UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR 7199

THÈSE présentée par :

Carole RONZANI

soutenue le : **17 septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Toxicologie

BIODISTRIBUTION ET TOXICITÉ RESPIRATOIRES DES NANOTUBES DE CARBONE CHEZ LA SOURIS NORMALE ET DANS UN MODÈLE MURIN D'ASTHME ALLERGIQUE

THÈSE dirigée par :

Madame PONS Françoise	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur LAGENTE Vincent	Professeur, Université de Rennes 1
Monsieur PALLARDY Marc	Professeur, Université de Paris-Sud

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Monsieur COLL Jean-Luc	Directeur de Recherches, Université de Grenoble
Monsieur de BLAY Frédéric	Professeur, Université de Strasbourg

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du jury de cette thèse :

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Vincent Lagente, Professeur à l'Université de Rennes 1, qui a accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance et ma considération respectueuse.

Je remercie également vivement Monsieur le Professeur Marc Pallardy, Professeur à l'Université de Paris-Sud, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude et de toute ma considération.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à Monsieur le Docteur Jean-Luc Coll, Directeur de Recherches à l'INSERM, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'il reçoive ici l'expression de ma reconnaissance et de toute ma considération.

Je tiens à exprimer toute ma considération à Monsieur le Professeur Frédéric de Blay, Professeur à l'Université de Strasbourg et Praticien Hospitalier, de m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse. Je lui en suis très reconnaissante et lui exprime mon profond respect.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (UMR CNRS-UdS 7199), sous la direction de Madame le Professeur Françoise Pons, Professeur à l'Université de Strasbourg. Je tiens à lui exprimer ici toute ma gratitude pour son encadrement, son écoute, ses conseils précieux, sa bienveillance, ainsi que pour le temps qu'elle m'a consacré et la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à Monsieur le Docteur Luc Lebeau, Directeur de l'UMR 7199, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour sa collaboration à ce projet. Je tiens à lui exprimer ici mes sincères remerciements pour sa disponibilité et pour son aide tout au long de ce projet et dans l'élaboration de ce mémoire.

Je remercie Monsieur Jean-Luc Vonesch, Directeur de la plateforme d'imagerie de l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC) de Strasbourg, pour sa collaboration à ce projet. Je souhaite également adresser mes remerciements les plus sincères à Yannick Schwab, Pascal Kessler, Yves Lutz et Coralie Spiegelhalter pour leur contribution à ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame le Docteur Anne Casset, Maître de Conférences à l'Université de Strasbourg, pour sa disponibilité, son enthousiasme, sa rigueur et surtout pour toute l'aide qu'elle m'a apportée dans la réalisation de ce travail.

Je salue l'ensemble des membres de l'équipe de Biovectorologie, dirigée par le Docteur Benoit Frisch, dont la bonne humeur et l'enthousiasme m'ont permis de mener à bien mon travail de recherche dans une ambiance toujours amicale.

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier du projet par l'Agence Nationale de la Recherche, que je tiens ici à remercier.

Un grand merci également à toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de cette thèse, en particulier Pierre Edouard Kastner, Dimitri Kereselidze, Simona Nemska, Manuel Neves, François Daubeuf, Christine Lehalle et Antoine François. Je vous remercie pour tous ces bons moments passés ensemble au laboratoire ou en dehors.

Je remercie de tout cœur mes parents et mon frère, de m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de mes études.

Merci à David, pour ta présence, ta compréhension et ton soutien sans faille.

Abréviations ... 8

Résumé ... 10

Avant-propos ... 17

Chapitre 1 – Introduction ... 19

Partie A – Nanotubes de carbone ... 19

A.I. Structure ... 19
A.II. Modes de production ... 20
A.III. Propriétés technologiques ... 21
A.IV. Applications ... 22
A.IV.1. Applications industrielles ... 22
A.IV.2. Applications en médecine ... 23
A.IV.2.1. Ingénierie biomédicale ... 23
A.IV.2.2. Dépistage et diagnostic thérapeutiques ... 23
A.IV.2.3. Imagerie médicale ... 24
A.IV.2.4. Vectorisation de principes actifs ... 24
A.IV.2.5. Thérapie anti-cancéreuse ... 25

Partie B – Biodistribution des NTC dans les voies respiratoires ... 26

B.I. La voie respiratoire, une voie d'exposition aux NTC ... 26
B.I.1. Données d'exposition aux NTC en milieu professionnel ... 26
B.I.2. Données d'exposition aux NTC dans la population générale ... 27
B.I.2.1. Exposition directe aux NTC ... 27
B.I.2.2. Exposition indirecte *via* l'environnement ... 27
B.II. Devenir des NTC dans l'arbre respiratoire et l'organisme ... 28
B.II.1. Rappels sur l'organisation de l'appareil respiratoire ... 28
B.II.2. Rappels sur le devenir des NP dans l'arbre respiratoire ... 29
B.II.2.1. Dépôt ... 29
B.II.2.2. Élimination ... 29
B.II.2.3. Dissémination ... 30
B.II.3. Devenir des NTC dans les voies respiratoires ... 31
B.II.3.1. Méthodes d'étude de la biodistribution des NTC ... 31
B.II.3.1.1. Méthodes utilisant des NTC marqués à l'aide de radionucléides ... 31
B.II.3.1.2. Méthodes utilisant des NTC marqués à l'aide de fluorophores ... 33
B.II.3.1.3. Méthodes basées sur la détection de NTC non marqués ... 35
B.II.3.1.3.a. Spectroscopie Raman ... 35
B.II.3.1.3.b. Imagerie par résonance magnétique ... 36
B.II.3.1.3.c. Imagerie dans le proche IR ... 36
B.II.3.1.3.d. Microscopie optique en lumière blanche et microscopie électronique ... 37
B.II.3.2. État des connaissances sur la distribution des NTC dans l'appareil respiratoire ... 38

Partie C – Toxicité respiratoire des NTC 41

C.I. Rappels sur la toxicité des NP 41
C.I.1. Internalisation cellulaire 41
C.I.2. Stress oxydant : un rôle central dans la toxicité des NP 43
C.I.3. Inflammation 45
C.I.4. Génotoxicité 46
C.I.5. Mort cellulaire et prolifération 46
C.II. État des connaissances sur la toxicité respiratoire des NTC bruts 48
C.II.1 Réponse inflammatoire 48
C.II.2. Stress oxydant 50
C.II.3. Formation de granulomes 51
C.II.4. Réponse fibrotique 52
C.II.5. Génotoxicité et mésothéliome 53
C.II.5.1. Génotoxicité 53
C.II.5.2. Mésothéliome 53
C.II.6. Effets sur le système cardiovasculaire 55
C.III. Facteurs influençant la toxicité respiratoire des NTC 56
C.III.1. Caractéristiques physiques des NTC 56
C.III.2. Caractéristiques chimiques des NTC 57
C.III.2.1. Pureté des NTC 57
C.III.2.2. Fonctionnalisation des NTC 57
C.III.3. État d'agrégation des NTC 58

Partie D – Impact des NTC sur l'asthme allergique 60

D.I. Rappels sur l'asthme allergique 60
D.I.1. Caractéristiques physiopathologiques de l'asthme allergique 61
D.I.2. Mécanismes immunologiques de l'asthme allergique 62
D.I.2.1. La phase de sensibilisation à l'allergène 62
D.I.2.2. La réponse inflammatoire allergique aiguë 63
D.I.2.3. L'évolution vers une inflammation chronique et un remodelage des voies respiratoires 64
D.II. Impact des NP manufacturées sur l'asthme allergique 65
D.II.1. Données concernant les NP manufacturées autres que les NTC 65
D.II.2. Données concernant les NTC 66
D.II.3. Mécanismes mis en jeu 67
D.II.3.1. Activation des cellules présentatrices de l'antigène 67
D.II.3.2. Stress oxydant 68
D.II.3.3. Activation de l'inflammasome 68

