de la fluorescence des cellules de contrôle sans NPM)] x 100

3.3 Test d'exclusion au bleu de Trypan

La coloration au bleu de Trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. Le bleu de Trypan a la capacité de rentrer dans les cellules. Une fois dans la cellule, ce réactif entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter la molécule en question dans le milieu extérieur. Ce mécanisme d'exclusion nécessite de l'énergie, soit de l'ATP. Ainsi, seulement les cellules vivantes expulseront la molécule et resteront incolores au microscope. Contrairement à cela, une cellule morte deviendra bleue.

Protocole

Pour cet essai, les cellules sontensemencées sur des plaques de 12 puits. Suite à l'exposition aux NPM, une solution de trypsine (HyClone) est ajoutée afin de détacher les cellules de la surface du puits. Ensuite, les culots cellulaires sont remis en suspension en présence de la solution de bleu de Trypan 0,4% (Sigma Aldrich®) et comptées à l'aide d'un hémacytomètre. Chaque condition d'exposition est effectuée en duplicata et 4 expériences distinctes ont été réalisées. Chaque expérience comporte deux témoins. Le premier est un témoin positif où les cellules sont exposées au peroxyde d'hydrogène H₂O₂; Le second est un témoin négatif où les cellules ne sont pas exposées aux NPM. Cependant, le second témoin n'est pas présenté car les résultats sont exprimés en forme de pourcentage relatif par rapport à ce témoin.

La viabilité cellulaire est calculée comme suit:

$$\% \text{ Viabilité cellulaire} = [(cellules \text{ totales}) - (cellules \text{ colorées en bleu}) / cellules \text{ totales}] \times 100$$

4) Étude du stress oxydatif

4.1 Mesure du ROS intracellulaire

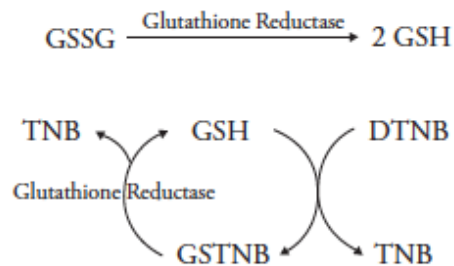
Le but de ce test est de mesurer la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par l'utilisation de l'essai DCFH-DA. 5-(and-6)-carboxy-2',7'-difluorodihydrofluorescein diacetate est une molécule non-fluorescente qui a la capacité de pénétrer à travers la membrane cellulaire. À l'intérieur de la cellule, le DCFH-DA est désacétylé grâce aux estérases. Ainsi, on obtient du DCFH. L'oxydation par les ROS permet de transformer le DCFH en DCF qui est fluorescent. Donc, plus il y a production de DCF, plus la fluorescence augmente.

Protocole

Pour effectuer le test, des cellules A549 sontensemencées sur une plaque noire stérile de 96 puits en raison de 5000 cellules/puits pendant 24h à 37°C, 5% CO₂ et 95% d'humidité. Le lendemain, le milieu est aspiré et un lavage est fait avec du PBS1X. Suite au lavage, les cellules sont incubées avec 20 µM de DCFH-DA (Invitrogen, Canada) pendant 40 min. DCFH-DA est dilué dans du milieu Krebs. Le tampon Krebs est préparé à partir de 100 mg/L Na₂HPO₄, 46.8 mg/L MgCl₂, 340 mg/L KCl, 1260 mg/L NaHCO₃, 7000 mg/L NaCl, 180 mg/L NaH₂PO₄ et 1800 mg/L D-glucose. Ensuite, le milieu est aspiré et les cellules sont exposées aux stimulants (nanoparticules manufacturées (NPM) ou H₂O₂). Après l'exposition, la lecture de la fluorescence est faite grâce au POLARstar Optima de BMG LABTECH (Guelph, ON, CA) par le logiciel OPTIMA Control (version 2.00 rev 3). L'intensité de fluorescence est mesurée à une $\lambda_{\text{excitation}} = 490$ nm et $\lambda_{\text{émission}} = 517$ nm. Chaque condition d'exposition est effectuée en duplicata et 4 expériences distinctes ont été réalisées. Chaque expérience comporte deux témoins. Le premier est un témoin positif où les cellules sont exposées au peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Le second est un témoin négatif où les cellules ne sont pas exposées aux NPM.

4.2 Mesure du glutathion

À l'état basal, il existe un équilibre entre les radicaux libres produits et les défenses anti-oxydantes. En effet, la cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ROS comme le glutathion. Le glutathion est un tripeptide γ -glutamylcysteinylglycine. Il y a deux formes de glutathion; la forme réduite (GSH) et la forme oxydée (GSSG). La trousse utilisée est 'Glutathione Assay Kit' (Cayman Chemical Company, Etats-Unis). Cet essai est basé sur le procédé enzymatique de recyclage, en utilisant la glutathion réductase, pour la quantification de GSH. Le groupe sulfhydryle du glutathion réagit avec le DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2- (acide nitrobenzoïque) et produit le 5-thio-2-nitrobenzoïque qui est de couleur jaune (TNB). Le disulfure mixte, GSTNB (entre le GSH et TNB), produit de manière constante, est recyclé par la glutathion réductase à recycler pour donner du GSH. Au cours de ce recyclage, il y a production de plus de TNB. Le taux de production TNB est directement proportionnel à cette réaction de recyclage qui est à son tour directement proportionnelle à la concentration de GSH dans l'échantillon. La mesure de l'absorbance à 405 nm du TNB fournit une estimation précise du GSH totaux dans l'échantillon.



GSH est oxydé en GSSG. En présence de Vinyl-pyridine (VP), le dosage de GSSG est effectué .



Une fois le GSSG mesuré, on le soustrait du GSH total pour obtenir la quantité en GSH. Ainsi le kit Cayman permet à la fois de mesurer la forme réduite, GSH, et la forme oxydée, GSSG. Un ratio des deux formes est par la suite calculé. Un ratio $(\text{GSH}/\text{GSSG}) \geq 1$ détermine une réponse anti-oxydante. Donc la cellule compense pour le stress oxydatif. Un ratio $(\text{GSH}/\text{GSSG}) < 1$ détermine une réponse oxydative non compensée par la cellule.

Protocole

Pour effectuer le test, des cellules A549 sontensemencées sur une plaque transparente stérile de 96 puits en raison de 5000 cellules/puits pendant 24h à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, le milieu est aspiré et un lavage est fait avec du PBS1X. Suite au lavage, les cellules sont exposées aux nanoparticules. Après l'exposition, les surnageants sont transférés sur une autre plaque en duplicata. Des standards de GSSG sont préparés pour avoir des concentrations de 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 et 8 µM. Chaque standard est ajouté dans la nouvelle plaque en duplicata. La quantification de GSSG, est accomplie d'abord en dérivant le GSH avec le 2-vinylpyridine. Ainsi, du 2-vinylpyridine en simplicata est ajouté aux puits pour chaque série (standards, surnageants). La plaque est incubée pendant 1 heure à température de la pièce. Pendant ce temps, les autres réactifs sont préparés. Après l'heure, le cocktail contenant tout les réactifs est ajouté à chaque puits incluant les échantillons et les standards. La plaque est ensuite couverte avec du papier d'aluminium et elle est mise sur l'agitateur. Au bout de 25 min, la densité optique est mesurée à 405 nm utilisant un lecteur de microplaques ELISA Ultra Microplate Reader ELX808IU (Bio-Tek Instruments, USA) et du logiciel KC4 (version 2.7 rev 8). Chaque condition d'exposition est effectuée en duplicata et 4 expériences distinctes ont été réalisées. Chaque expérience comporte un témoin négatif où les cellules ne sont pas exposées aux NPM.

5)Analyse Statistique

Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur-type. Chaque condition d'exposition a été étudiée dans 4 expériences distinctes, et pour chacune les mesures ont été effectuées en duplicata. Une analyse ANOVA à deux facteurs a été réalisée en fonction des concentrations des NPM (5 niveaux) et des différentes durées d'exposition (4 niveaux). S'il y avait une interaction significative entre les deux facteurs, une décomposition selon Field* a été faite. S'il y avait une différence significative entre les différents niveaux d'un des facteurs analysés, un test post-hoc a été effectué (correction de Bonferroni). Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS®. $p < 0.05$ a été considéré comme le seuil pour rejeter l'hypothèse nulle.

*Field, A. (2009). Discovering statistics using SPSS. London, SAGE Publications Ltd.

Résultats

Résultats avec le dioxyde de titane de type anatase

1. Étude de la viabilité cellulaire

1.1 Test MTS

Le premier test effectué, soit le test du MTS (Figure 3), permet d'évaluer la viabilité cellulaire grâce à l'activité déshydrogénase des mitochondries des cellules vivantes. Le H₂O₂ (200 µM) sert de témoin positif. Ainsi, on remarque une diminution de plus de 50% de la viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules A549 à du peroxyde d'hydrogène, peu importe le temps d'exposition.

La viabilité cellulaire a été testée en présence de différentes concentrations de TiO₂ : 10, 30, 50, 70 et 100 µg/mL. Les résultats nous indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes concentrations étudiées ($F(4, 140) = 1.159; p > 0.05$).

Cependant, nous avons observé que le temps d'exposition (1h, 4h, 8h et 24h) au dioxyde de titane induisait une différence significative sur la survie cellulaire ($F(3,140) = 42.224; p < 0.05$).

Toutefois la diminution de la survie cellulaire à la suite d'une exposition au TiO₂ est nettement plus petite que celle observée avec le H₂O₂. Une analyse post-hoc nous indique une augmentation significative de la survie à 4h, 8h et 24h en comparaison à la survie à 1h (Figure 3; $p < 0.05$). Aucune interaction significative n'a été relevée entre les deux facteurs (concentration et temps d'exposition : $F(12, 140) = 1.105; p > 0.05$).

En résumé, le test MTS montre qu'une exposition des cellules A549 à des concentrations de TiO₂ (5-30 nm) comprises entre 10 et 100 µg/mL pour des périodes variant entre 1h et 24h induit une faible, mais significative, diminution de la viabilité cellulaire (Figure 3).

1.2 Test PrestoBlue

Pour confirmer les résultats obtenus par le test MTS, nous avons effectué un autre test de mesure de viabilité cellulaire (PrestoBlue) qui se base sur le pouvoir réducteur de la cellule (Figure 4). Les différentes concentrations de TiO_2 étudiées n'ont pas d'effet significatif sur l'altération de la viabilité cellulaire ($F(4, 140) = 2.006$; $p > 0.05$).

Toutefois l'analyse nous indique un effet significatif du facteur temps d'exposition ($F(3,140) = 5.515$; $P < 0.05$). Selon l'analyse post hoc, la différence est significative entre 4h et 8h ainsi qu'entre 8h et 24h.

Nous avons également noté une interaction significative entre les facteurs concentrations et temps d'exposition ($F(12,140) = 1.844$; $p < 0.05$). Après une décomposition de l'interaction selon Field, nous observons une différence significative dans le temps pour les concentrations de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($F(3,144) = 2.80$; $p < 0.05$) et 100 $\mu\text{g/mL}$ en TiO_2 ($F(3,144) = 6.36$; $p < 0.05$).

Le test PrestoBlue confirme les résultats obtenus par le test MTS. Le dioxyde de titane de type anatase (5-30 nm) à des concentrations comprises entre 10 à 100 $\mu\text{g/mL}$ a un effet cytotoxique significatif, mais minime sur les cellules épithéliales alvéolaires, A549, suite à une exposition variant entre 1 et 24h (Figure 4).

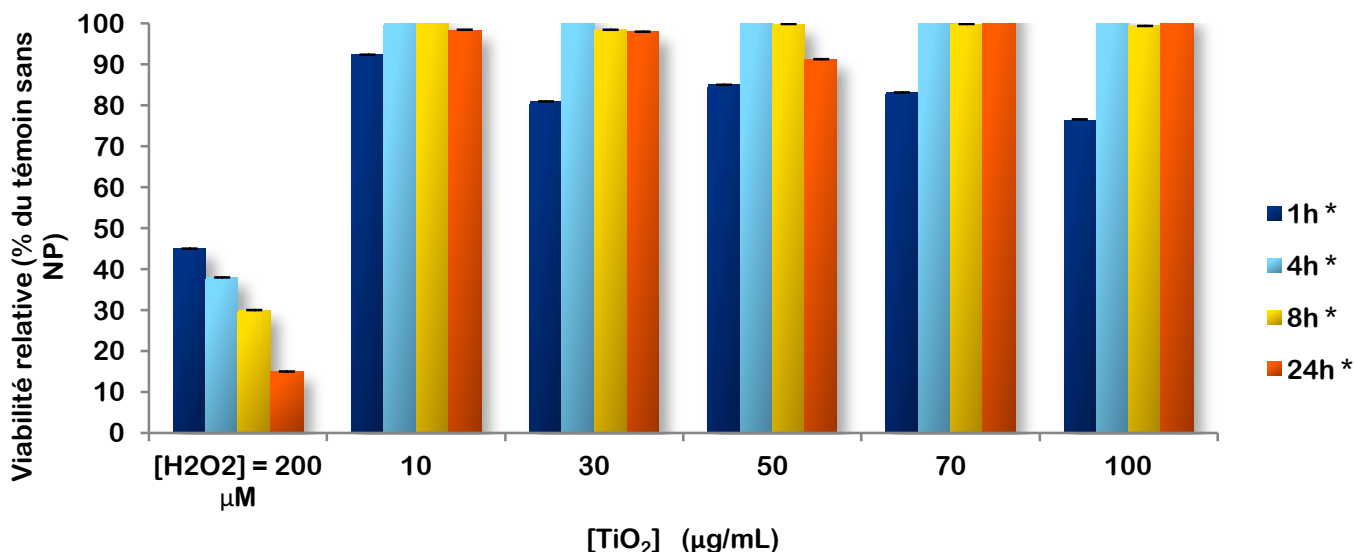


Figure 3. Effet de l'exposition des cellules A549 au dioxyde de titane, TiO₂ anatase. Test MTS. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux TiO₂ de (10, 30, 50, 70 et 100 μg/mL) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 μM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.

* indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations (P < 0.05)

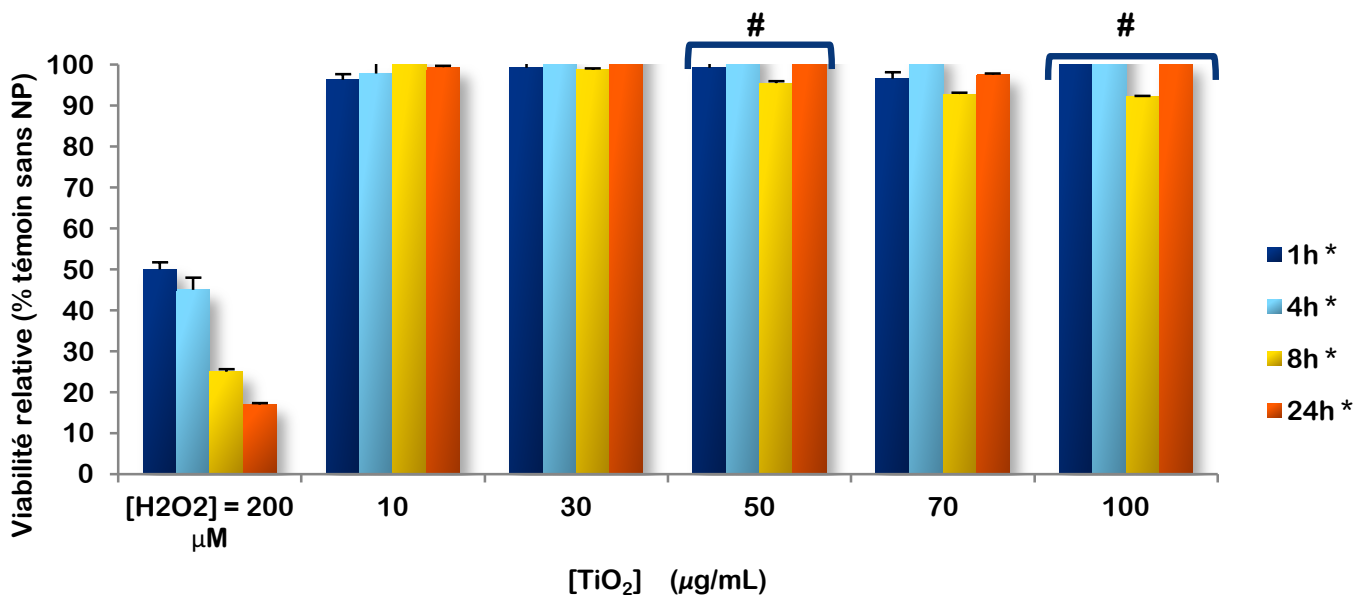


Figure 4. Effet de l'exposition des cellules A549 au dioxyde de titane, TiO₂ anatase. Test PrestoBlue. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux TiO₂ de (10, 30, 50, 70 et 100 μg/mL) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 μM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.

* indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations (P < 0.05)
 # indique une interaction significative (P < 0.05) selon le test anova à deux facteurs.

2. Étude du stress oxydatif

2.1 Mesure du ROS intracellulaire

Nous avons étudié le stress oxydatif en mesurant les dérivés réactifs de l'oxygène d'où l'abréviation en anglais ROS. Après avoir exposé les cellules aux TiO_2 , le DCFH-DA est ajouté. Cette dernière est une molécule non-fluorescente qui a la capacité de pénétrer à travers la membrane cellulaire. À l'intérieur de la cellule, le DCFH-DA est désacétylé grâce aux estérases. Ainsi, on obtient du DCFH. L'oxydation par les ROS permet de transformer le DCFH en DCF qui est fluorescent. Donc, plus il y a production de DCF, plus la fluorescence augmente. Cela signifie qu'il y a eu une augmentation du contenu intracellulaire en ROS qui ont été capable de transformer le DCFH en DCF fluorescent. Le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , est utilisé comme un témoin positif car c'est une forme majeure de ROS non radical. Donc, en présence d' H_2O_2 on s'attend à une augmentation de fluorescence; et c'est bel et bien le cas (Figure 5). On observe une augmentation significative de l'intensité de la fluorescence en fonction des différentes concentrations de TiO_2 ($F(4, 60) = 16.522$; $P < 0.05$). Selon l'analyse post hoc, la différence est significative entre 50 et 70 $\mu\text{g/mL}$ ainsi qu'entre 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$. Nous observons aussi une différence significative entre 70 et 20 $\mu\text{g/mL}$. Une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ est significativement différente de toutes les autres concentrations étudiées, sauf du 70 $\mu\text{g/mL}$.

L'augmentation de ROS est aussi significativement dépendante du temps d'exposition des cellules A549 à cette nanoparticule ($F(3, 60) = 15.723$; $P < 0.05$). Selon l'analyse post hoc, la différence est significative entre 24h et les autres durées d'exposition. Nous observons aussi une différence significative entre 1h et 8h.

Le test anova à deux facteurs indique une interaction significative entre les concentrations de TiO_2 et le temps d'exposition des cellules ($F(12,60) = 5.199$; $P < 0.05$). Ainsi, nous avons effectué une décomposition selon Field. Il y a une différence significative dans le temps, à des concentrations de 70 $\mu\text{g/mL}$ ($F(3, 64) = 10.78$; $P < 0.05$) et de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($F(3, 64) = 6.77$; $P < 0.05$). Il y a une différence significative après 24h pour les différentes concentrations étudiées ($F(4,64) = 16.46$; $P < 0.05$).

Ceci signifie que le TiO_2 , à une dose supérieure ou égale à 70 $\mu\text{g/mL}$, après 24h d'exposition, est la cause du stress oxydant.

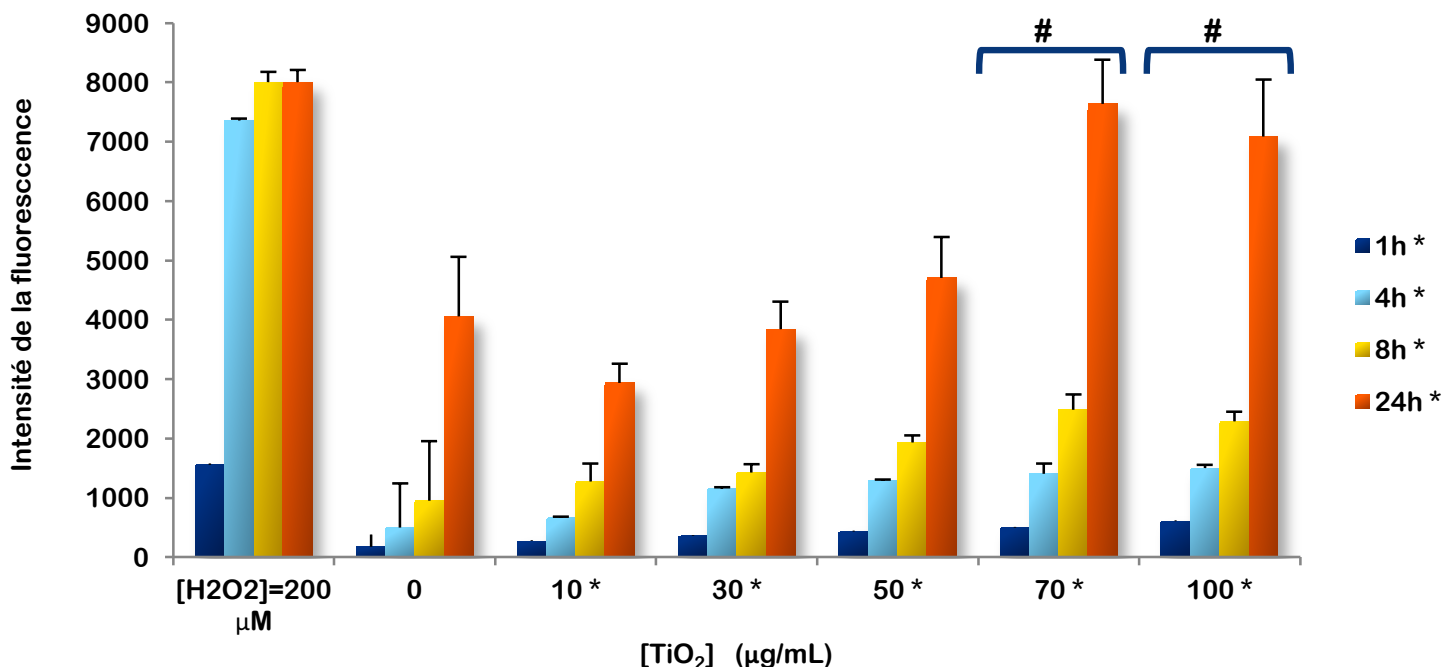


Figure 5. Effet de l'exposition des cellules A549 au dioxyde de titane, TiO₂ anatase, sur la production de ROS. Mesure réalisée par l'essai DCFH-DA, où l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la production des ROS. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux TiO₂ de (10, 30, 50, 70 et 100 µg/mL) pendant 1, 4, 8 et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 µM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4. * indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations (P < 0.05) # indique une interaction significative (P < 0.05) selon le test anova à deux facteurs.

2.2 Mesure du glutathion

Du fait de la production massive de ROS suite à l'exposition des cellules A549 au TiO_2 , une augmentation de l'activité des systèmes antioxydants cellulaires est à prévoir. Ainsi, nous avons mesuré les 2 formes de glutathion, soit la forme réduite GSH et la forme oxydée GSSG. Nous remarquons que les concentrations de GSH et de GSSG suite à l'exposition des cellules A549 à différentes concentrations de TiO_2 sont égales aux concentrations en absence de TiO_2 . Donc, aucune modification du contenu intracellulaire en glutathion n'a été observée (Figure 6)

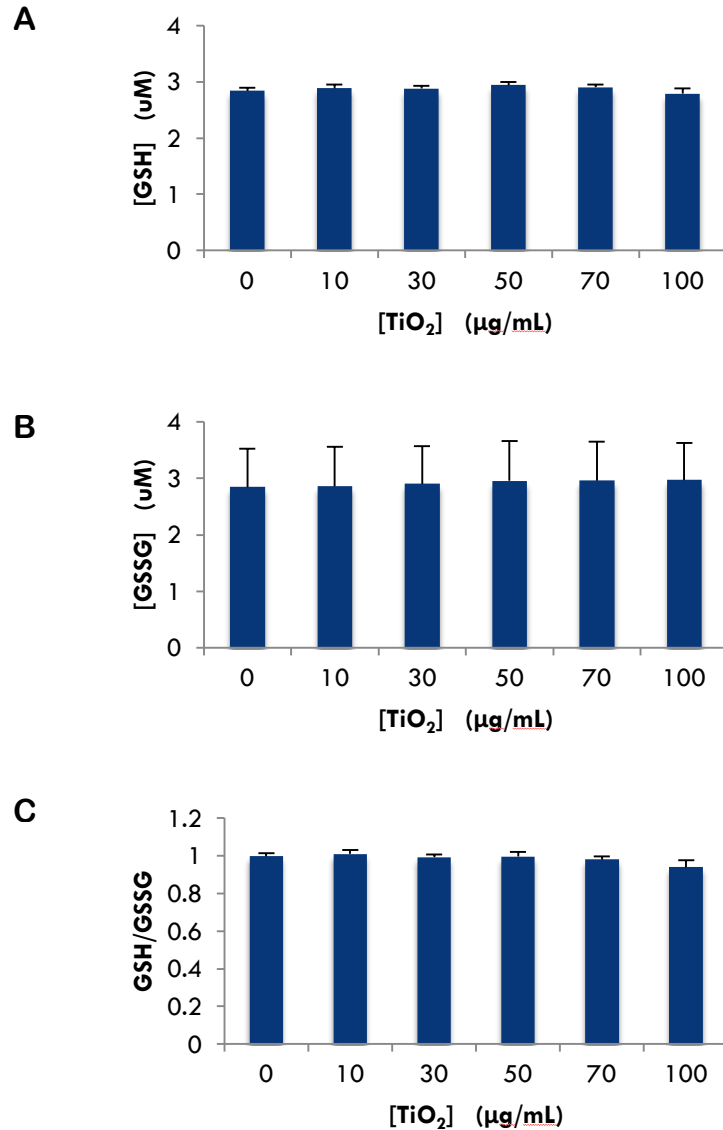


Figure 6. Effet de l'exposition des cellules A549 au dioxyde de titane, TiO₂ anatase pendant 24h sur la réponse anti-oxydative. Test de glutathion. Le stress oxydant a été évalué par le dosage des formes réduites (GSH) et oxydées (GSSG) du glutathion dans les surnageant des cellules A549 exposées aux TiO₂ de 10, 30, 50, 70 et 100 µg/mL pendant 24 heures. (A) – Niveau de la forme réduite du glutathion (GSH). (B) - Niveau de la forme oxydée du glutathion (GSSG). (C) – Ration GSH/GSSG. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.

Résultats avec les nanotubes de carbone simple paroi

1. Étude de la viabilité cellulaire

1.1 Test MTS

Le premier test effectué pour évaluer la viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules aux nanotubes de carbone simple paroi (RN-000) est le test MTS. Encore une fois, le H₂O₂ (200 µM) a servi de témoin positif. Peu importe le temps d'exposition, il y a une altération de plus de 50% de la viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules A549 à du peroxyde d'hydrogène.

La viabilité cellulaire a été testée en présence de différentes concentrations de RN-000 : 10, 100, 200, 500 et 1000 µg/mL. Les résultats nous indiquent que ces différentes concentrations altèrent faiblement mais significativement la viabilité cellulaire ($F(4, 140) = 20.221$; $p < 0.05$) (Figure 7). Selon l'analyse post-hoc, une concentration de 10 µg/mL de RN-000 diffère significativement des autres concentrations étudiées. Il y a une différence significative entre 100 et 200 µg/mL ainsi qu'entre 100 et 500 µg/mL. Le maximum de survie cellulaire est atteint à 500 µg/mL de nanotubes de carbone simple paroi. Entre 500 et 1000 µg/mL, une diminution minimale mais significative est observée.

Le temps d'exposition (1h, 4h, 8h et 24h) aux nanotubes de carbone simple paroi induisait aussi une différence significative sur la survie cellulaire ($F(3, 140) = 9.250$; $p < 0.05$). Selon l'analyse post-hoc, il y a une augmentation significative de la survie cellulaire entre 1h et 4h. Entre 4h et 8h, nous observons une diminution de la viabilité cellulaire qui est statistiquement significative. Ensuite, les résultats indiquent une augmentation significative entre 8h et 24h (Figure 7; $p < 0.05$). Cependant, il est à noter que ces altérations sont nettement faibles.

L'analyse statistique indique une interaction significative entre les deux facteurs (concentrations et temps d'exposition) $F(12, 140) = 3.157$; $p < 0.05$. Ainsi, une décomposition selon Field a été effectuée. On obtient une différence significative dans le temps pour les concentrations de 100 µg/mL ($F(3, 144) = 3.13$; $P < 0.05$) et de 200 µg/mL ($F(3, 144) = 4.51$; $P < 0.05$) en RN-000, De plus, il y a une différence significative selon les concentrations de nanotubes de carbone simple paroi utilisées à 1h ($F(4, 143) = 4.24$; $P < 0.05$), 4h ($F(4, 143) = 4.99$; $P < 0.05$), 8h ($F(4, 143) = 4.27$; $P < 0.05$) et 24h ($F(4, 143) = 11.82$; $P < 0.05$).

En résumé, le test MTS montre qu'une exposition des cellules A549 à des concentrations de RN-000 (10-15 nm) comprises entre 10 et 1000 µg/mL pour des périodes variant entre 1h et 24h induit une faible, mais significative, altération de la viabilité cellulaire, tout dépendamment de la concentration et du temps d'exposition (Figure 7). Cette altération de la survie cellulaire à la suite d'une exposition au RN-000 est nettement plus petite que celle observée avec le H₂O₂.

1.2 Test PrestoBlue

Le deuxième test employé pour évaluer la viabilité cellulaire est le test PrestoBlue. Les résultats de ce test indique clairement une diminution de la survie cellulaire suite à l'exposition des cellules A549 au témoin positif, soit le peroxyde d'hydrogène.

Selon ce test, la viabilité cellulaire diminue significativement en fonction des différentes concentrations de RN-000 (10 à 1000 µg/mL) ($F(4, 140) = 397.832$; $p < 0.05$) (Figure 8). L'analyse post-hoc indique une différence significative entre chacune des concentrations étudiées de RN-000; sauf entre 10 et 100 µg/mL. À partir de 100 µg/mL, la viabilité cellulaire diminue significativement (Figure 8, $p < 0.05$). À des concentrations de 500 et 1000 µg/mL, moins de 50% de survie cellulaire est observée.

Suite à l'analyse statistique, on remarque aussi un effet significatif en fonction du temps d'exposition ($F(3,140) = 31.144$; $P < 0.05$). Selon l'analyse post hoc, aucun effet significatif n'est observé entre 1h et 4h. Il y a une augmentation significative entre 4h et 8h d'exposition, suivie d'une baisse significative de la survie cellulaire après 8h d'exposition (Figure 8, $p < 0.05$). L'anova à 2 facteurs montre une interaction significative ($F(12,140) = 2.583$; $P < 0.05$). Ainsi, une décomposition selon Field a été effectuée. Il y a une variance significative selon la dose de RN-000 à 1h ($F(4,143) = 55.57$; $P < 0.05$), 4h ($F(4,143) = 48.51$; $P < 0.05$), 8h ($F(4,143) = 58.62$; $P < 0.05$) et 24h ($F(4,143) = 85.77$; $P < 0.05$).

En résumé, le test PrestoBlue montre qu'une exposition des cellules A549 à des concentrations de RN-000 (10-15 nm) comprises entre 10 et 1000 µg/mL pour des périodes variant entre 1h et 24h induit une diminution significative de la viabilité cellulaire, tout dépendamment de la concentration et du temps d'exposition (Figure 8). Une concentration supérieure à 500 µg/mL en RN-000 semble être toxique pour les cellules A549.

1.3 Test d'exclusion du bleu de Trypan

Étant donné que les résultats du test MTS et PrestoBlue ne se concordent pas, nous avons effectué un 3^{ème} test, soit le test d'exclusion du bleu de Trypan (Figure 9). Ce test montre une diminution de la viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules A549 au peroxyde d'hydrogène (témoin positif).

Ce test indique que la viabilité cellulaire diminue significativement en fonction des différentes concentrations de RN-000 (10 à 1000 µg/mL) ($F(4, 140) = 163.844$; $p < 0.05$). Selon l'analyse post-hoc, il y a une différence significative entre chacune des concentrations étudiées (Figure 9, $p < 0.05$). L'altération de la viabilité cellulaire est à son maximum lorsque les cellules A549 sont exposées à une concentration de 1000 µg/mL de RN-000. À une telle concentration, la survie cellulaire est de seulement 74%.

On remarque aussi un effet significatif en fonction du temps d'exposition ($F(3, 140) = 56.743$; $P < 0.05$). Selon l'analyse post hoc, il y a une diminution significative de la survie cellulaire entre 1h et 4h, ainsi qu'entre 4h et 8h. On n'observe pas une baisse significative à 24h en comparaison à une exposition de 8h (figure 7, $p > 0.05$). La viabilité cellulaire est de 87% et de 86% à 8h et 24h d'exposition, respectivement.

L'analyse statistique montre une interaction significative entre les concentrations et le temps d'exposition ($F(12, 140) = 3.756$; $P < 0.05$). Ainsi, une décomposition selon Field a été effectuée. Il y a une différence significative dans le temps à des concentrations de 10 µg/mL ($F(3, 144) = 4.76$; $P < 0.05$), 100 µg/mL ($F(3, 144) = 3.17$; $P < 0.05$) et 1000 µg/mL ($F(3, 144) = 4.37$; $P < 0.05$) de RN-000.

En résumé, le test d'exclusion du bleu de Trypan montre qu'une exposition des cellules A549 à des concentrations de RN-000 (10-15 nm) comprises entre 10 et 1000 µg/mL pour des périodes variant entre 1h et 24h induit une faible, mais significative, altération de la viabilité cellulaire, tout dépendamment de la concentration et du temps d'exposition (Figure 9).

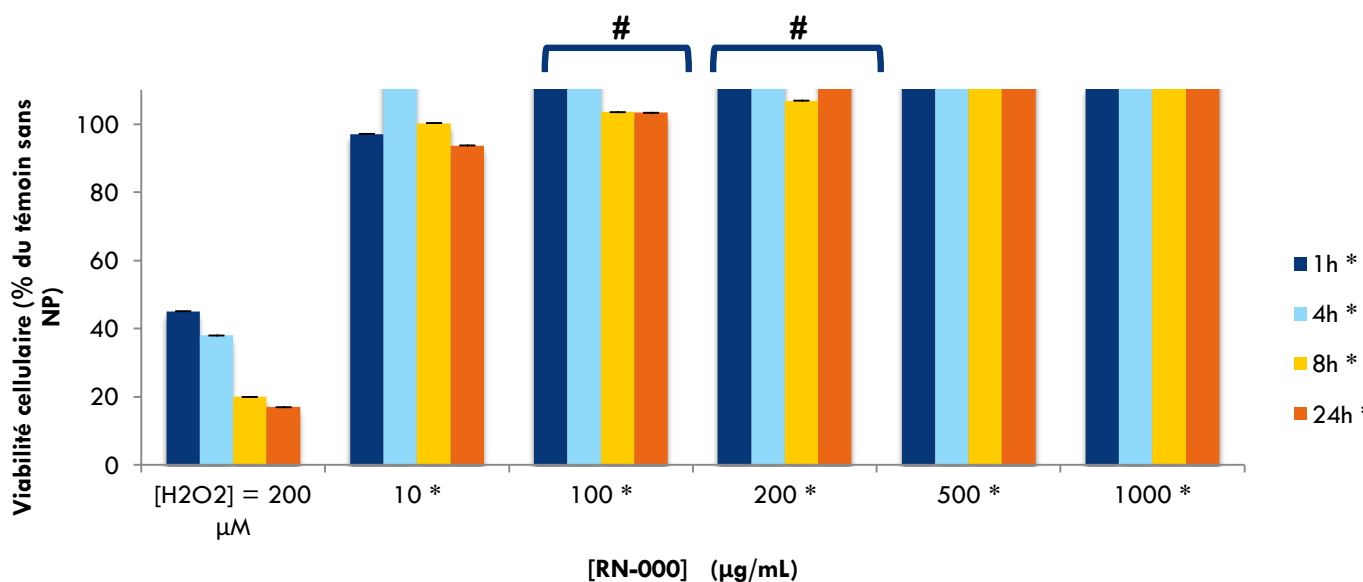


Figure 7. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000. Test MTS. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux RN-000 de (10, 100, 200, 500 et 1000 µg/mL) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 µM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.
* indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations (P < 0.05)
indique une interaction significative (P < 0.05) selon le test anova à deux facteurs.

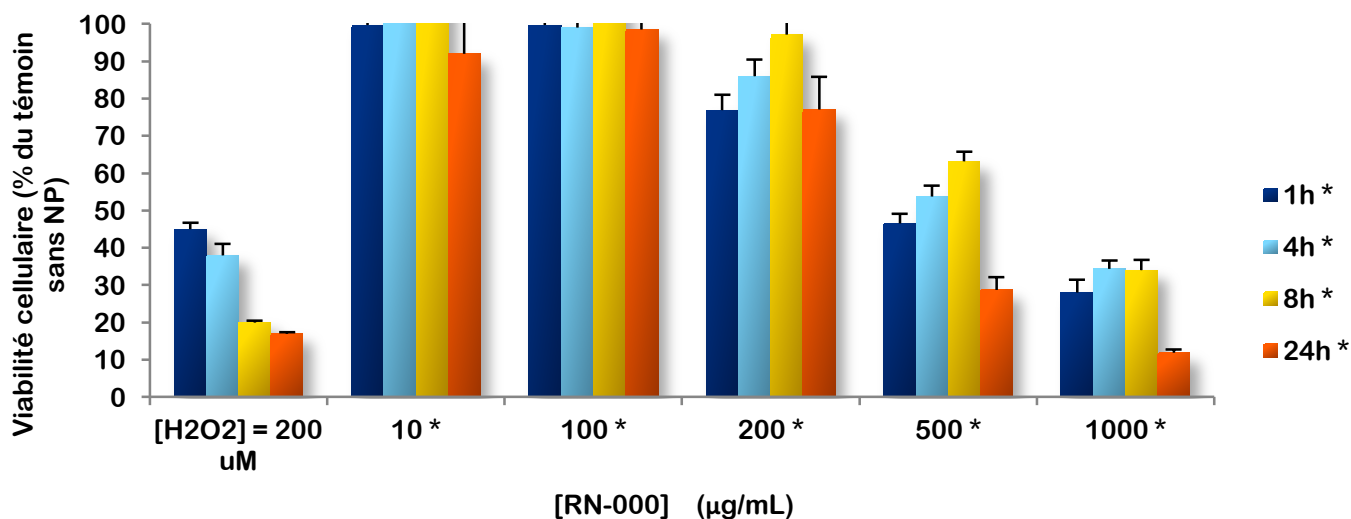


Figure 8. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000. Test PrestoBlue. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux RN-000 de (10, 100, 200, 500 et 1000 µg/mL) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 µM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.
* indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations (P < 0.05)

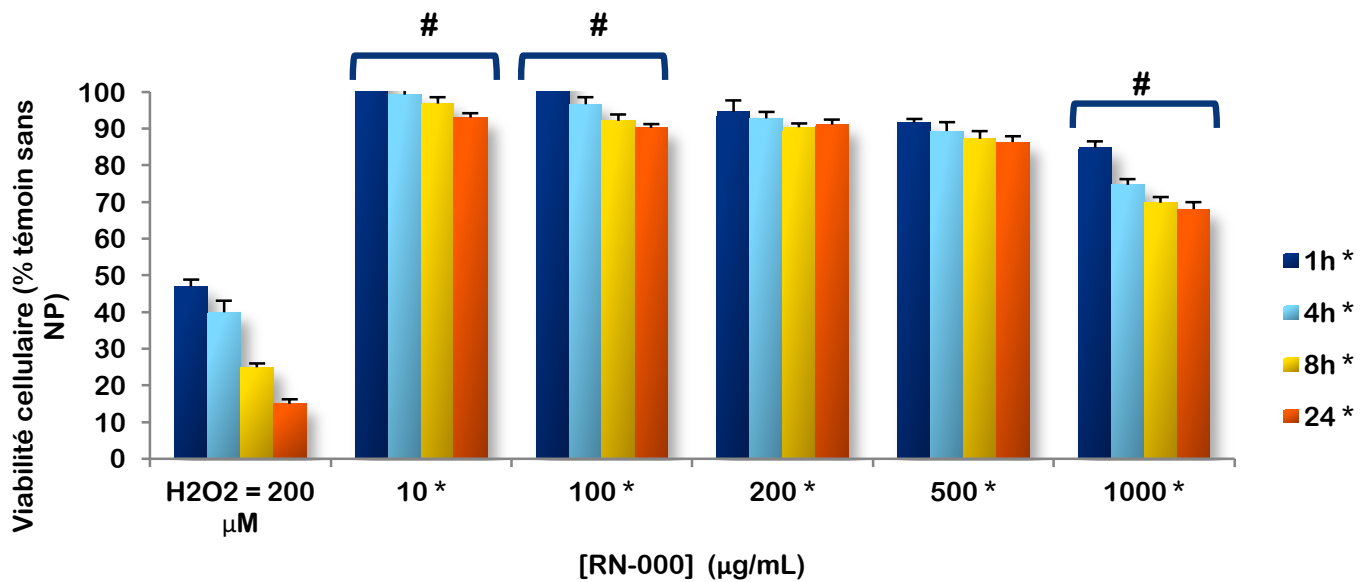


Figure 9. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000. Test d'exclusion du bleu de Trypan. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux RN-000 de (10, 100, 200, 500 et 1000 µg/mL) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 µM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.

* indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations (P < 0.05)

indique une interaction significative (P < 0.05) selon le test anova à deux facteurs.

2. Étude du stress oxydatif

2.1 Mesure du ROS intracellulaire

Tel qu'expliqué dans la section de la mesure du ROS intracellulaire suite à une exposition au TiO_2 , l'intensité de fluorescence est proportionnel au contenu en ROS. Suite à l'exposition des cellules A549 aux RN-000, on remarque que ces nanotubes de carbone entraînent une augmentation intracellulaire en ROS qui est dépendante de la concentration ($F(4,60) = 25.541$; $P < 0.05$). Il y a une augmentation significative du contenu en ROS entre 10 et 100 $\mu\text{g/mL}$ de RN-000 ainsi qu'entre 100 et 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 10, $P < 0.05$). On n'observe pas une différence significative entre 200 et 500 $\mu\text{g/mL}$ de RN-000. Une diminution significative est observée à 1000 $\mu\text{g/mL}$ par rapport à 200 $\mu\text{g/mL}$.

Selon l'analyse statistique, l'augmentation du contenu intracellulaire en ROS est aussi dépendant du temps d'exposition ($F(3,60) = 52.904$; $P < 0.05$). L'analyse post-hoc indique une augmentation significative entre 1h et 4h. On n'observe pas de différence significative entre 4h et 8h d'exposition. L'intensité de fluorescence atteint son maximum après 24h d'exposition à ces nanotubes de carbone simple paroi. Une augmentation significative s'est aperçue entre 4h et 24h ainsi qu'entre 8h et 24 d'exposition des cellules A549 aux RN-000.

Selon l'analyse anova, l'interaction entre les deux facteurs (concentrations et temps d'exposition) est significative ($F(12,60) = 6.455$; $P < 0.05$). Après une décomposition de l'interaction selon Field, nous observons une différence significative à 8h ($F(4,63) = 5.23$; $P < 0.05$) et 24h ($F(4,63) = 5.61$; $P < 0.05$) pour les différentes concentrations. Aux quatre différents temps d'exposition des cellules, il y a une différence significative à 100 $\mu\text{g/mL}$ ($F(3,64) = 7.49$; $P < 0.05$), 200 $\mu\text{g/mL}$ ($F(3,64) = 11.41$; $P < 0.05$), 500 $\mu\text{g/mL}$ ($F(3,64) = 8.17$; $P < 0.05$) et 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($F(3,64) = 3.83$; $P < 0.05$) de nanotubes de carbone simple paroi.

Après 8h d'exposition, une dose de 500 $\mu\text{g/mL}$ montre l'intensité de la fluorescence la plus élevée. Après 24h d'exposition, 200 $\mu\text{g/mL}$ de RN-000 entraîne le plus de production de ROS intracellulaire. Ainsi, les concentrations comprises entre 200 à 500 $\mu\text{g/mL}$, inclusivement, semblent être les plus intéressante pour l'augmentation du ROS dans les cellules A549 à partir de 8h d'exposition. À 1000 $\mu\text{g/mL}$ de RN-000, le contenu intracellulaire en ROS diminue par rapport à 200 et 500 $\mu\text{g/mL}$.

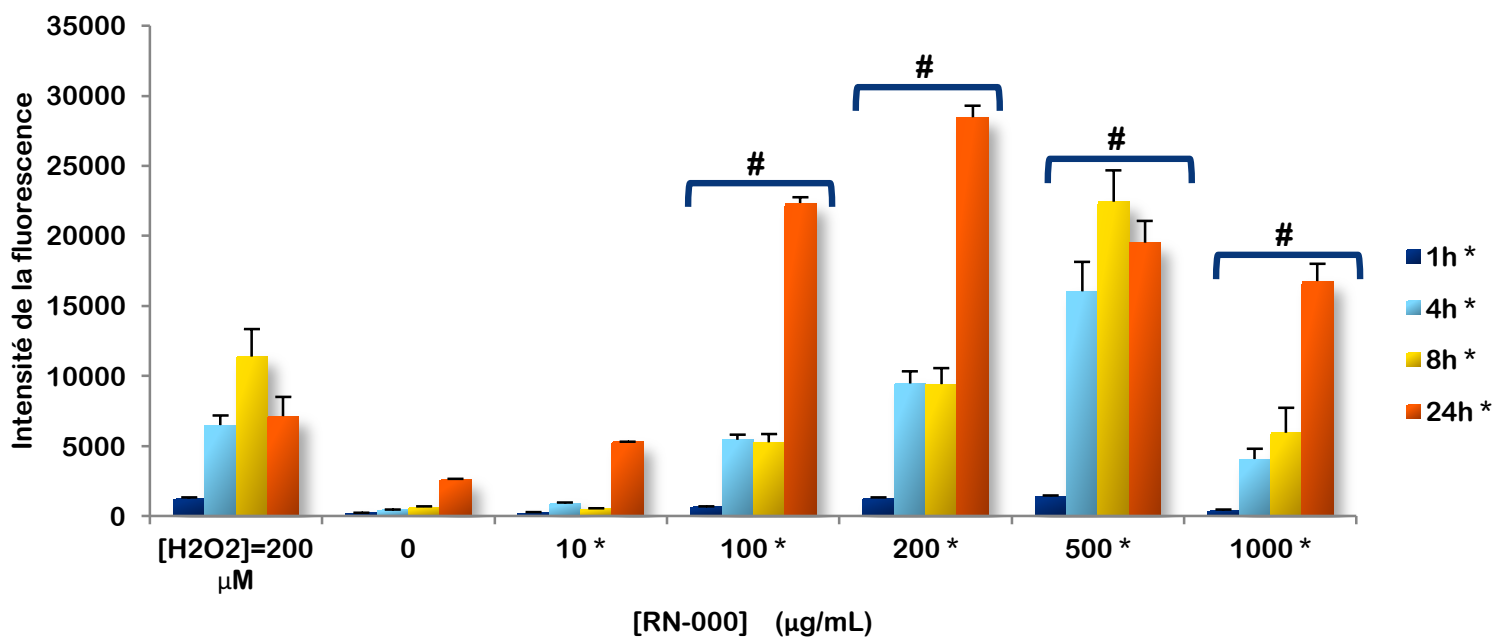


Figure 10. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000, sur la production de ROS. Mesure réalisée par l'essai DCFH-DA où l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la production des ROS. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux RN-000 de (10, 100, 200, 500 et 1000 µg/mL) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 µM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.

* indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations ($P < 0.05$)

indique une interaction significative ($P < 0.05$) selon le test anova à deux facteurs.

2.2 Mesure du glutathion

Le ratio GSH/GSSH est supérieur à 1 pour les différentes concentrations utilisées de RN-000 après une exposition de 24h (Figure 11). Cependant, selon les analyses statistiques, il n'y a pas de différence significative. Ainsi, nous ne pouvons pas dire qu'il y a une réponse anti-oxydative. Ce système de défense se basant sur une molécule antioxydante de petite taille, soit le glutathion, n'est pas activé.

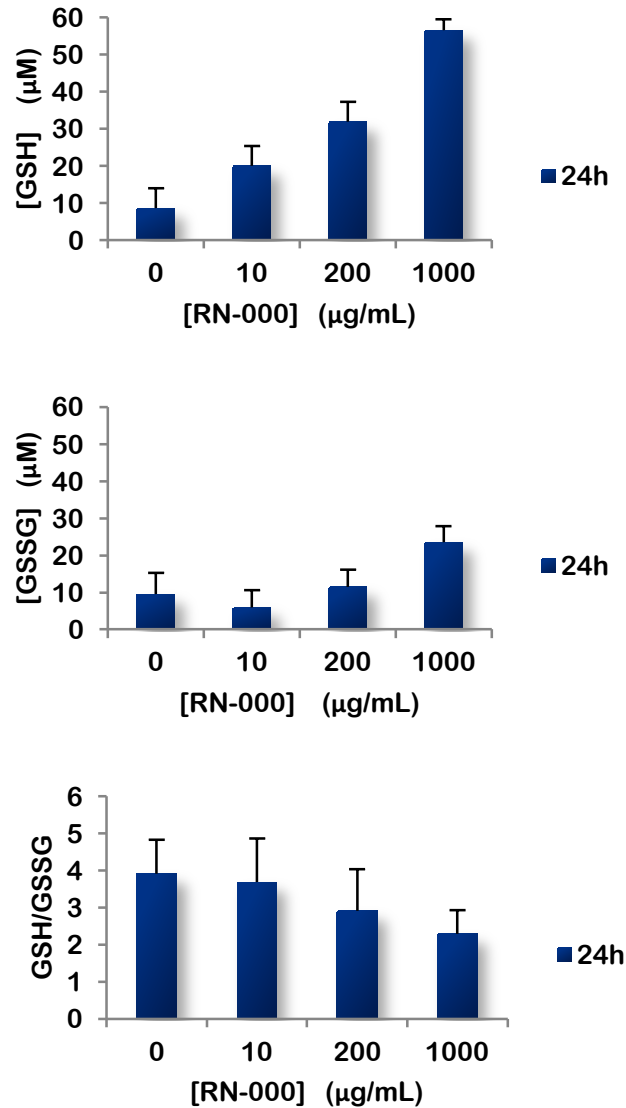


Figure 11. Effet de l'exposition des cellules A549 aux nanotubes de carbone simple paroi, RN-000 pendant 24h sur la réponse anti-oxydante. Test de glutathion. Le stress oxydant a été évalué par le dosage des formes réduites (GSH) et oxydées (GSSG) du glutathion dans les surnageant des cellules A549 exposées aux RN-000 de 10, 100, 200, 500 et 1000 µg/mL pendant 24 heures. (A) – Niveau de la forme réduite du glutathion (GSH). (B) - Niveau de la forme oxydée du glutathion (GSSG). (C) – Ration GSH/GSSG. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.

Résultats avec le noir de carbone

1. Étude de la viabilité cellulaire

1.1 Test MTS

Le test MTS montre une diminution de la viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules A549 au peroxyde d'hydrogène, tel qu'attendu. Différentes concentrations de noir de carbone LB101 ont été testées : 1.25, 10, 40, 60 et 80 µg/mL. On observe une diminution qui est significative en fonction de ces concentrations ($F(4, 140) = 7.597$; $p < 0.05$). Toutefois la diminution de la survie cellulaire à la suite de ces différentes concentrations de LB101 est plus petite que celle observée avec le H_2O_2 . Une analyse post-hoc nous indique une différence significative de la survie entre les concentrations de 1.25, 10 et 40 µg/mL par rapport à 80 µg/mL (Figure 12; $p < 0.05$). On ne trouve pas de différence significative entre 60 et 80 µg/mL de LB101. Cette altération de la viabilité cellulaire est aussi significativement dépendante du temps d'exposition ($F(3, 140) = 23.863$; $p < 0.05$). Cette diminution est observée à 8h d'exposition au noir de carbone où la viabilité cellulaire est de 81%. Selon l'analyse post-hoc, il y a une différence significative entre 8h et les autres temps d'exposition (Figure 12, $p < 0.05$). On n'observe pas de différence significative entre 1h et 4h. Entre 4h et 8h, il y a une diminution significative de la survie cellulaire. Après 8h d'exposition des cellules A549 au LB101, il y a une augmentation significative de la viabilité cellulaire.

Une interaction significative a été relevée entre les deux facteurs $F(12, 140) = 1.965$; $p < 0.05$. Après une décomposition de l'interaction selon Field, nous observons une différence significative dans le temps pour une concentration de 1.25 µg/mL ($F(3, 144) = 3.84$; $P < 0.05$), de 10 µg/mL ($F(3, 144) = 5.46$; $P < 0.05$), de 40 µg/mL ($F(3, 144) = 5.62$; $P < 0.05$), de 60 µg/mL ($F(3, 144) = 8.13$; $P < 0.05$) et de 80 µg/mL ($F(3, 144) = 3.77$; $P < 0.05$).

Le noir de carbone n'induit pas plus que 10% de mortalité cellulaire après une exposition à des concentrations comprises entre 1.25 à 80 µg/mL durant 1h et 4h (Figure 12). Il y a une légère diminution, mais significative, de la viabilité cellulaire à 8h d'exposition au noir de carbone. Cependant, la viabilité cellulaire est de plus que 70%, ce qui signifie qu'il n'y a pas beaucoup de mortalité cellulaire. En résumé, selon le test MTS, le LB101 (95 nm) entraîne un taux de mortalité cellulaire minime mais qui est significatif.

1.2 Test PrestoBLue

Le test prestoBlue montre qu'une exposition des cellules A549 à des concentrations du noir de carbone (95 nm) comprises entre 1.25 et 80 µg/mL durant 1h, 4h, 8h et 24h n'altère pas la viabilité cellulaire (Figure 13). Il y a une différence significative seulement en fonction du temps ($F(3,140) = 4.647$; $P < 0.05$). Cependant, cette altération est très minime. Selon l'analyse post-hoc, la différence est significative entre 1h et 4h ainsi qu'entre 1h et 8h (Figure 13, $P < 0.05$).