Objectifs 70

Chapitre 2 – Matériel et méthodes 71

I. NTC utilisés dans cette étude 71
I.1. NTC bruts 71
I.2. NTC marqués par des fluorophores 71

II. Animaux 72
III. Mise au point d'une méthode de dispersion des NTC bruts en vue de leur administration chez l'animal par voie respiratoire 72
III.1. Préparation du surfactant pulmonaire synthétique et des autres milieux de dispersion 72
III.2. Préparation et caractérisation des dispersions de NTC 72
IV. Étude de la biodistribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris 73
IV.1. Observation des NTC marqués en MCF 74
IVI.1.1. Préparation des échantillons 74
IV.1.2. Observation des échantillons en MCF 75
IV.2. Étude de la biodistribution des NTC non marqués dans le poumon de souris 75
IV.2.1. Traitement des animaux 75
IV.2.2. Préparation des échantillons 75
IV.2.3. Observation des échantillons 76
V. Étude de l'impact des NTC bruts chez la souris 77
V.1. Mode d'administration des NTC et de l'extrait d'allergènes d'acariens dans les voies respiratoires de la souris 77
V.2. Protocoles d'exposition aux NTC 77
V.2.1. Protocoles d'exposition chez la souris normale 77
V.2.2. Protocoles d'exposition dans un modèle murin d'asthme 78
V.2.2.1. Modèle d'asthme allergique aux acariens 78
V.2.2.2. Exposition des animaux aux NTC dans ce modèle 78
V.3. Prélèvements des tissus et liquides biologiques 79
V.4. Dosage des immunoglobulines dans le sérum 79
V.5. Comptage des cellules totales et différentielles dans les LBA 80
V.6. Préparation des homogénats de poumon 80
V.7. Dosage des cytokines 81
V.8. Dosage du collagène 81
V.9. Dosage de la MMP-9 et de TIMP-1 81
V.10. Mesure du contenu en mucines 81
V.11. Mesure de la production d'ERO 82
V.12. Histologie 82
V.13. Analyses statistiques des données 82

Chapitre 3 – Résultats 83

Partie A – Mise au point d'une méthode de dispersion des NTC 83

A.I. Introduction 83
A.II. Objectifs 84
A.III. Résultats 85
A.III.1. Comparaison des différents agents dispersants utilisés 85
A.III.2. Caractérisation approfondie des dispersions dans le surfactant ou l'albumine 86

Partie B – Étude de la biodistribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris 87

B.I. Introduction 87
B.II. Objectifs 87
B.III. Résultats 90
B.III.1. Données issues des travaux sur les NTC marqués par des fluorophores 90
B.III.1.1. Marquage non covalent des NTC par des fluorophores hydrophobes 90
B.III.1.2. Marquage covalent des NTC par des fluorophores hydrophiles 91
B.III.1.3. Marquage non covalent des NTC par des fluorophores hydrophiles 92
B.III.2. Données issues des travaux sur les NTC non marqués 93
B.III.2.1. Étude de distribution par MO en lumière blanche et MET 93
B.III.2.2. Données obtenues par microscopie confocale IR 94

Partie C – Impact des NTC chez la souris normale 97

C.I. Introduction 97
C.II. Objectifs 97
C.III. Résultats 98
C.III.1. Effets respiratoires aigus ou répétés des NTC à dose fixe 98
C.III.2. Effet de doses croissantes de NTC après exposition répétée 99

Partie D – Impact des NTC dans un modèle murin d'asthme aux acariens 101

D.I. Introduction 101
D.II. Objectifs 102
D.III. Résultats 104
D.III.1. Effet d'une dose totale de 75 µg de NTC 104
D.III.1.1. Effet des NTC administrés dès la première exposition à l'extrait d'allergènes 104
D.III.1.2. Effet des NTC administrés à partir de la dernière exposition à l'extrait d'allergènes 106
D.III.2. Effet d'une dose totale de 225 µg de NTC 108
D.III.2.1. Effets mesurés deux semaines après la dernière exposition à l'extrait d'allergènes 108
D.III.2.2 Effets mesurés 48 heures après la dernière exposition à l'extrait d'allergènes 110

Chapitre 4 – Discussion 114

I. Mise au point d'une méthode de dispersion des NTC 114
II. Étude de la biodistribution des NTC dans les voies respiratoires 116
III. Impact des NTC chez la souris normale 122
IV. Impact des NTC dans un modèle murin d'asthme aux acariens 125

Chapitre 5 – Conclusion générale et Perspectives 131

Bibliographie 134

Annexes 156

Abréviations

ARE : Anti-oxidant Response Element

ASB : Albumine de Sérum Bovin

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

CCVD : Catalytic Chemical Vapor Deposition

CD : Cluster of Differentiation

Chol : Cholestérol

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Cy3 et Cy5 : Cyanine 3 et Cyanine 5

DAPI : Diamidino phénylindole

DC : Cellule Dendritique

DCF : Dichlorofluorescéine

DEP : Diesel Exhaust Particle

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

DPPC : Dipalmitoyl phosphatidylcholine

Dpt : *Dermatophagoïdes pteronyssinus*

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ELLA : Enzyme-Linked Lectin Assay

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

GFP : Green Fluorescent Protein

GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GST : Glutathion-S-Transferase

HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

HO-1 : Hème oxygénase 1

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Auger Electron Spectroscopy

IGBMC : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

INRS : Institut national de recherche et de sécurité

IR : Infrarouge

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

KC : Keratonicyte-derived Chemokine

LBA : Liquide de Lavage Bronchoalvéolaire

LDH : Lactate Déshydrogénase

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCF : Microscopie Confocale de Fluorescence

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1

ME : Microscopie Electronique

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MMP-9 : Matrix Metalloproteinase-9

MO : Microscopie Optique

MPO : Myéloperoxydase

MWCNT : Multi Wall Carbon Nanotube

NF-κB : Nuclear Factor-κB

NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health

NLRP3 : NOD-Like Receptor, Pyrin containing 3

NP : Nanoparticule

NQO-1 : NADPH Quinone Oxydoreductase 1

NTC : Nanotube de Carbone

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PAS : Periodic acid-Schiff

PBS : Phosphate Buffered Saline

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PEG : Polyéthylène Glycol

PET : Tomographie par Emission de Positons

PG : Phosphatidylglycérol

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SWCNT : Single Wall Carbon Nanotube

TARC : Thymus and Activation-regulated Chemokine

TDI : Terrylène Diimide

TGF : Transforming Growth Factor

TIMP-1: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1

TNF : Tumor Necrosis Factor

TSLP : Thymic Stromal Lymphopoïetin

WGA : Wheat germ agglutinin

Résumé

État de la question

Les nanotubes de carbone (NTC) ont été découverts en 1991 par Sumio Iijima. Figure emblématique des nanotechnologies, ces nanoparticules manufacturées connaissent actuellement un véritable essor, et constituent, avec les autres nanoparticules à base de carbone, les nanomatériaux les plus utilisés après les nanoparticules d'argent. La production mondiale de NTC atteint aujourd'hui plusieurs centaines de tonnes par an. Du fait de leurs propriétés électriques, thermiques (résistants aux hautes températures), et mécaniques (légers et plus solides que l'acier), ces matériaux émergents ouvrent des perspectives industrielles prometteuses et pourraient bientôt être utilisés, en masse, dans des secteurs divers tels que l'aéronautique, l'automobile ou encore les articles de sport.