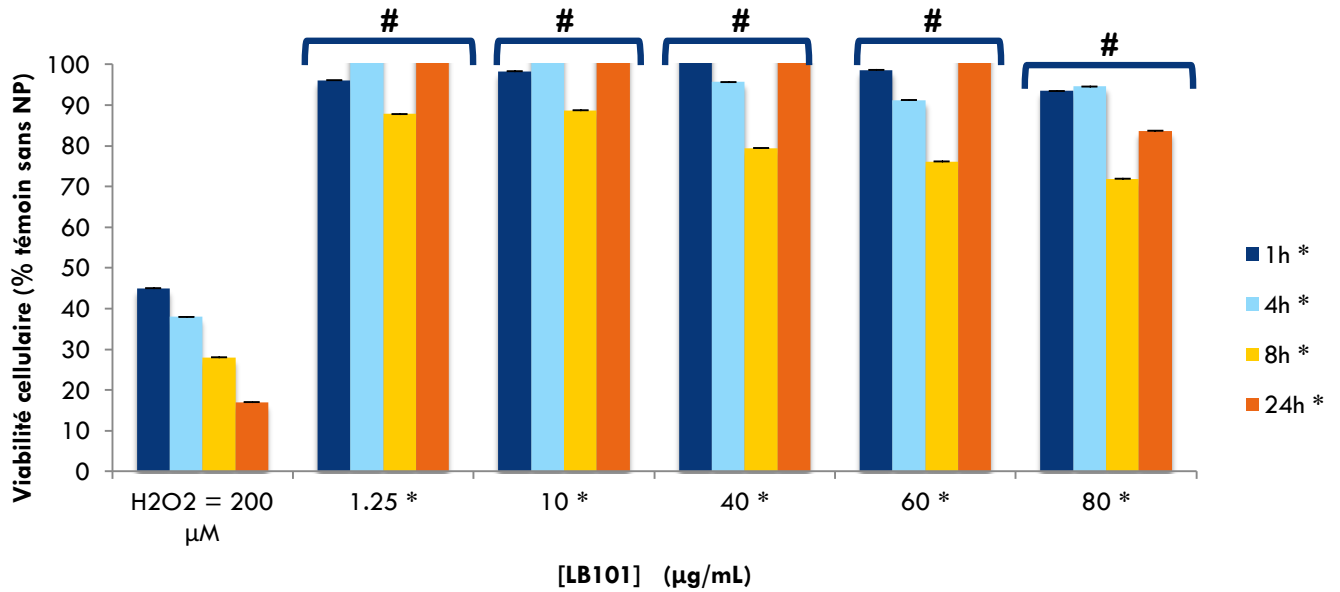


Figure 12. Effet de l'exposition des cellules A549 au noir de carbone, LB101. Test MTS. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux LB101 de (1.25, 10, 40, 60 et 80 µg/mL) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 µM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.

* indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations (P < 0.05)
 # indique une interaction significative (P < 0.05) selon le test anova à deux facteurs.

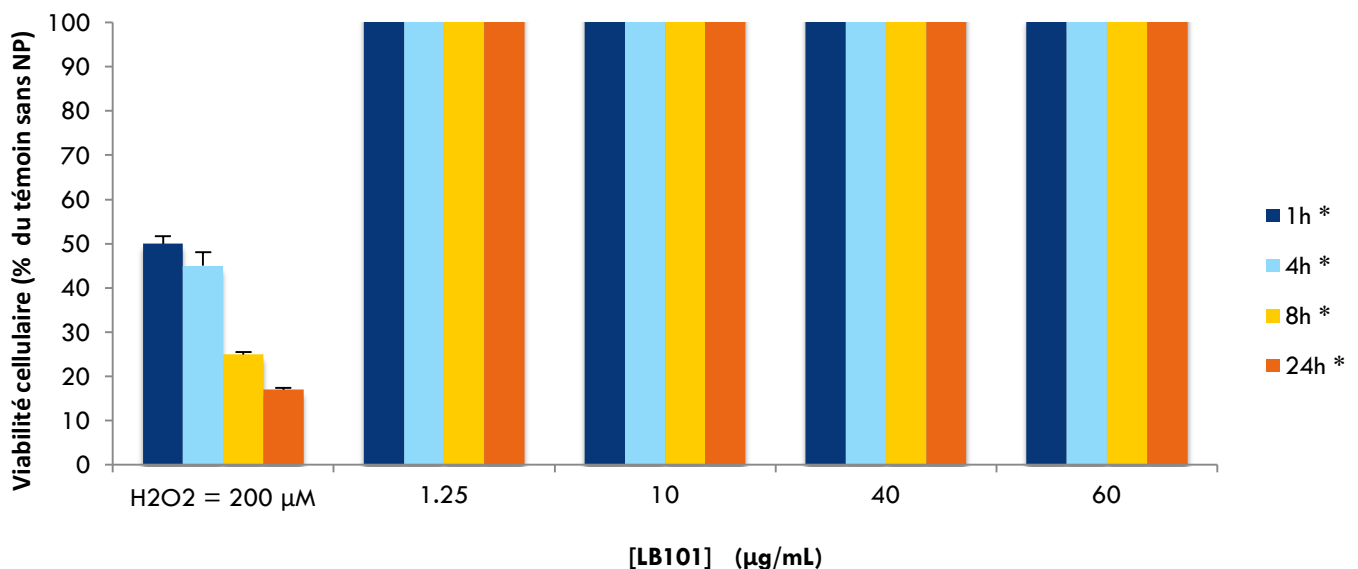


Figure 13. Effet de l'exposition des cellules A549 au noir de carbone, LB101. Test PrestoBlue. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux LB101 de (1.25, 10, 40, 60 et 80 µg/mL) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H₂O₂ 200 µM. Les résultats sont exprimés en MOY±ETM; n=4.

* indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations (P < 0.05)

2. Étude du stress oxydatif

2.1 Mesure du ROS intracellulaire

L'intensité de la fluorescence est proportionnelle au contenu en ROS. Le témoin positif, H₂O₂, augmente le contenu intracellulaire en ROS qui est dépendante de la concentration et du temps d'exposition (Figure 14). Suite à l'exposition des cellules A549 au noir de carbone LB101, on remarque que cette particule induit la production de ROS en fonction de la concentration ($F(4,140) = 59.722$; $P < 0.05$). L'analyse post-hoc montre qu'il y a une différence significative entre 10 et 40 µg/mL et entre 40 et 80 µg/mL de LB101 (Figure 14, $P < 0.05$). La production de ROS est maximale suite à l'exposition à une concentration de 80 µg/mL.

L'augmentation du contenu intracellulaire en ROS est aussi dépendante du temps d'exposition ($F(3,140) = 92.883$; $P < 0.05$). Selon l'analyse post-hoc, il y a une différence significative entre 1h et 4h, ainsi qu'entre 4h et 24h.

Selon l'analyse anova, l'interaction entre les deux facteurs (concentrations et temps d'exposition) est significative ($F(12,140) = 14.374$; $P < 0.05$). Après une décomposition de l'interaction selon Field, nous observons une différence significative à 4h ($F(4,143) = 8.71$; $P < 0.05$) et à 8h ($F(4,143) = 25.42$; $P < 0.05$) pour les différentes concentrations. Seulement les 3 plus hautes concentrations utilisées de LB101 montrent une différence significative dans le temps, soit une concentration de 40 µg/mL ($F(3,144) = 13.84$; $P < 0.05$), de 60 µg/mL ($F(3,144) = 21.21$; $P < 0.05$) et de 80 µg/mL ($F(3,144) = 21,74$; $P < 0.05$).

En résumé, le noir de carbone entraîne une augmentation significative du contenu intracellulaire en ROS qui est dépendante de la concentration et du temps d'exposition. Ceci signifie que le noir de carbone est la cause du stress oxydant.

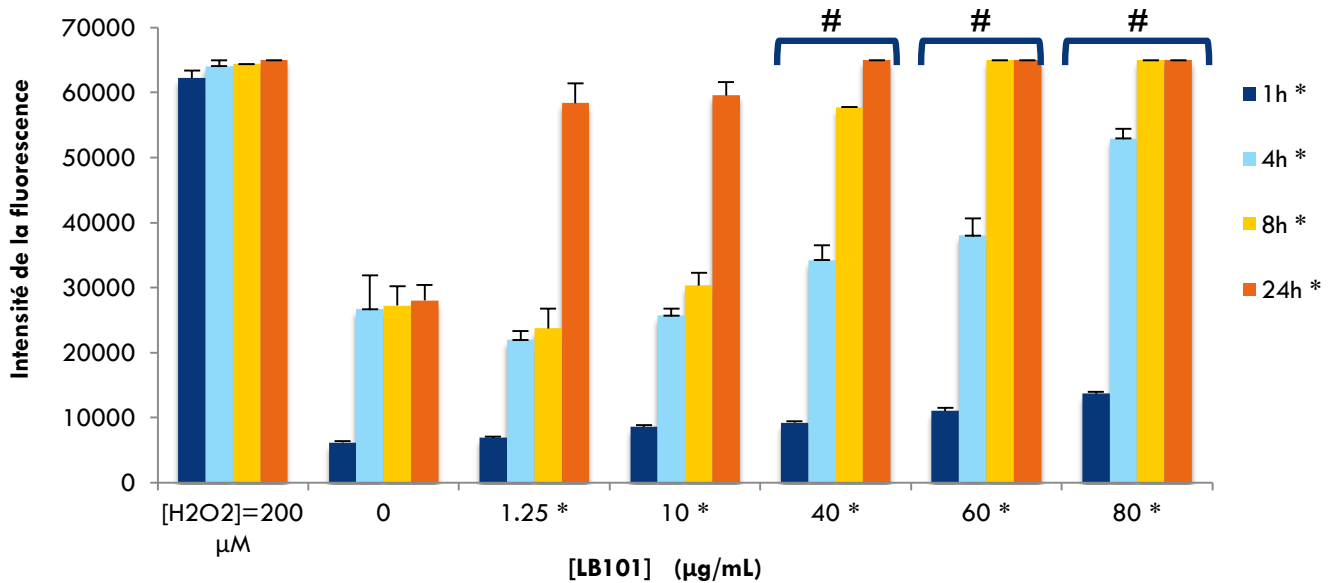


Figure 14. Effet de l'exposition des cellules A549 au noir de carbone, LB101, sur la production de ROS. Mesure réalisée par l'essai DCFH-DA où l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la production des ROS. Les cellules (5000 cellules/puits, plaque 96 puits) ont été exposées aux LB101 de (1.25, 10, 40, 60 et 80 $\mu g/mL$) pendant 1, 4, 8h et 24 heures. Le contrôle positif est représenté par le H_2O_2 200 μM . Les résultats sont exprimés en MOY \pm ETM; n=4. * indique une différence significative du facteur temps d'exposition ou concentrations ($P < 0.05$) # indique une interaction significative ($P < 0.05$) selon le test anova à deux facteurs.

DISCUSSION

1- Discussion méthodologique

1.1- Modèle *in vitro* utilisé

Le poumon représente une voie d'entrée particulièrement importante pour les NPM (Hoet et al., 2004). C'est pourquoi la lignée A549 représente un bon modèle *in vitro* pour étudier l'effet des NPM. Cette lignée est utilisée comme modèle de pneumocytes de type II. Ce sont des cellules épithéliales alvéolaires issues d'un adénocarcinome humain. Il est important de noter qu'il s'agit d'une lignée cancéreuse. Elle a été choisie pour sa capacité illimitée de division. Il est susceptible que cette lignée agit différemment des cellules primaires car les lignées cellulaires et les cellules primaires n'ont pas forcément le même comportement (Lee and al., 2008). C'est pourquoi cette étude est une étude préliminaire. Il faudra, dans des études à venir, utiliser des cellules épithéliales alvéolaires primaires pour confirmer les résultats obtenus.

1.2- Nanoparticules manufacturées utilisées

L'objectif, en utilisant différentes nanoparticules, était d'observer l'influence de différents paramètres physicochimiques sur les effets biologiques. Ainsi, nous avons étudié différentes NP dont les propriétés variaient quant à leur forme et leur composition chimique. Les nanotubes de carbone et le noir de carbone sont des nanoparticules organiques à base de carbone. Cependant, leur géométrie diffère. Le graphène constitue l'élément structurel de base des NTC, alors que le noir de carbone est une forme de carbone élémentaire (amorphe) qui est présente sous forme de particules sphériques agrégées. Les nanotubes de carbone simple paroi sont constitués d'un unique feuillet de graphène enroulé sur lui-même pour former un cylindre. L'enroulement du feuillet de graphène a des conséquences sur les liaisons C-C: la longueur de liaison entre deux atomes de carbone diminue par rapport à celle du graphite planaire (0,125 nm au lieu de 0,141nm) (Sun et al., 2011). Ceci a un impact sur les propriétés électroniques. Le graphène est une forme cristalline stable du carbone, dans laquelle les atomes de carbone sont coordonnés à 3 autres par des liaisons dont les orbitales sont de type sp² dans un plan cristallographiques hexagonal. Le noir de carbone est une forme du carbone qui ne possède pas de structure cristalline, ou en fait hautement désordonnée. Le dioxyde de titane de type anatase est un système cristallin quadratique. Outre la composition chimique et la forme, ces 3 NP étudiées diffèrent aussi par leur taille. Le dioxyde de titane de type anatase utilisé a un diamètre compris entre 5 à

30 nm. La taille des nanotubes de carbone simple paroi de la compagnie *Raymor* (RN-000) varie de 10 à 15 nm alors que celle du noir de carbone (LB101) est de 95 nm.

L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques a publié un rapport en 2012 pour l'étude des nanoparticules manufacturés (OCDE, 2012). Dans ce rapport, les 19 points à caractériser pour l'identification des propriétés physico-chimiques d'une nanoparticule sont :

1. Taille, forme
2. Distribution de taille
3. Agrégation et agglomération
4. Chimie : composition et identification
5. Surface spécifique
6. Chimie de surface
7. Charge de surface, potentiel zêta et constante d'Hamaker
8. Dispersion dans l'eau et influence sur les propriétés du nanomatériau
9. Dispersions liquides
10. Structure cristalline
11. Tensions de surface
12. Taux d'empoussiérage (« dustiness »)
13. Taille cristalline
14. Images par microscopie électronique
15. Activité photocatalytique
16. Densité apparente
17. Porosité
18. Coefficient de partage octanol/eau
19. Formation de radicaux libres

Il est difficile de généraliser sur la toxicité des nanoparticules, car elle dépend de divers paramètres cités ci-dessus. Il suffit qu'un paramètre change pour que leur toxicité change. Ainsi, pour une étude optimale, il faut caractériser la nanoparticule en question. Cependant, une telle caractérisation est très coûteuse et chronophage. Pour cette étude, nous n'avons pas eu la chance

de caractériser les nanoparticules étudiées. Nous nous sommes basés uniquement sur les différences de composition chimique, de morphologie et de taille.

Dans le cadre des études de nanotoxicologie, un point important à considérer est la dispersion des nanoparticules. Par exemple, les nanotubes de carbones sont souvent présents sous la forme d'agrégats non structurés (liés par des liaisons chimiques fortes) ou d'agglomérats avec une surface d'interaction plus faible (liés par des liaisons faibles). Ainsi, il est difficile d'obtenir une dispersion stable. Certaines études *in vitro* évitent l'addition de sérum (sérum de veau foetal : FBS) dans leur milieu de culture afin d'éviter son action tensio-active entraînant une modification de la chimie de surface des nanotubes de carbone. Cependant, la non-utilisation de sérum peut fragiliser les cellules et influencer les réponses biologiques ou entraîner une perte rapide de la viabilité cellulaire. Dans notre étude, les cellules baignaient dans un milieu contenant du sérum (10% FBS). Mais, les nanotubes de carbone et le noir de carbone étaient préparés dans une suspension composée de 0,05% BSA, de 0,5% d'éthanol (pureté : 96-100%) et d'eau distillée. Le dioxyde de titanium de type anatase utilisé pour cette recherche a été dissout dans l'eau. Il est aussi important de vérifier les composants des solutions de NPs pour s'assurer de l'absence d'impuretés.

2- Discussion des résultats

2.1- Effets du dioxyde de titane de type anatase sur les cellules pulmonaires humaines

Dans ce projet, le dioxyde de titane de type anatase a été étudié. Cette nanoparticule a été choisie, pour l'étude, sur la base du volume important de sa production mondiale puisque c'est la deuxième nanoparticule la plus manufacturée mondialement (Kansara et al., 2014). Selon les tests de viabilité cellulaire, une exposition des cellules A549 à des concentrations du TiO_2 (5-30 nm) comprises entre 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durant 1h, 4h, 8h et 24h a un effet cytotoxique significatif mais très faible (Figure 3 et 4). En fait, la diminution de la survie cellulaire à la suite d'une exposition au TiO_2 est nettement plus petite que celle observée avec le témoin positif, soit le H_2O_2 . On remarque à la figure 3 que la viabilité cellulaire après 1h d'exposition aux différentes concentrations de TiO_2 est inférieure à celle mesurée pour de plus longues durées d'exposition. Ceci est peut-être dû à la toxicité du TiO_2 . Au moment de l'exposition, le TiO_2 semble avoir un effet néfaste sur les cellules. Cependant, lorsque le temps d'exposition des cellules A549 est prolongé sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO_2 et 95% d'humidité, quelques cellules sont capables de se diviser. Alors, on aura plus de cellules qui envahissent les puits. Ainsi, notre hypothèse d'explication est qu'avec le temps, ces cellules activent leurs mécanismes de défense contre la nanoparticule et résistent à ses effets. Ainsi, la viabilité cellulaire n'est pas altérée après 4h d'exposition, la survie étant alors de 100% telle qu'estimée avec le test MTS. Toutefois, cet effet n'est pas observé avec le test PrestoBlue. Bref, les résultats de ces deux tests indiquent que l'effet cytotoxique du TiO_2 est très minime sur une période de 24h.

Le TiO_2 de type anatase entraîne une augmentation du contenu intracellulaire en ROS qui est dépendante de la concentration et du temps d'exposition. Cette augmentation est surtout significative à des concentrations de 70 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. À de telles concentrations de TiO_2 , un important stress oxydant est détecté suite à une exposition de 24h. Du fait de la production massive de ROS comme suite à l'exposition des cellules A549 au TiO_2 , une augmentation de l'activité des systèmes antioxydants cellulaires est à prévoir. Nous avons effectué la mesure du glutathion cellulaire. En fait, le glutathion est un antioxydant non enzymatique qui permet de maintenir un niveau non cytotoxique de ROS. Selon nos résultats, aucune modification du

contenu intracellulaire en glutathion n'a été observée. Cependant, il est fort probable que d'autres mécanismes antioxydants soient activés. L'activation d'un autre mécanisme de défense permettra aux cellules A549 de neutraliser les ROS. Ainsi, il n'y aura pas d'accumulation de ROS dans les cellules d'où la survie cellulaire selon les résultats des tests effectués (MTS et PrestoBlue). Pour confirmer cette hypothèse, il est ainsi important d'étudier d'autres mécanismes antioxydants. Si les cellules ne trouvent pas un équilibre entre les radicaux libres produits à cause de l'exposition aux TiO_2 et les défenses anti-oxydantes, les conséquences du stress oxydant peuvent être très dommageables à la survie cellulaire mais à une plus longue durée d'exposition, soit de plus de 24h.

2.2- Effets des nanotubes de carbone simple paroi sur les cellules pulmonaires humaines

En ce qui concerne les nanotubes de carbone simple paroi, le test MTS a montré qu'une exposition des cellules A549 à des concentrations de RN-000 (10-15 nm) comprises entre 10 et 1000 $\mu\text{g/mL}$ pour des périodes variant entre 1h et 24h induit une très faible, mais significative, altération de la viabilité cellulaire, dépendamment de la concentration et du temps d'exposition (Figure 7). En comparaison au test MTS, le test PrestoBlue montre une plus grande diminution de la viabilité cellulaire surtout à une concentration supérieure ou égale à 500 $\mu\text{g/mL}$ de RN-000 (Figure 8). Cette altération est significativement dépendante de la dose et du temps d'exposition des cellules A549. En fait, les nanotubes de carbone semblent interférer avec le matériel utilisé dans plusieurs techniques classiques d'étude de toxicité. Cette interférence peut biaiser les résultats de plusieurs de ces tests. Par exemple, une étude publiée en 2006 a montré que les NTC pouvaient entraîner des faux positifs avec le test de cytotoxicité le plus utilisé : le test MTS (Wörle-Knirsch et al., 2006). En effet, cette nanoparticule interagit avec les sels de tétrazolium utilisés pour ce test. Cette interférence a été confirmée dans d'autres études (Belyanskaya et al., 2007; Casey et al., 2007). Pour cette raison, un troisième test a été effectué pour confirmer la toxicité des nanotubes de carbone simple paroi. Le test d'exclusion du bleu de Trypan, confirme le résultat obtenu par le test MTS (figure 9). Les RN-000 de 10 à 1000 $\mu\text{g/mL}$ induisent une faible, mais significative, altération de la viabilité cellulaire, dépendamment de la concentration et du temps d'exposition. La viabilité cellulaire tend à diminuer en augmentant la concentration et la durée d'exposition au RN-000. Ainsi, on suppose qu'à long terme, les fortes concentrations de

RN-000 causent la mortalité cellulaire.

Les nanotubes de carbone simple paroi de la compagnie *Raymor* mènent à l'augmentation des ROS intracellulaires chez les cellules A549. Cette augmentation est surtout significative à partir de 4h d'exposition au RN-000. L'augmentation est à son maximum à la suite d'une exposition à 200 µg/mL de RN-000 pendant 24h. À de plus hautes concentrations, on remarque que l'intensité de la fluorescence diminue par rapport à 200 µg/mL de RN-000. Il est fort probable que de plus grandes concentrations de nanotubes de carbone interfèrent avec le réactif DCFH-DA, d'où la diminution de l'intensité de la fluorescence. De plus, à de hautes concentrations, la dispersion de cette nanoparticule n'est plus homogène. En fait, les nanotubes de carbone forment des agglomérats et des agrégats. Ceci biaise les résultats. De plus, selon les tests de viabilité cellulaire, des concentrations supérieures à 500 µg/mL semblent être toxiques pour les cellules. Ainsi, il se peut qu'on observe une diminution de l'intensité de la fluorescence à 500 et 1000 µg/mL de RN-000 puisqu'il y a moins de cellules vivantes dans les puits. En résumé, cette nanoparticule augmente le contenu intracellulaire en ROS en fonction de la concentration et du temps d'exposition. Le stress oxydatif est dû aux ROS. Il devient une situation pathologique dès que la cellule est submergée par les ROS. En d'autres mots, l'augmentation du contenu intracellulaire en ROS, à la suite de l'exposition à cette nanoparticule, comporterait un risque pour la santé. Ainsi, nous avons effectué le test de mesure de glutathion afin de savoir si la réponse oxydative est compensée par la cellule. Les résultats montrent que ce système de défense contre les ROS n'a pas été activé. Tel qu'expliqué concernant le dioxyde de titane, il est fort probable que d'autres mécanismes antioxydants soient activés. En résumé, un risque probable est accordé à une longue exposition à de fortes concentrations de RN-000 ayant une taille comprise entre 10 à 15 nm.

Les résultats avec le dioxyde de titane de type anatase et les nanotubes de carbone simple paroi indiquent que ces deux nanoparticules sont la cause de l'augmentation de ROS intracellulaires. Suite au test de glutathion, nous avons obtenu que ce système de défense n'a pas été activé après l'exposition à ces deux nanoparticules. Ainsi, nous ne pourrions pas tirer de conclusion concernant les effets de l'augmentation de ROS intracellulaires. Il faut étudier d'autres mécanismes antioxydants par lesquels la cellule pourrait compenser pour le stress

oxydatif. De plus, il est important d'étudier les effets de l'augmentation des ROS à long terme. La surexpression de ROS conduit au développement d'un stress oxydant qui peut être à l'origine d'une inflammation, de mutagenèses, etc.

2.3- Effets du noir de carbone sur les cellules pulmonaires humaines

Pour ce qui est de la 3^{ème} nanoparticule étudiée, une exposition des cellules A549 à des concentrations du noir de carbone (95 nm) comprises entre 1.25 et 80 µg/mL durant 1h, 4h, 8h et 24h diminue faiblement, mais significativement, la viabilité cellulaire. Toutefois la diminution de la survie cellulaire à la suite de ces différentes concentrations de LB101 est plus faible que celle observée avec le H₂O₂. Entre 4h et 8h, il y a une diminution significative de la survie cellulaire. Cependant, entre 8h et 24h d'exposition des cellules A549 au LB101, on observe une augmentation significative de la viabilité cellulaire. Il se peut qu'avec le temps, les cellules résistent aux effets cytotoxiques de cette nanoparticule en activant des mécanismes de défense. Ainsi, on observe moins de mortalité cellulaire. Pour vérifier cette hypothèse, des tests pour étudier des mécanismes peuvent être effectués. L'inflammation est un phénomène de défense. Il repose sur une interaction complexe entre des cytokines proinflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), l'interféron- γ , l'interleukine-1 β (IL-1 β), ou le Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et des cytokines antiinflammatoires, comme le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ou l'IL-10 ainsi que les cellules de l'inflammation (neutrophiles, lymphocytes, macrophages, cellules présentatrices d'antigènes, mastocytes). Ainsi, nous pouvons mesurer différentes cytokines afin de voir si ce système de défense est activé. Il est à noter qu'une inflammation chronique peut également donner lieu à des pathologies comme le cancer, des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou encore être impliquée dans des maladies dites autoimmunes. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de cette nanoparticule, ainsi que des deux autres NPM, à plus long terme. Pour résumer, LB101 (95 nm) à des concentrations comprises entre 1.25 et 80 µg/mL durant 1h, 4h, 8h et 24h entraîne un taux de mortalité cellulaire minime mais significatif.

Le noir de carbone LB101 entraîne aussi une augmentation du contenu intracellulaire en ROS qui est dépendante de la concentration et du temps d'exposition. Ceci signifie que le noir de carbone est la cause du stress oxydant. Les 3 concentrations de LB101 les plus élevées utilisées

(40, 60 et 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) montrent une différence significative dans le temps. Donc, de hautes concentrations en noir de carbone semblent comporter un risque si les ROS ne sont pas neutralisés par les antioxydants. Faute de temps, nous n'avons pas pu étudier aucun mécanisme antioxydant suite à l'exposition des cellules A549 au noir de carbone.

2.4- Effets des nanoparticules manufacturées étudiées

Même si les réponses cellulaires semblent globalement avoir un profil proche, l'activité biologique engendrée par ces trois nanoparticules n'est pas de la même intensité. En plus, dans ce projet, la comparaison n'a pas été faite à dose équivalente. De nombreux facteurs physicochimiques autres que la taille et la composition chimique ont été démontrés pouvoir moduler les effets biologiques des NPM, en particulier leur forme (Hamilton et al., 2009 ; Teeguarden et al., 2011) et leur variété cristalline (Morishige et al., 2010 ; Warhet et al., 2007 ; Sayes et al., 2006) ou leur surface spécifique (Monteiller et al., 2007).

2.5- Perspectives

Le but de ce mémoire était d'enrichir les connaissances sur les effets biologiques des NPM de TiO_2 , de nanotubes de carbone simple paroi et de noir de carbone. Plusieurs points restent encore à éclaircir concernant cette étude :

- Étudier les effets de ces 3 nanoparticules sur une plus longue durée de temps.
- Étudier différents mécanismes antioxydants.
- Étudier les effets de ces nanoparticules manufacturées sur d'autres types de cellules telles que les cellules macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales bronchiques, les cellules cutanées, etc.
- Étudier les effets de ces 3 nanoparticules sur des cellules primaires.
- Déterminer s'il y a internalisation cellulaire des NPM à l'aide de la microscopie électronique.