Le développement extrêmement rapide des NTC, et des nanoparticules manufacturées en général, suscite cependant des inquiétudes dans l'opinion publique et chez les professionnels de santé. On sait en effet que l'inhalation répétée de particules micrométriques (silice, amiante) est toxique pour le poumon, et que cette toxicité est souvent liée à la capacité de ces particules à s'accumuler dans le tractus respiratoire. On suspecte par ailleurs que les particules de taille nanométrique ont une activité biologique plus importante, à masse comparable, que les particules plus grosses. Ainsi, chez le rat, l'instillation intra-trachéale de particules ultrafines de dioxyde de titane de 20 nm de diamètre induit une réponse inflammatoire pulmonaire plus importante que l'administration de la même masse de particules de 250 nm de diamètre. Enfin, d'un point de vue physico-chimique, les nanoparticules manufacturées s'apparentent aux particules ultrafines qui composent la pollution atmosphérique urbaine et dont la toxicité respiratoire a été largement étudiée au cours des dernières décennies. Ces recherches ont montré que les particules ultrafines sont susceptibles d'augmenter l'inflammation allergique, en raison de leur activité pro-inflammatoire, mais également de faciliter le développement d'allergies respiratoires, en raison de leur activité adjuvante sur la réponse immunitaire. La pollution particulaire environnementale a ainsi été mise en cause dans l'augmentation de la prévalence de l'asthme observée au cours des dernières décennies dans les pays industrialisés. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique de voies aériennes qui résulte d'une réponse immunitaire adaptative exagérée de l'organisme contre des allergènes communs, et qui est désormais considérée comme un problème majeur de santé publique.

Question posée

Dans ce contexte, connaître l'impact potentiel des NTC sur la santé respiratoire des populations saines, mais également des populations sensibles comme les populations d'atopiques et/ou d'asthmatiques, est nécessaire. Par ailleurs, la toxicité respiratoire des particules dépendant fortement de leur biodisponibilité, évaluer le lien entre l'activité des NTC et leur biodistribution dans les voies aériennes est essentiel. Ainsi, l'objectif du projet de thèse a été d'étudier la toxicité respiratoire des NTC en lien avec leur biodistribution, chez la souris normale, mais également dans un modèle murin d'asthme.

Approches expérimentales

Le projet de thèse, réalisé sur des NTC bruts multi-parois d'origine industrielle, a été organisé en quatre étapes :

1. La première étape du travail a consisté à mettre au point un protocole de dispersion des NTC. En effet, afin d'étudier leur toxicité dans des systèmes biologiques, les NTC doivent être dispersés dans un milieu biocompatible. Les NTC bruts ayant tendance à s'agréger en milieu aqueux, le recours à des agents dispersants et à une étape de sonication est généralement nécessaire. Ainsi, l'objectif de ce premier volet de la thèse a été d'identifier un agent dispersant efficace et compatible avec la voie respiratoire, parmi un ensemble d'agents décrits dans la littérature et de nouveaux dispersants potentiels.

2. La deuxième étape de la thèse a été d'étudier la distribution spatiale des NTC dans le poumon des souris après leur administration par voie respiratoire. Deux approches expérimentales ont été ici mises en œuvre, l'une basée sur l'utilisation de NTC marqués par des fluorophores, l'autre basée sur l'utilisation de NTC bruts (non marqués).

• Dans la première approche, notre travail a consisté à étudier, par microscopie confocale de fluorescence, une série de conjugués NTC-fluorophore, afin d'identifier, parmi ces composés, les objets susceptibles de présenter un profil photophysique et une intensité de signal de fluorescence adaptés à une étude de biodistribution chez l'animal (collaboration plateforme d'imagerie de l'IGBMC; Dir. : J-L Vonesch). Les conjugués NTC-fluorophore évalués au cours de ce travail ont été élaborés par l'équipe de Chimie Organique de l'UMR 7199 (Dir. : Luc Lebeau, UMR 7199) selon plusieurs stratégies de marquage permettant de moduler la nature du fluorophore (hydrophobe = dérivés du terrylène ou hydrophile = cyanine 5), le mode d'ancrage du fluorophore à la surface du NTC (covalent ou

non covalent), la longueur ou l'hydrophilie du bras d'ancrage du fluorophore, la densité de marquage ou encore la modification de l'état de surface du NTC.

• Dans la deuxième approche, la microscopie optique en lumière blanche et la microscopie électronique à transmission ont été utilisées pour rechercher et analyser la présence de NTC non marqués sur des coupes de poumons de souris à l'échelle tissulaire, cellulaire et subcellulaire. Une technique d'imagerie plus originale, basée sur la photoluminescence induite par l'excitation infrarouge des NTC, a également été explorée, afin de tenter de cartographier la distribution des NTC à l'échelle de coupes entières de poumon.

3. La troisième étape du projet de thèse a été de décrire les effets respiratoires de doses croissantes de NTC chez la souris normale après exposition unique et/ou répétée, afin d'établir notamment une relation dose-effet. Dans ce travail, nous avons évalué la capacité des NTC à induire une inflammation et un remodelage (réponse fibrotique et production de mucus) des voies aériennes.

4. La dernière partie des travaux de thèse a porté sur l'étude de l'impact des NTC sur la réponse allergique dans un modèle murin d'asthme aux acariens. Ce modèle, mis au point au cours de ce travail, se caractérise par une inflammation et un remodelage des voies aériennes, ainsi que par la production d'immunoglobulines IgG1 spécifiques des allergènes d'acariens. L'évaluation de l'effet des NTC dans ce modèle s'est déroulée suivant plusieurs protocoles, qui ont pris en compte un certain nombre de facteurs susceptibles d'influencer l'effet des NTC sur la réponse à l'allergène : la dose de NTC, le moment de l'exposition et le moment de l'évaluation des réponses. Dans tous ces protocoles, nous avons évalué la réponse immunitaire systémique, ainsi que l'inflammation et le remodelage des voies respiratoires. Des études mécanistiques portant sur l'implication des cellules épithéliales dans les effets induits par les NTC ont également été menées.

Résultats obtenus

1. Mise au point d'une méthode de dispersion des NTC

Dans cette première partie de notre étude, nous avons évalué la capacité à disperser les NTC de deux milieux de dispersion élaborés au cours de ce travail (un mélange phospholipide - détergent et un surfactant pulmonaire synthétique de composition définie) en comparaison à d'autres milieux de dispersion rapportés précédemment dans la littérature (détergent, phospholipide, protéine). Cette évaluation s'est basée sur un ensemble de techniques de caractérisation des dispersions : observation visuelle, observation par

microscopie optique en lumière blanche, mesure de la taille des particules en suspension et observation des dispersions en microscopie électronique à transmission. Ces travaux nous ont conduits à retenir comme agent dispersant le surfactant synthétique développé par nos soins, ce dernier ayant permis l'obtention de dispersions efficaces et stables de NTC (**résultats publiés**). Ce surfactant a été utilisé comme véhicule des NTC dans les études de biodistribution et de toxicité respiratoires menées chez la souris normale et dans un modèle murin d'asthme.

2. Étude de la biodistribution des NTC dans les voies respiratoires

Dans cette deuxième partie de notre travail, l'étude par microscopie de fluorescence d'une série de conjugués NTC-fluorophore (sous la forme de poudres sèches, de dispersions dans du surfactant ou encore après incubation *in vitro* sur des cellules HeLa en culture) n'a pas permis d'identifier un composé adapté à une étude de biodistribution chez l'animal, ceci quels que soient le fluorophore associé aux NTC, son mode d'ancrage aux NTC ou la densité de marquage. Ces travaux ont en effet révélé un problème d'extinction de fluorescence par transfert d'énergie du fluorophore aux NTC. Ce phénomène s'est avéré être un verrou technique à la réalisation de l'étude de la distribution des NTC chez la souris à l'aide d'objets marqués. En revanche, l'étude par microscopie optique en lumière blanche et par microscopie électronique à transmission de coupes de poumon d'animaux exposés à des objets non marqués a montré chez des souris normales, que les NTC se distribuent jusque dans les alvéoles pulmonaires et qu'ils sont internalisés dans les macrophages, les neutrophiles et les pneumocytes de type 2 (**résultats publiés**). Le même travail réalisé chez des souris exposées à l'allergène et aux NTC a révélé une distribution *a priori* identique des NTC en conditions inflammatoires. Par ailleurs, dans cette partie de notre travail, des observations exploratoires d'échantillons tissulaires en microscopie confocale infrarouge nous ont permis d'obtenir une cartographie de la distribution des NTC à l'échelle d'une coupe entière de poumon.