De façon à affiner les résultats obtenus, l'expérience suivante pourrait être réalisée :

- Obtenir une meilleure dispersion des nanoparticules.

Afin d'observer l'effet de la taille des particules indépendamment de leur état d'agglomération/agrégation, l'utilisation des agents dispersants pourrait être envisagée.

D'autres points peuvent être approfondis :

- Étudier les effets génotoxiques de ces nanoparticules.

Au niveau phénotypique : voir s'il y a apparition de cassures à l'ADN ou des lésions oxydative de l'ADN.

Au niveau post-transcriptionnel : voir s'il y a amplification de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.

- Nos résultats montrent qu'il y a une diminution de la survie cellulaire comme suite à l'exposition à ces différentes NPM. Ainsi, il serait intéressant d'effectuer des tests plus approfondis afin de déterminer si ces NPM mènent à l'apoptose.
- Enfin, valider les résultats sur des modèles *in vivo*.

Conclusion

Ce travail aura permis de répondre à plusieurs questions concernant les effets biologiques des NPM de TiO_2 , de nanotubes de carbone simple paroi et de noir de carbone. Les trois nanoparticules étudiées présentent le même profil. Elles ne semblent pas être toxiques pour les cellules A549 car il y a une diminution significative mais minime de la viabilité cellulaire. Cependant, ces trois NPM contribuent à l'augmentation du contenu intracellulaire en ROS. S'ils sont neutralisés, les ROS ne présentent pas de grand danger. Cependant, leur surexpression conduit au développement d'un stress oxydant qui peut être à l'origine d'une inflammation, de mutagenèses, etc. L'augmentation de ROS peut être à la base de plusieurs pathologies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardio-vasculaires, etc. Ainsi, il est important d'étudier les mécanismes de défense anti-oxydants de la cellule. Ce travail suggère donc que l'exposition de cellules épithéliales alvéolaires humaines à des NPM de TiO_2 , de nanotubes de carbone simple paroi et de noir de carbone est susceptible d'avoir des conséquences pathologiques. Lors de notre étude, aucune modification du contenu intracellulaire en glutathion n'a été observée. Cependant, d'autres mécanismes antioxydants peuvent être activés. Ainsi, il est important de les étudier afin de conclure si cette augmentation de ROS est dangereuse ou non. Compte tenu de l'engouement suscité par les nanoparticules, le nombre de travailleurs exposés aux nanoparticules manufacturées devrait s'accroître au cours des prochaines années. Étant donné que les risques sur la santé humaine ne sont pas très bien connus et évalués, il est recommandé d'appliquer le principe de précaution et de rechercher le niveau d'exposition le plus bas possible.

Bibliographie

Aam, Berit Bjugan, and F. Fonnum. "Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages in vitro." *Archives of toxicology* 81.6 (2007): 441-446.

Afaq, F., et al. "Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide." *Journal of Applied Toxicology* 18.5 (1998): 307-312.

Aitken, Robert J., et al. "A multidisciplinary approach to the identification of reference materials for engineered nanoparticle toxicology." *Nanotoxicology* 2.2 (2008): 71-78.

Ames, Bruce N., Mark K. Shigenaga, and Tory M. Hagen. "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.17 (1993): 7915-7922.

Athinarayanan, Jegan, et al. "Identification of Nanoscale Ingredients in Commercial Food Products and their Induction of Mitochondrially Mediated Cytotoxic Effects on Human Mesenchymal Stem Cells." *Journal of food science* 80.2 (2015): N459-N464.

Baan, Robert A. "Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group." *Inhalation Toxicology* 19.sup1 (2007): 213-228.

Babior, Bernard M. "NADPH oxidase: an update." *Blood* 93.5 (1999): 1464-1476.

Bai, Yuhong, et al. "Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility." *Nature nanotechnology* 5.9 (2010): 683-689.

Baisch, Brittany L., et al. "Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation." *Part Fibre Toxicol* 11.5 (2014): b5.

Bakand, Shahnaz, Amanda Hayes, and Finance Dechsakulthorn. "Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure." *Inhalation Toxicology* 24.2 (2012): 125-135.

Balaban, Robert S., Shino Nemoto, and Toren Finkel. "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* 120.4 (2005): 483-495.

Barillet, Sabrina, et al. "Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study." *Journal of nanoparticle research* 12.1 (2010): 61-73.

Baughman, Ray H., Anvar A. Zakhidov, and Walt A. de Heer. "Carbon nanotubes--the route toward applications." *Science* 297.5582 (2002): 787-792.

Belyanskaya, Larisa, et al. "The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction." *Carbon* 45.13 (2007): 2643-2648.

Bernholc, J., et al. "Theory of growth and mechanical properties of nanotubes." *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 67.1 (1998): 39-46.

Bonekamp, Nina A., et al. "Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance." *Biofactors* 35.4 (2009): 346-355.

Bonner, James C., et al. "Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium." *Environmental health perspectives* 121.6 (2013): 676-682.

Borm, Paul JA, and Roel PF Schins. "Toxicological Characterization of Engineered Nanoparticles." *DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES* 159 (2006): 161.

Bottini, Massimo, et al. "Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis." *Toxicology letters* 160.2 (2006): 121-126.

Boveris, Alberto, Maria Erecińska, and Michael Wagner. "Reduction kinetics of cytochromes b." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 256.2 (1972): 223-242.

Brash, Alan R. "Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate." *Journal of Biological Chemistry* 274.34 (1999): 23679-23682.

Brozdnicenko, A. N., et al. "Magnetic properties of multiwall carbon nanotubes and astralenes in strong electric fields." *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques* 1.1 (2007): 110-112.

Cadenas, Enrique, et al. "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." *Archives of biochemistry and biophysics* 180.2 (1977): 248-257.

Cann, R. L., and A. C. Wilson. "Length mutations in human mitochondrial DNA." *Genetics* 104.4 (1983): 699-711.

Carero, A. Don Porto, et al. "Genotoxic effects of carbon black particles, and urban particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1)." *Environ. Mol. Mutagen* 37 (2001): 155-163.

Carrero-Sanchez, J. C., et al. "Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen." *Nano Letters* 6.8 (2006): 1609-1616.

Casey, A., et al. "Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity." *Carbon* 45.7 (2007): 1425-1432.

Celzard, A., et al. "Electrical conductivity of anisotropic expanded graphite-based monoliths." *Journal of Physics D: Applied Physics* 33.23 (2000): 3094.

Chance, Britton, Helmut Sies, and A. L. B. E. R. T. Boveris. "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol Rev* 59.3 (1979): 527-605.

- Chen, Jean L., and William E. Fayerweather. "Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide." *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 30.12 (1988): 937-942.
- Chen, W. X., et al. "Tribological application of carbon nanotubes in a metal-based composite coating and composites." *Carbon* 41.2 (2003): 215-222.
- Chen, Xiaobo, and Samuel S. Mao. "Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications." *Chemical reviews* 107.7 (2007): 2891-2959.
- Chen, Wei, et al. "High concentrations of genistein exhibit pro-oxidant effects in primary muscle cells through mechanisms involving 5-lipoxygenase-mediated production of reactive oxygen species." *Food and Chemical Toxicology* 67 (2014): 72-79.
- Choi, Soo-Jin, Jae-Min Oh, and Jin-Ho Choy. "Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells." *Journal of Inorganic Biochemistry* 103.3 (2009): 463-471.
- Comhair, Suzy AA, and Serpil C. Erzurum. "Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283.2 (2002): L246-L255.
- Cortopassi, G. A., et al. "A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.16 (1992): 7370-7374.
- Davies, Michael J., et al. "Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease." *Free Radical Biology and Medicine* 27.11 (1999): 1151-1163.
- Davies, Michael J. "The oxidative environment and protein damage." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1703.2 (2005): 93-109.
- Davoren, Maria, et al. "In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells." *Toxicology in vitro* 21.3 (2007): 438-448.
- Delgado-Buenrostro, Norma L., et al. "Nrf2 protects the lung against inflammation induced by titanium dioxide nanoparticles: A positive regulator role of Nrf2 on cytokine release." *Environmental toxicology* (2014).
- Dell, Linda D., et al. "A cohort mortality study of employees in the US carbon black industry." *Journal of occupational and environmental medicine* 48.12 (2006): 1219-1229.
- Demilecamps, Louis, and Hélène ANDRE. "Le projet PICADA (Photocatalytic Innovative Coverings Applications for Depollution Assessment)." *Travaux* 821 (2005): 69-73.
- De Volder, Michael FL, et al. "Carbon nanotubes: present and future commercial applications." *Science* 339.6119 (2013): 535-539.
- Dillard, Cora J., Masaru Sagai, and Al L. Tappel. "Respiratory pentane: a measure of in vivo lipid peroxidation applied to rats fed diets varying in polyunsaturated fats, vitamin E, and selenium and exposed to nitrogen dioxide." *Toxicology letters* 6.4 (1980): 251-256.

Dresselhaus, Mildred S., Gene Dresselhaus, and Peter C. Eklund. *Science of fullerenes and carbon nanotubes: their cproperties and applications*. Academic press, 1996.

Dröge, Wulf. "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiological reviews* 82.1 (2002): 47-95.

Ellis, Elizabeth D., et al. "Mortality among titanium dioxide workers at three DuPont plants." *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 52.3 (2010): 303-309.

Elo, R., et al. "Pulmonary deposits of titanium dioxide in man." *Archives of pathology* 94.5 (1972): 417.

Emerich, Dwaine F., and Christopher G. Thanos. "Nanotechnology and medicine." *Expert Opinion on Biological Therapy* 3.4 (2003): 655-663.

Endo, M., et al. "Structural characterization of cup-stacked-type nanofibers with an entirely hollow core." *Applied Physics Letters* 80.7 (2002): 1267-1269.

Evans, William J. "Vitamin E, vitamin C, and exercise." *The American journal of clinical nutrition* 72.2 (2000): 647s-652s.

Falck, G. C. M., et al. "Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂." *Human & experimental toxicology* 28.6-7 (2009): 339-352.

Favier, A. "Stress oxydant et pathologies humaines." *Annales pharmaceutiques françaises*. Vol. 64. No. 6. Elsevier Masson, 2006.

Ferin, J. G. D. P., G. Oberdörster, and D. P. Penney. "Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 6.5 (1992): 535-542.

Friedberg, Errol C., and Lisiane B. Meira. "Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7." *DNA repair* 5.2 (2006): 189-209.

Fryzek, Jon P., et al. "A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States." *Journal of occupational and environmental medicine* 45.4 (2003): 400-409.

Fujishima, I., and K. Honda. "Photoelectrolysis of water using titanium oxide." *Nature* 238 (1972): 38.

Gaetani, G. F., et al. "Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide." *Blood* 87.4 (1996): 1595-1599.

Gajjar, Priyanka, et al. "Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440." *J Biol Eng* 3.9 (2009): 1-13.

Garabrant DH, Fine LJ, Oliver C, Bernstein L, Peters JM: Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers. *Scand J Work Environ Health* (1987):13:47-51.

Grune, Tilman, et al. "Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome." *Biochemical and biophysical research communications* 305.3 (2003): 709-718.

Gurr, Jia-Ran, et al. "Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells." *Toxicology* 213.1 (2005): 66-73.

Hamilton RF, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M, Holian A: Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part Fibre Toxicol* 2009, 6:35-46.

Harrison, Roger. "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?." *Free Radical Biology and Medicine* 33.6 (2002): 774-797.

Heyd, R., A. Charlier, and E. McRae. "Uniaxial-stress effects on the electronic properties of carbon nanotubes." *Physical Review B* 55.11 (1997): 6820.

Hillegass, Jedd M., et al. "Assessing nanotoxicity in cells in vitro." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2.3 (2010): 219-231.

Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV: Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* 2004, 2:12-27.

Huczko, A., and H. Lange. "Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy." *Fullerene Science and Technology* 9.2 (2001): 247-250.

Huczko, Andrzej, et al. "Physiological testing of carbon nanotubes: are they asbestos-like?." *Fullerene science and technology* 9.2 (2001): 251-254.

Hussain, Salik, et al. "Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount." *Toxicology* 260.1 (2009): 142-149.

Hussain, Salik, et al. "Research Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells." (2010).

Iijima, Sumio. "Helical microtubules of graphitic carbon." *nature* 354.6348 (1991): 56-58.

Lu, Jian Ping. "Elastic properties of carbon nanotubes and nanoropes." *Physical Review Letters* 79.7 (1997): 1297.

Jacobsen, Nicklas Raun, et al. "Increased mutant frequency by carbon black, but not quartz, in the lacZ and cII transgenes of muta™ mouse lung epithelial cells." *Environmental and molecular mutagenesis* 48.6 (2007): 451-461.

Ji, Li Li, and Ronggen Fu. "Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide." *Journal of Applied Physiology* 72.2 (1992): 549-554.

Jia, Guang, et al. "Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene." *Environmental science & technology* 39.5 (2005): 1378-1383.

Jin, Chuanhong, Kazu Suenaga, and Sumio Iijima. "Plumbing carbon nanotubes." *Nature Nanotechnology* 3.1 (2008): 17-21.

Johnston, Blair D., et al. "Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to fish." *Environmental science & technology* 44.3 (2010): 1144-1151.

Jones, C. M., et al. "Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide." *Biochemical Society Transactions* 31.6 (2003): 1337-1340.

Jugan, M. L., et al. "Cytotoxic and genotoxic impact of TiO₂ nanoparticles on A549 cells." *Journal of biomedical nanotechnology* 7.1 (2011): 22-23.

Jugan, Mary-Line, et al. "Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells." *Nanotoxicology* 6.5 (2012): 501-513.

Kagan, V. E., et al. "Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron." *Toxicology letters* 165.1 (2006): 88-100.