3. Impact des NTC chez la souris normale

L'étude des effets respiratoires de doses croissantes de NTC, chez la souris normale après exposition unique et/ou répétée, ont montré que ces particules sont capables d'induire une réponse pro-inflammatoire, et que cette réponse se caractérise par un infiltrat cellulaire inflammatoire (afflux de neutrophiles) et une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, KC, IL-17) dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires. La formation de granulomes, l'apparition d'une réponse fibrotique (caractérisée par une augmentation de la production de collagène et de TGF-β1), ainsi qu'une hyperproduction de mucus, ont également été observées. Ces effets, mis en évidence dans le poumon de souris

exposées à des doses de NTC de 1,5 ; 6,25 ou 25 µg, se sont avérés dépendants de la dose de NTC administrée, mais également du nombre d'administrations (**résultats publiés**). Ces données de toxicité respiratoire nous ont conduits à choisir la dose de NTC de 25 µg, pour nos travaux ultérieurs chez la souris exposée à l'allergène.

4. Impact des NTC dans un modèle murin d'asthme

L'évaluation de l'impact des NTC dans un modèle expérimental d'asthme induit par les allergènes d'acariens a montré que les NTC peuvent exercer un effet adjuvant sur la réponse immunitaire systémique (augmentation des IgG1 totales et spécifiques de l'allergène dans le sérum). Les NTC sont également capables d'exacerber la réponse inflammatoire des voies aériennes induite par l'allergène, ceci s'exprimant par un afflux cellulaire augmenté dans les liquides de lavage bronchoalvéolaires (macrophages, éosinophiles et neutrophiles) et une production accrue de cytokines marqueurs de l'allergie dans les tissus pulmonaires (IL-13, éotaxine, TARC). Les NTC peuvent également aggraver le phénomène de remodelage des voies aériennes. Ainsi, ils sont capables d'induire une augmentation de la réponse fibrotique (augmentation de la concentration en collagène, de TGF-β1, de la MMP-9 et de TIMP-1 dans le poumon), et de l'hyperproduction de mucus induites par l'allergène. Ces effets sont dépendants de la dose de NTC administrée, du moment de l'exposition, ainsi que du moment de l'évaluation des réponses. En outre, ces effets sont associés à une augmentation de la production des cytokines de la réponse immunitaire innée (TSLP, IL-25 et IL-33), suggérant un rôle de l'épithélium dans l'effet aggravant des NTC dans l'asthme. **Ces résultats feront l'objet d'une deuxième publication, en préparation.**

Conclusion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse nous ont permis de mettre au point une méthode de dispersion des NTC adaptée à l'administration par voie respiratoire de ces particules. Cette méthode au point, une étude de la distribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris a été menée. Nous avons alors montré que les NTC se distribuent jusque dans les alvéoles pulmonaires et qu'ils sont internalisés par différentes cellules résidantes du poumon (macrophages, pneumocytes de type II) ou infiltrées (neutrophiles). L'évaluation de la toxicité respiratoire des NTC chez la souris normale a également montré que ces nanomatériaux sont capables d'induire une réponse inflammatoire et un remodelage des voies aériennes. Ces effets ont été mis en évidence pour des doses de nanomatériaux représentatives de l'exposition humaine en milieu professionnel, ce qui suggère que les NTC pourraient représenter un danger pour les personnels travaillant à leur production ou à leur

sous-traitance. Enfin, dans un modèle murin d'asthme aux allergènes d'acariens mis au point au cours de ce travail, nous avons mis en évidence que les NTC sont capables d'augmenter la réponse immunitaire systémique, ainsi que l'inflammation et le remodelage des voies aériennes induits par un allergène. Nos données ont par ailleurs suggéré une implication des cellules épithéliales dans cet effet. Ainsi, l'exposition aux NTC pourrait représenter un risque pour les sujets sains, mais également pour les sujets asthmatiques.

Les résultats issus de ces travaux de thèse ont fait l'objet, à ce jour, d'une publication parue dans le journal *Archives of Toxicology* (voir Annexes) et de plusieurs communications à des congrès. Une deuxième publication est en préparation.

Publications et communications

Publications

Ronzani C, Spiegelhalter C, Vonesch JL, Lebeau L, Pons F. Lung deposition and toxicological responses evoked by multi-walled carbon nanotubes dispersed in a synthetic lung surfactant in the mouse. *Arch Toxicol.* 2012 Jan;86(1):137-49.

Ronzani C, Casset A, Pons F. Multi-walled carbon nanotubes aggravate airway inflammation and remodeling in house dust mite murine asthma model. *En préparation.*

Communications

Ronzani C, Casset A, Pons F. Effect of multi-walled carbon nanotubes on lung inflammation and systemic immune response in murine asthma models. Congrès Européen de Toxicologie (Eurotox), Paris, France, 2011. Communication affichée.

Ronzani C. Biodistribution et activité des nanotubes de carbone bruts dans les voies aériennes chez la souris. Journée scientifique de l'UMR 7199, Illkirch, France, 2010. Communication orale.

Ronzani C, Spiegelhalter C, Schwab Y, Vonesch JL, Lebeau L, Pons F. Biodistribution and pro-inflammatory activity of carbon nanotubes in the mouse airways. Congrès de la Société Française de Toxicologie (SFT), Paris, France, 2010. Communication affichée.

Ronzani C, Spiegelhalter C, Schwab Y, Vonesch JL, Lebeau L, Pons F. Biodistribution and pro-inflammatory activity of carbon nanotubes in the mouse airways. Journées du campus d'Illkirch, France, 2010. Communication affichée.

Ronzani C, Lebeau L, Vonesch JL, Pons F. Nanotubes de carbone et inflammation des voies aériennes chez la souris. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), Strasbourg, France, 2009. Communication affichée.

Avant-propos

Les nanotechnologies qui font appel à l'utilisation de nanoparticules (NP) manufacturées connaissent actuellement un essor considérable. Selon une estimation de la communauté européenne, le marché mondial des nanotechnologies, estimé à 40 milliards d'euros en 2001, devrait atteindre 1 000 milliards d'euros par an d'ici 2015 et concerner l'emploi de près de 2 millions de personnes. L'inventaire mis en place par le Woodrow Wilson Institute (États-Unis) répertorie ainsi plus de 1300 nano-produits déjà commercialisés au niveau mondial. Ces produits sont répartis selon la nature chimique des NP qu'ils contiennent : l'argent est le plus répertorié (54,4%), suivi du carbone (15,8%), du titane (10,2%), de la silice (7,4%), du zinc (5,3%) et de l'or (4,8%). Mais il faut noter que seules ces six familles chimiques sont répertoriées dans la base de données du Woodrow Wilson Institute, ce qui ne représente que 575 nano-produits sur un total de 1317, soulignant la grande diversité de la nature chimique des NP déjà sur le marché. Les domaines d'application industrielle des NP manufacturées sont également très variés. La catégorie « santé et beauté », qui englobe les cosmétiques, les crèmes solaires, l'habillement ou encore les articles de sport, est la plus conséquente avec plus de la moitié des nano-produits commercialisés. Suivent les domaines concernant la maison et le jardin, l'automobile, l'alimentation et les boissons, l'électronique et l'informatique, l'électroménager et les produits pour les enfants.

Le développement extrêmement rapide des nanotechnologies suscite cependant des inquiétudes dans l'opinion publique et chez les professionnels de santé. On sait en effet que l'inhalation répétée de particules de taille micrométrique (silice, amiante) est toxique pour le poumon, et que cette toxicité est souvent liée à la capacité de ces particules à s'accumuler dans le tractus respiratoire. On suspecte par ailleurs que les particules de taille nanométrique ont une activité biologique plus importante, à masse comparable, que les particules plus grosses. Ainsi, chez le rat, l'instillation intra-trachéale de particules ultrafines de dioxyde de titane de 20 nm de diamètre induit une réponse inflammatoire pulmonaire plus importante que l'administration de la même masse de particules de 250 nm de diamètre. Enfin, d'un point de vue physico-chimique, les NP manufacturées s'apparentent aux particules ultrafines qui composent la pollution atmosphérique urbaine et dont la toxicité respiratoire a été largement étudiée au cours des dernières décennies. Ces recherches ont en effet montré que les particules ultrafines sont susceptibles d'augmenter l'inflammation allergique, en raison de leur activité pro-inflammatoire, mais également de faciliter le développement d'allergies respiratoires, en raison de leur activité adjuvante sur la réponse immunitaire. Dans les pays industrialisés, la pollution particulaire environnementale a ainsi

été mise en cause dans l'augmentation de la prévalence de l’asthme, qui représente désormais un problème majeur de santé publique.

Les nanotubes de carbone (NTC), dont la production et les applications industrielles sont actuellement en plein essor, sont les NP manufacturées pour lesquelles les risques d’exposition sont les plus grands. En effet, la production mondiale de NTC atteint aujourd’hui plusieurs centaines de tonnes par an, et ces nano-objets pourraient bientôt être utilisés, en masse, dans des secteurs divers tels que l’aéronautique, l’automobile ou encore les articles de sport. Ainsi, étudier et comprendre l'impact potentiel de ces NP manufacturées sur la santé respiratoire des populations saines, mais également des populations sensibles comme les populations d’atopiques et/ou d’asthmatiques, est désormais une priorité.

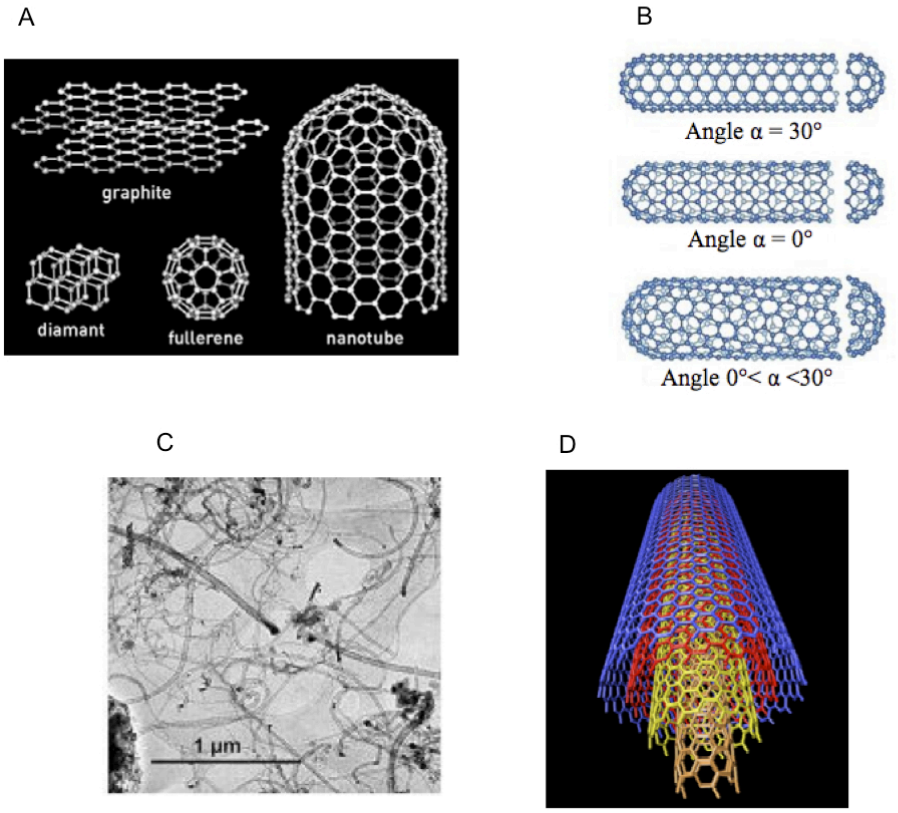


Figure 1. Nanotubes de carbone bruts. A : Différentes variétés allotropiques du carbone (d'après INRS, 2008). **B** : Différents modes d'enroulement des feuillets de graphène constituant les nanotubes de carbone (d'après INRS, 2008). **C** : Image par microscopie électronique de nanotubes de carbone à paroi simple (SWCNT) (www.nanotech-now.com). **D** : Nanotubes de carbone à parois multiples (MWCNT).

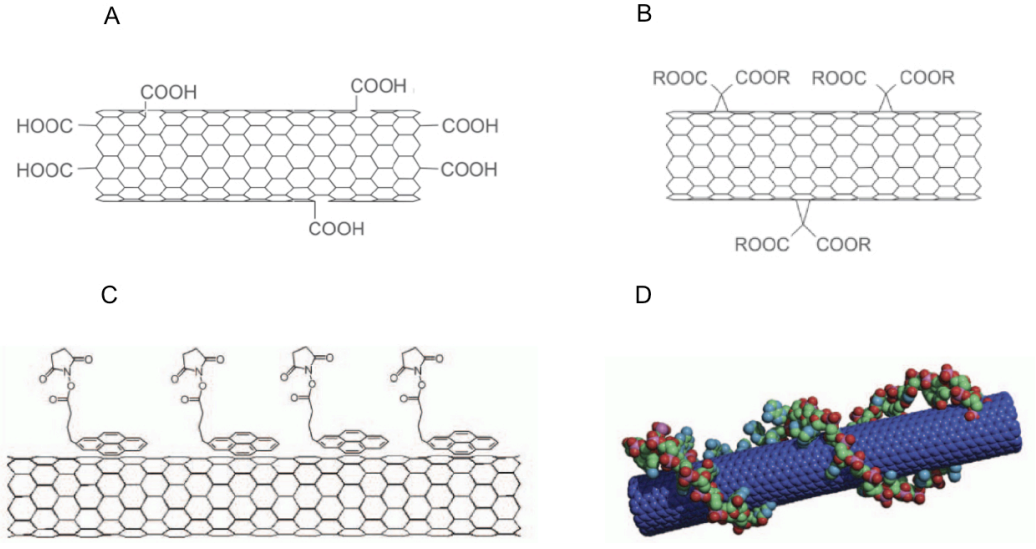


Figure 2. Nanotubes de carbone fonctionnalisés. A : Fonctionnalisation covalente par traitement par des oxydants forts. **B** : Fonctionnalisation covalente par réaction de Bingel. **C** : Fonctionnalisation non covalente avec des dérivés pyrèniques. **D** : Fonctionnalisation non covalente avec des acides nucléiques (d'après Liu *et al.*, 2009).

Chapitre 1 – Introduction

Partie A – Nanotubes de carbone

A.I. Structure

Les NTC constituent l'un des quatre états organisés connus du carbone avec le graphite, le diamant et les fullerènes (**Figure 1 A**). Ce sont des cylindres creux constitués d'un ou plusieurs feuillets de graphène (atomes de carbone organisés selon un réseau hexagonal) enroulés sur eux-mêmes selon un angle variant entre 0 et 30° (**Figure 1 B**). On distingue deux types de NTC : les NTC à simple paroi (**SWCNT** pour Single Wall Carbon Nanotube) qui ont un diamètre de 0,8 à 2 nm et une longueur de l'ordre du micromètre (**Figure 1 C**), et les NTC à parois multiples (**MWCNT** pour Multi Wall Carbon Nanotube) qui ont un diamètre de 10 à 80 nm et une longueur pouvant atteindre plusieurs dizaines de micromètres (**Figure 1 D**). Dans les MWCNT, les feuillets de graphène s'emboîtent les uns dans les autres avec une distance entre eux proche de la distance entre deux plans graphitiques (0,34 nm).