Kam, Nadine Wong Shi, et al. "Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.33 (2005): 11600-11605.

Kang, Su Jin, et al. "Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes." *Environmental and molecular mutagenesis* 49.5 (2008): 399-405.

Kansara, Krupa, et al. "TiO₂ nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells." *Environmental and molecular mutagenesis* 56.2 (2015): 204-217.

Karmakar, Alokita, Qinli Zhang, and Yongbin Zhang. "Neurotoxicity of nanoscale materials." *Journal of food and drug analysis* 22.1 (2014): 147-160.

Kato, Yuichi, et al. "Thermodynamics on soluble carbon nanotubes: how do DNA molecules replace surfactants on carbon nanotubes?." *Scientific reports* 2 (2012).

Kisin, Elena R., et al. "Single-walled carbon nanotubes: geno-and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 70.24 (2007): 2071-2079.

Koike, Eiko, and Takahiro Kobayashi. "Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles." *Chemosphere* 65.6 (2006): 946-951.

Koyama, Shozo, et al. "In vivo immunological toxicity in mice of carbon nanotubes with impurities." *Carbon* 47.5 (2009): 1365-1372.

Krug, Harald F., and Peter Wick. "Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge." *Angewandte Chemie International Edition* 50.6 (2011): 1260-1278.

Lam, Chiu-Wing, et al. "Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation." *Toxicological Sciences* 77.1 (2004): 126-134.

L'Azou, Béatrice, et al. "In vitro effects of nanoparticles on renal cells." *Part Fibre Toxicol* 5.22 (2008): 651-63.

Lee J, Hwang J, Kim HS, Kim S, Kim YH, Park SY, Kim KS, Ryoo ZY, Chang KT, Lee S: A comparison of gene expression profiles between primary human AML cells and AML cell line. *Genes Genet Syst* 2008, 83:339-345.

Levine, Rodney L. "Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease 2, 3." *Free Radical Biology and Medicine* 32.9 (2002): 790-796.

Li, Jian-Jian, et al. "Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase." *Oncogene* 10.10 (1995): 1989-2000.

Li, Xiao Yang, et al. "Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats." *Inhalation toxicology* 11.8 (1999): 709-731.

Liu, Huiting, et al. "Toxicity of nano-anatase TiO₂ to mice: liver injury, oxidative stress." *Toxicological & Environmental Chemistry* 92.1 (2010): 175-186.

Marnett, Lawrence J. "Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424.1 (1999): 83-95.

Masella, Roberta, et al. "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." *The Journal of nutritional biochemistry* 16.10 (2005): 577-586.

MatÉs, José M., Cristina Pérez-Gómez, and Ignacio Núñez De Castro. "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clinical biochemistry* 32.8 (1999): 595-603.

Mattie, Michael D., and Jonathan H. Freedman. "Protective effects of aspirin and vitamin E (α -tocopherol) against copper- and cadmium-induced toxicity." *Biochemical and biophysical research communications* 285.4 (2001): 921-925.

McKelvey, T. G., et al. "Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 254.5 (1988): G753-G760.

Medina-Reyes, Estefany I., et al. "Titanium dioxide nanoparticles induce an adaptive inflammatory response and invasion and proliferation of lung epithelial cells in chorioallantoic membrane." *Environmental research* 136 (2015): 424-434.

Mendonça, Gustavo, et al. "Advancing dental implant surface technology—from micron- to nanotopography." *Biomaterials* 29.28 (2008): 3822-3835.

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

Morel, Yannick, Nicolas Mermoud, and Robert Barouki. "An Autoregulatory Loop Controlling CYP1A1 Gene Expression: Role of H₂O₂ and NFI." *Molecular and cellular biology* 19.10 (1999): 6825-6832.

Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S: Titanium dioxide induces different levels of IL-1 β production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 392:160-165.

Mroz, R. M., et al. "NANOPARTICLE CARBON BLACK DRIVEN DNA DAMAGE INDUCES GROWTH ARREST AND AP-1 AND NF κ B DNA BINDING IN LUNG EPITHELIAL A549 CELL LINE." *Journal of physiology and pharmacology* 58.5 (2007): 461-470.

Mueller, Nicole C., and Bernd Nowack. "Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment." *Environmental science & technology* 42.12 (2008): 4447-4453.

Mueller, Sebastian, Hans-Dieter Riedel, and Wolfgang Stremmel. "Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes." *Blood* 90.12 (1997): 4973-4978.

Muller, Julie, et al. "Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes." *Toxicology and applied pharmacology* 207.3 (2005): 221-231.

Muller, Julie, François Huaux, and Dominique Lison. "Respiratory toxicity of carbon nanotubes: how worried should we be?." *Carbon* 44.6 (2006): 1048-1056.

Nanotech. Nanotubes hanging in there. *Nanotech Magazine*. (Edition 13) 2013:4-5.

Nogueira, Cristina W., Gilson Zeni, and Joao BT Rocha. "Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology." *Chemical Reviews* 104.12 (2004): 6255-6286.

Oberdörster, Günter, and Chia-Ping Yu. "The carcinogenic potential of inhaled diesel exhaust: a particle effect?." *Journal of Aerosol Science* 21 (1990): S397-S401.

Oberdörster, Günter, et al. "Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats." *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 65.20 (2002): 1531-1543.

Odom, Teri Wang, et al. "Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes." *Nature* 391.6662 (1998): 62-64.

Osmond-McLeod, Megan J., et al. "Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres." *Part Fibre Toxicol* 8.15 (2011): 1-18.

Øvrevik, J., et al. "Cytokine and chemokine expression patterns in lung epithelial cells exposed to components characteristic of particulate air pollution." *Toxicology* 259.1 (2009): 46-53.

Packer, Lester. "Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete." *Journal of sports sciences* 15.3 (1997): 353-363.

Pacurari, Maricica, Vince Castranova, and Val Vallyathan. "Single-and multi-wall carbon nanotubes versus asbestos: are the carbon nanotubes a new health risk to humans?." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 73.5-6 (2010): 378-395.

Parks, DALE A., TANYA K. Williams, and JOSEPH S. Beckman. "Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 254.5 (1988): G768-G774.

Pauluhn, Jürgen. "Multi-walled carbon nanotubes (Baytubes®): approach for derivation of occupational exposure limit." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 57.1 (2010): 78-89.

Peng, Jun, Graham L. Jones, and Kenneth Watson. "Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements." *Free Radical Biology and Medicine* 28.11 (2000): 1598-1606.

Pfuhler, Stefan, et al. "Genotoxicity of nanomaterials: refining strategies and tests for hazard identification." *Environmental and molecular mutagenesis* 54.4 (2013): 229-239.

Piccinno, Fabiano, et al. "Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world." *Journal of Nanoparticle Research* 14.9 (2012): 1-11.

Poland, Craig A., et al. "Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study." *Nature nanotechnology* 3.7 (2008): 423-428.

Ponce, M. A., et al. "Impedance spectroscopy analysis of TiO₂ thin film gas sensors obtained from water-based anatase colloids." *Sensors and Actuators B: Chemical* 139.2 (2009): 447-452.

Porter, Dale W., et al. "Mouse pulmonary dose-and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes." *Toxicology* 269.2 (2010): 136-147.

Powers, Scott K., and Shannon L. Lennon. "Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle." *Proceedings of the Nutrition Society* 58.04 (1999): 1025-1033.
Pulskamp, Karin, Silvia Diabaté, and Harald F. Krug. "Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants." *Toxicology letters* 168.1 (2007): 58-74.

Rahman, Qamar, et al. "Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts." *Environmental health perspectives* 110.8 (2002): 797-802.

Richter, Christoph, Jeen-Woo Park, and Bruce N. Ames. "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85.17 (1988): 6465-6467.

Ross Bryony, SAFENANO proactive risk assessment for nanotechnologies (2009), consulté en ligne le 25 juin 2015: www.safenano.org

Sambandan, Divya R., and Desiree Ratner. "Sunscreens: an overview and update." *Journal of the American Academy of Dermatology* 64.4 (2011): 748-758.

Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL: Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 2006, 92:174-185.

Schweinberger, Florian F., and Asmus Meyer-Plath. "Status of characterization techniques for carbon nanotubes and suggestions towards standards suitable for toxicological assessment." *Journal of Physics: Conference Series*. Vol. 304. No. 1. IOP Publishing, 2011.

Serero, Alexandre, et al. "Yeast genes involved in cadmium tolerance: identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity." *DNA repair* 7.8 (2008): 1262-1275.

Shukla, Ritesh K., et al. "ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells." *Toxicology in Vitro* 25.1 (2011): 231-241.

Shukla, Ritesh K., et al. "TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells." *Nanotoxicology* 7.1 (2013): 48-60.

Shvedova, Anna A., et al. "Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 289.5 (2005): L698-L708.

Shvedova, Anna A., et al. "Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 295.4 (2008): L552-L565.

Sies, Helmut. "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Experimental physiology* 82.2 (1997): 291-295.

Simon-Deckers, A., et al. "In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes." *Toxicology* 253.1 (2008): 137-146.

Slezakova, Klara, Simone Morais, and Maria do Carmo Pereira. "Atmospheric Nanoparticles and Their Impacts on Public Health." (2013).

Song, Yuguo, et al. "Nanomaterials in Humans Identification, Characteristics, and Potential Damage." *Toxicologic pathology* 39.5 (2011): 841-849.

Sorahan, Tom, et al. "A cohort mortality study of UK carbon black workers, 1951–1996." *American journal of industrial medicine* 39.2 (2001): 158-170.

Stadtman, Earl R., and Rodney L. Levine. "Chemical modification of proteins by reactive oxygen species." *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases* 9.3 (2006): 293-304.

Stratton, Michael R., et al. "Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q." *Nature genetics* 7.1 (1994): 103-107.

Sun, Dong-ming, et al. "Flexible high-performance carbon nanotube integrated circuits." *Nature nanotechnology* 6.3 (2011): 156-161.

Teeguarden JG, Webb-Robertson BJ, Waters KM, Murray AR, Kisin ER, Varnum SM, Jacobs JM, Pounds JG, Zanger RC, Shvedova AA: Comparative proteomics and pulmonary toxicity of instilled single-walled carbon nanotubes, crocidolite asbestos, and ultrafine carbon black in mice. *Toxicol Sci* 2011, 120:123-135

Thannickal, Victor J. "The paradox of reactive oxygen species: injury, signaling, or both?." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 284.1 (2003): L24-L25.

Toussaint, Olivier, Andrée Houbion, and José Remacle. "Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity." *Toxicology* 81.2 (1993): 89-101.

Turrens, Julio F., and Alberto Boveris. "Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria." *Biochem. J* 191 (1980): 421-427.

Turrens, Julio F., Bruce A. Freeman, and James D. Crapo. "Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes." *Archives of biochemistry and biophysics* 217.2 (1982): 411-421.

Val, Stéphanie, et al. "Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts." *Inhalation toxicology* 21.sup1 (2009): 115-122.

Vásquez-Vivar, Jeannette, et al. "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.16 (1998): 9220-9225.

Warheit, David B., et al. "Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats." *Toxicological sciences* 77.1 (2004): 117-125.

Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM: Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007, 230:90-104.

Wellmann, Jürgen, et al. "Cancer mortality in German carbon black workers 1976–98." *Occupational and environmental medicine* 63.8 (2006): 513-521.

Wick, Peter, et al. "The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity." *Toxicology letters* 168.2 (2007): 121-131.

Wörle-Knirsch, J. M., K. Pulskamp, and H. F. Krug. "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays." *Nano letters* 6.6 (2006): 1261-1268.

Xia, Tian, et al. "Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium." *Environmental health perspectives* 121.6 (2013): 683-690.

Yakobson, B. I. "Mechanical relaxation and "intramolecular plasticity" in carbon nanotubes." *Applied Physics Letters* 72.8 (1998): 918-920.

Yang, J. Joshua, et al. "Memristive switching mechanism for metal/oxide/metal nanodevices." *Nature nanotechnology* 3.7 (2008): 429-433.

Yang, Hui, et al. "Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition." *J Appl Toxicol* 29.1 (2009): 69-78.

Youn, Cha-Kyung, et al. "hMTH1 depletion promotes oxidative-stress-induced apoptosis through a Noxa-and caspase-3/7-mediated signaling pathway." *DNA repair* 7.11 (2008): 1809-1823.

Zhao, Anqi, Justus Masa, and Wei Xia. "Very low amount of TiO₂ on N-doped carbon nanotubes significantly improves oxygen reduction activity and stability of supported Pt nanoparticles." *Physical Chemistry Chemical Physics* 17.16 (2015): 10767-10773.

Annexe I

Tableau III. Les critères de classement des agents selon le degré d'indication de cancérogénicité par le CIRC*.

Classe d'agents	Critères de détermination du degré d'indication de risque pour l'homme et pour l'animal de laboratoire :	Exemple
Agent cancérogène pour l'homme (groupe 1)	Indications suffisantes de cancérogénicité pour l'homme.	Amiante
Agent probablement cancérogène pour l'homme (groupe 2A)	Indications limitées de cancérogénicité chez l'homme et suffisantes chez l'animal.	Tétrachloroéthylène
Agent peut-être cancérogène pour l'homme (groupe 2B)	Forme 1 : Indications limitées de cancérogénicité chez l'homme et insuffisantes chez l'animal. Forme 2 : Indications insuffisantes chez l'homme et suffisantes chez l'animal.	Dioxyde de titane Noir de carbone
Agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme (groupe 3)	Indications insuffisantes chez l'homme et insuffisantes ou limitées chez l'animal	Caféine
Agent n'est probablement pas cancérogène pour l'homme (groupe 4)	Indications suggérant une absence de cancérogénicité chez l'homme et chez l'animal de laboratoire.	caprolactame

*CIRC, classification des substances cancérogènes, consulté en ligne le 25 août 2015 :

http://www.cancer-environnement.fr/226-Classification-du-CIRC.ce.aspx#D_finition_des_degr_d_indications_de_canc_rog_nicit