Les NTC sont classés parmi les NP, car ils ont au moins une dimension inférieure à 100 nm. Leur diamètre nanométrique pour une longueur micrométrique laisse penser qu'ils pourraient également avoir les propriétés biologiques des fibres, et notamment des fibres d'amiante.

En fonction de leur application, les NTC peuvent être utilisés à l'état brut ou sous une forme fonctionnalisée (on parle alors de **NTC fonctionnalisés**). La fonctionnalisation consiste à modifier chimiquement des NTC bruts, afin de leur conférer de nouvelles propriétés, dont notamment une solubilité, une biocompatibilité ou encore des propriétés en imagerie (par la conjugaison de fluorophores). On distingue la **fonctionnalisation covalente**, basée sur la formation de liaisons chimiques avec la surface des NTC, et la **fonctionnalisation non covalente**, basée sur l'adsorption à la surface des NTC de molécules présentant des motifs hydrophobes. Différentes méthodes ont été développées pour fonctionnaliser les NTC de façon covalente. La plus utilisée est le traitement par des oxydants forts (en particulier l'acide nitrique) qui permet d'introduire des groupements carboxyles au niveau des extrémités des NTC et de défauts de surface induits par le traitement lui-même (**Figure 2 A**). Ces groupements peuvent par la suite servir au couplage de diverses molécules, dont des fluorophores. Les réactions de cycloaddition intervenant sur la structure aromatique des NTC permettent également la fonctionnalisation covalente, comme la réaction photo-induite des NTC avec les azotures ou la réaction de Bingel (**Figure 2 B**). La fonctionnalisation non

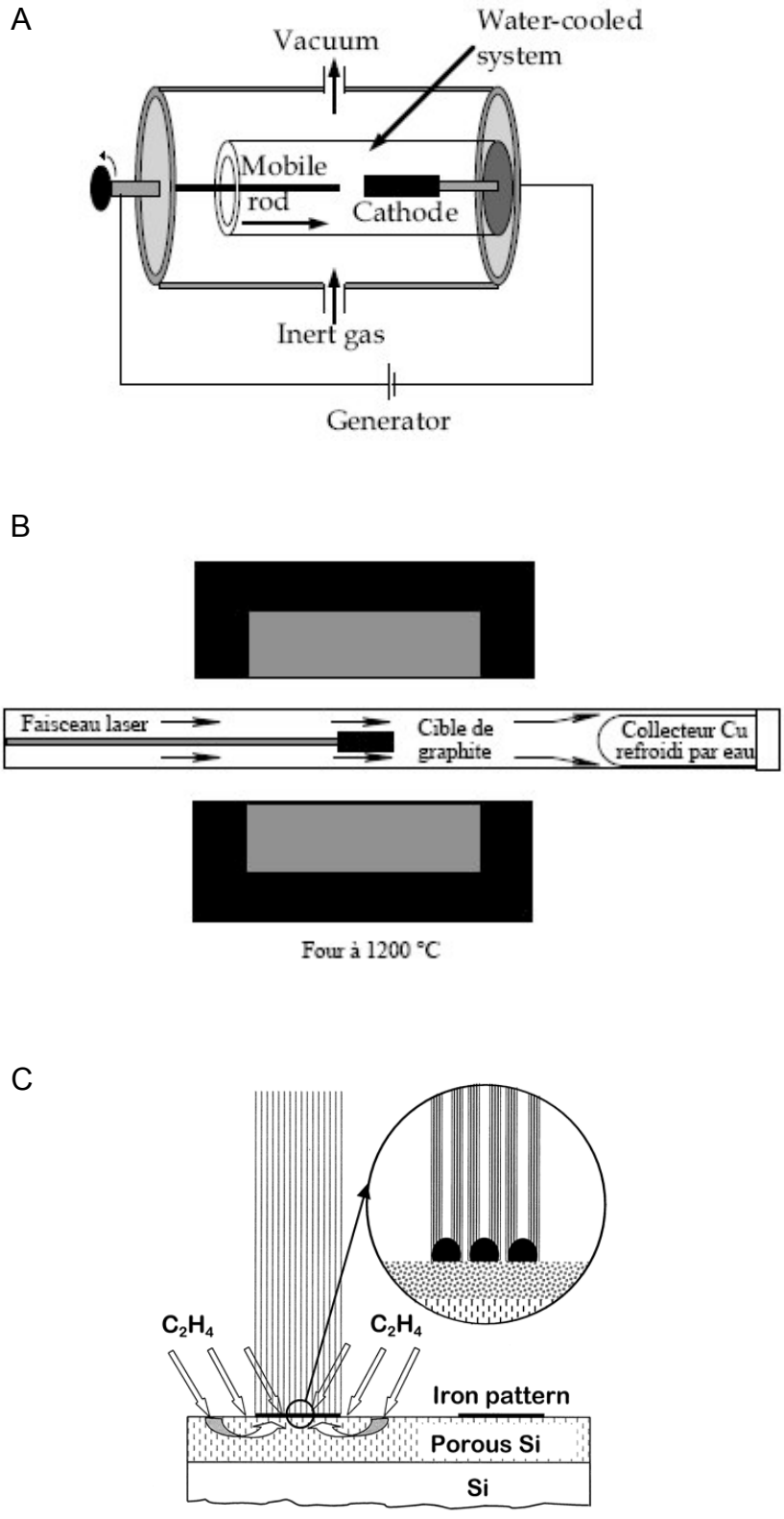


Figure 3. Modes de production des NTC. A : Méthode de synthèse par arc électrique (d'après Journet et Bernier, 1998). **B** : Méthode de synthèse par ablation laser (d'après Journet et Bernier, 1998). **C** : Méthode de synthèse par décomposition catalytique (d'après Fan *et al.,* 1999).

covalente peut résulter quant à elle de la liaison de molécules polyaromatiques (comme les dérivés pyrèniques (**Figure 2 C**) ou les acides nucléiques (**Figure 2 D**) aux NTC par π-stacking, ou d'autres types d'interactions (comme les forces de Van der Waals ou les forces hydrophobes) entre les domaines hydrophobes de molécules amphiphiles et la surface des NTC (Liu *et al.*, 2009).

A.II. Modes de production

Il existe trois modes principaux de production des NTC, conduisant à la production préférentielle de SWCNT ou de MWCNT avec un degré de pureté plus ou moins élevé.

Premièrement, **la méthode par arc électrique**, historiquement utilisée par Iijima, consiste en une décharge électrique entre deux électrodes de graphite, ce qui entraîne la vaporisation des atomes de carbone présents au niveau de l'anode afin de permettre la croissance des NTC au niveau de la cathode (**Figure 3 A**). En présence de métaux de transition comme le nickel, le fer ou le cobalt, on observe la production de SWCNT (Iijima, 1991). Les MWCNT peuvent également être produits par cette méthode en utilisant soit du graphite pur, soit du graphite associé à un mélange de métaux (Fe/Ni, Co/Ni, Co/Fe) (Journet et Bernier, 1998). Le rendement de synthèse des SWCNT et des MWCNT varie considérablement selon les conditions expérimentales (de 20 à 90%).

Deuxièmement, dans **la méthode par ablation laser**, la sublimation du carbone est provoquée par un laser focalisé à la surface d'une cible contenant du carbone, du nickel et du cobalt sous un flux de gaz inerte. La cible est placée au centre d'un four permettant de contrôler la température autour de 1200°C. Les vapeurs de carbone ainsi créées sont transportées jusqu'à un collecteur de cuivre refroidi par de l'eau où elles se condensent (**Figure 3 B**). Ce mode de production est surtout utilisé pour générer des SWCNT pour lesquels le rendement de synthèse est de l'ordre de 70%.

Enfin, **la décomposition catalytique** (CCVD pour Catalytic Chemical Vapor Deposition) permet la formation de NTC à partir d'un gaz carboné décomposé à la surface de particules de catalyseur métallique dans un four. Le gaz carboné peut être le monoxyde de carbone ou un hydrocarbure tel l'acétylène ou le méthane. Le catalyseur métallique est un métal de transition tel le fer ou le cobalt (**Figure 3 C**). Selon les conditions opératoires (pression et débit de gaz, taille des particules de catalyseur…), la synthèse conduit à des SWCNT ou des MWCNT. Les NTC obtenus par cette méthode présentent des caractéristiques géométriques (longueur, diamètre) beaucoup plus uniformes que ceux obtenus par arc électrique ou

ablation laser. Par ailleurs, ce procédé peut être utilisé pour produire des NTC à grande échelle.

Selon le mode de production utilisé, les NTC formés contiennent différents types d'impuretés : des impuretés carbonées comme le fullerène ou le carbone amorphe et des résidus catalytiques, notamment des métaux (fer, cobalt, nickel…). La teneur en impuretés dans le produit final dépend aussi des procédés de purification mis en œuvre (traitement acide, microfiltration…). Des trois méthodes de production citées, la méthode CCVD est la plus utilisée, car c'est celle qui permet d'obtenir les plus gros volumes de production, mais également les NTC contenant le moins de résidus catalytiques.

A.III. Propriétés technologiques

Les propriétés des NTC résultent de leur forme tubulaire, de leur diamètre nanométrique et de leur filiation structurale avec le graphite.

Les NTC présentent des propriétés électriques particulières. En fonction de leur angle d'enroulement et de leur diamètre, ils sont isolants, semi-conducteurs ou supra-conducteurs. Ils peuvent transporter des densités de courant remarquables, voisines du milliard d'ampères par mètre carré (Pautrat, 2003; Ratner, 2003). Les NTC mono-paroi possèdent de meilleures caractéristiques électriques que les NTC multi-parois en raison des interactions électriques, de type Van der Waals, qui surviennent entre les différentes parois. Les NTC possèdent également des propriétés mécaniques remarquables. En effet, la résistance mécanique des NTC est plus de 100 fois supérieure à celle de l'acier, même si leur poids est 6 fois inférieur (Aitken, 2004). Ils allient à cette résistance à la déformation une très grande flexibilité qui leur permet de se courber jusqu'à des angles très importants. De plus, certains NTC présentent une dureté supérieure à celle du diamant. Les NTC présentent aussi une excellente inertie chimique et une très bonne stabilité à haute température. Leur surface spécifique est très élevée, ce qui leur confère une très bonne capacité d'adsorption. Celle-ci rend possible la fixation de molécules chimiques à leur surface, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques par exemple. Par ailleurs, les NTC sont aussi d'excellents conducteurs thermiques (Hameed Hyder, 2003). Enfin, les NTC bruts sont hydrophobes et non solubles en milieu aqueux. Cependant, leur fonctionnalisation peut permettre de les rendre solubles et compatibles avec les milieux biologiques.

A.IV. Applications

A.IV.1. Applications industrielles

En raison de ces propriétés, les NTC sont déjà utilisés comme objets bruts dans de nombreux secteurs industriels (Endo *et al.,* 2008). Ainsi, ils sont déjà employés dans le domaine des équipements sportifs (vélos, raquettes de tennis), de l'aéronautique (ailes d'avion) et de l'automobile (pneumatiques et carrosserie) (**Tableaux 1 et 2**). À l'avenir, ils pourraient entrer dans la composition de textiles techniques (vêtements plus résistants), permettre d'élaborer de nouveaux composants électroniques (diodes, écrans plats) ou être utilisés dans le domaine de la filtration (membrane filtrante) ainsi que pour le stockage d'énergie. Les MWCNT représentent actuellement la majorité de ces applications industrielles avec plus de 95% de la production industrielle totale de NTC.

Tableau 1 : Exemple de produits de consommation contenant des NTC dans le monde (d'après www.nanotechproject.org).

Domaine d'application	Type de produit	Fabricant	Pays d'origine
Sport	Raquette de tennis	Babolat®	France
Sport	Appareil de fitness	Easton®	États-Unis
Sport	Fourche de vélo	Easton®	États-Unis
Sport	Selle de vélo	Easton®	États-Unis
Sport	Guidon de vélo	Easton®	États-Unis
Sport	Vélo	BMC cycling	États-Unis
Sport	Raquette de ping-pong	STIGA	Suède
Sport	Club de golf	Yonex®	Japon
Sport	Club de golf	Grafalloy®, Inc	États-Unis
Textile	Semelle	Adidas	Allemagne
Matériaux	Structure conductrice d'électricité	Eikos®	États-Unis
Informatique	Stockage de mémoire	Nantero®, Inc	États-Unis
Aéronautique	Fuselage	Avalon Av*ia*tion	-

Tableau 2 : Principaux secteurs de production et d'utilisation potentielle des NTC en France (adapté d'après INRS, 2007).

Application	Production	Utilisation
Fabrication de produits chimiques	×	
Fabrication de matières plastiques		×
Fabrication de peintures et de vernis		×
Fabrication de pneumatiques		×
Fabrication d'articles en caoutchouc		×
Fabrication d'accumulateurs et de piles électriques		×
Recherche - Développement en sciences physiques et naturelles	×	×

A.IV.2. Applications en médecine

En raison notamment de leur petite taille, les NTC pourraient trouver des applications dans le domaine médical et pharmaceutique. Celles-ci concernent les **NTC fonctionnalisés,** qui peuvent être modifiés pour être tout simplement biocompatibles ou biomimétiques, pour devenir fluorescent et être utilisés en imagerie, ou encore pour véhiculer un principe actif et cibler spécifiquement des cellules.

A.IV.2.1. Ingénierie biomédicale

Plusieurs équipes ont développé des biomatériaux contenant des NTC fonctionnalisés, en vue de leur utilisation en ingénierie tissulaire (Venkatesan et Kim, 2010). Les NTC pourraient par exemple entrer dans la composition de nouveaux matériaux bio-mimétiques, qui seraient utilisés dans la fabrication de prothèses orthopédiques. En effet, il y aurait une meilleure adhérence des ostéoblastes sur les NTC, ce qui optimiserait l'intégration osseuse. Les NTC permettraient également d'augmenter la résistance mécanique de ces nouveaux biomatériaux. Les NTC pourraient aussi être utilisés comme support de croissance osseuse dans le traitement des fractures. Les NTC seraient par exemple fonctionnalisés avec des charges négatives qui attireraient les ions calcium, facilitant ainsi la guérison des fractures (Fiorito, 2008). De même, l'utilisation de biomatériaux composés de NTC inhibant la différenciation et la fonction des ostéoclastes permettrait une meilleure régénération de l'os (Narita *et al.,* 2009).

A.IV.2.2. Dépistage et diagnostic thérapeutiques

Les NTC fonctionnalisés pourraient également être utilisés comme biosenseurs, permettant de détecter des changements biochimiques (Lei et Ju, 2010). Par exemple, des NTC fonctionnalisés avec des protéines spécifiques de maladies auto-immunes permettraient la reconnaissance d'anticorps exprimés lors de ces maladies et ainsi leur diagnostic (Chen *et al.,* 2003). De même, des NTC fonctionnalisés avec un anticorps spécifique d'une hémagglutinine virale permettraient la détection du virus de la grippe (Takeda *et al.,* 2007). Par ailleurs, l'utilisation de capillaires contenant des NTC fonctionnalisés, modulant l'émission de senseurs dans le proche infrarouge (IR) en réponse à l'adsorption de molécules biologiques spécifiques, permettrait de mesurer la concentration en glucose dans le sang (Barone *et al.,* 2005).

A.IV.2.3. Imagerie médicale

Grâce à leurs propriétés physico-chimiques particulières, les NTC pourraient aussi être utilisés comme agents de contraste en imagerie médicale. Ainsi, l'administration de SWCNT, fonctionnalisés avec un peptide spécifique d'une tumeur, a permis la détection et l'imagerie en photoacoustique de cette tumeur dans un modèle *in vivo* chez la souris (De La Zerda *et al.,* 2008). De plus, le marquage de NTC fonctionnalisés par des radionucléides ou des fluorophores pourrait également permettre d'étudier la biodistribution de ces nano-objets dans l'organisme ou au niveau cellulaire (voir Partie B.II.3.1. de l'Introduction).

A.IV.2.4. Vectorisation de principes actifs

L'industrie pharmaceutique utilise déjà des objets de taille nanométrique, comme les liposomes, pour vectoriser des principes actifs. Les NTC fonctionnalisés pourraient également servir de vecteur de médicament (Bianco *et al.,* 2005). Les NTC possèdent en effet une grande aire de surface, permettant d'attacher à la surface ou d'inclure à l'intérieur de la cavité des NTC de nombreux agents fonctionnels et thérapeutiques.

Ainsi, il a été suggéré que les NTC fonctionnalisés pourraient rendre possible l'administration par voie orale d'un principe actif comme l'amphotéricine B par exemple (Wu *et al.,* 2005). Les NTC fonctionnalisés pourraient également assurer le transport de peptides en vaccination. Par exemple, Pantarotto *et al.* ont montré que l'administration de NTC fonctionnalisés avec un peptide du virus de la fièvre aphteuse induit la production d'anticorps spécifiques chez la souris (Pantarotto *et al.,* 2003). Les NTC fonctionnalisés rendraient aussi possible une délivrance de principes actifs au niveau du cerveau, en permettant un passage de ces molécules à travers la barrière hémato-encéphalique et en les protégeant d'une dégradation enzymatique. Il a par exemple été montré *in vitro* que des MWCNT fonctionnalisés avec des acides nucléiques étaient internalisés dans les cellules microgliales du cerveau (Kateb *et al.,* 2007).

A.IV.2.5. Thérapie anti-cancéreuse

Les NTC pourraient constituer une nouvelle approche dans le traitement du cancer. Tout d'abord, des NTC fonctionnalisés par une molécule spécifique de la tumeur à traiter et par un principe actif à activité anti-tumorale permettraient une délivrance ciblée d'anti-cancéreux dans les cellules tumorales. Cette approche a été développée en utilisant différents anti-cancéreux comme le paclitaxel (Liu *et al.,* 2008b) ou la doxorubicine (Zhang *et al.,* 2009) par exemple.

Une autre stratégie, basée sur le principe de la thérapie génique, serait d'inactiver les cellules tumorales en utilisant des ARN interférents. Les NTC pourraient en effet faciliter le passage des ARN interférents à travers les membranes cellulaires. Il a par exemple été rapporté dans un modèle de xénogreffe de carcinome pulmonaire chez la souris, que des complexes formés de MWCNT conjugués avec un ARN interférent présentaient une activité anti-tumorale (Podesta *et al.,* 2009). Ces complexes induisaient de plus une suppression prolongée de la tumeur en comparaison à d'autres vecteurs nanoparticulaires comme les liposomes cationiques.

Un autre principe d'utilisation des NTC dans le traitement du cancer serait le suivant. Les NTC seraient fonctionnalisés par une molécule spécifique de la tumeur permettant le ciblage des cellules tumorales. Puis, grâce à la capacité des NTC à absorber la lumière dans le proche IR, les cellules cancéreuses seraient détruites par radiation dans le proche IR sans endommagement des cellules saines. Cette approche a été démontrée *in vitro* par Kam *et al.* qui ont utilisé des NTC fonctionnalisés avec de l'acide folique permettant l'internalisation sélective des NTC dans les cellules cancéreuses exprimant des récepteurs aux folates (Kam *et al.,* 2005).

Enfin, une autre stratégie consisterait à utiliser les NTC comme vecteur de radionucléides. Cette stratégie a été étudiée par McDevitt *et al.* dans un modèle de xénogreffe de lymphome chez la souris (McDevitt *et al.,* 2007b). Les NTC ont été fonctionnalisés avec un anticorps monoclonal anti-CD 20 (Rituximab) et un radionucléide. Les auteurs de l'étude ont montré que ces NTC fonctionnalisés étaient localisés spécifiquement dans les cellules tumorales.

Partie B – Biodistribution des NTC dans les voies respiratoires

B.I. La voie respiratoire, une voie d'exposition aux NTC

Les données d'exposition aux NTC par voie respiratoire sont encore peu nombreuses. Les études portant sur ce sujet ont surtout été menées en milieu professionnel (Aschberger *et al.,* 2010; NIOSH, 2010). En effet, à l'heure actuelle, l'exposition aux NTC bruts se rencontre essentiellement dans ce secteur.

B.I.1. Données d'exposition aux NTC en milieu professionnel

Dans l'industrie, toutes les étapes allant de la production au stockage des NTC peuvent conduire à une exposition des personnes employées à la fabrication de ces NP, les phases les plus à risques étant celles de la manipulation directe des NTC sous forme de poudre lors de la collecte, de la pesée, du mélange et du transfert des NTC dans des conteneurs ou dans des sachets. De même, la fabrication de produits finis contenant des NTC ou leur utilisation dans certaines conditions particulières (nettoyage, perçage…) peuvent constituer une source d'exposition dans les industries sous-traitantes.

En milieu professionnel, les trois voies d'exposition possibles aux NTC sont : la voie respiratoire, la voie cutanée et, accessoirement, la voie orale. Toutefois, on estime que la principale voie d'exposition est la voie respiratoire par inhalation d'aérosols de NTC dispersés dans l'air. Récemment, plusieurs études ont ainsi cherché à évaluer l'exposition aux NTC par voie respiratoire de personnels travaillant à la production ou à l'utilisation de NTC, dans des industries ou dans des laboratoires de recherche (**Tableau 3**). Maynard *et al.* ont par exemple effectué des mesures dans des industries lors de manipulations de poudres de SWCNT bruts et ont montré une génération d'aérosols de particules respirables, même si les concentrations mesurées restaient faibles, de 0,7 à 53 $\mu g.m^{-3}$ (Maynard *et al.,* 2004). De même, il a été montré dans des industries que la manipulation de nanofibres de carbone en vue de leur intégration dans des matériaux composites provoquait une augmentation de la concentration en particules par rapport au bruit de fond lors des opérations de pesée (64 $\mu g.m^{-3}$), de mélange avec des solvants (93 $\mu g.m^{-3}$) ou de découpage (1094 $\mu g.m^{-3}$) (Mazzuckelli *et al.,* 2007). Des mesures ont également été effectuées dans des laboratoires de recherche. Il a été rapporté que les opérations de mélange et de sonication des MWCNT pouvaient entraîner une dispersion des NP dans l'air *via* des gouttelettes d'eau, ainsi que leur dépôt sur les surfaces de travail (Johnson *et al.,* 2010). Par ailleurs, une étude a montré que la mise en place de moyens de protection (ventilation et hotte) permettait de diminuer la

concentration en MWCNT dans l'air lors des opérations de mélange des particules, avec une réduction de 430 µg.m^{-3} à 40 µg.m^{-3} (Han *et al.,* 2008a).

Les valeurs d'exposition aux NTC rapportées ici sont étendues, car le nombre d'études portant sur ce sujet est encore limité. Il est cependant manifeste que ces valeurs dépendent fortement de l'opération effectuée et des moyens de protection mis en œuvre, mais aussi des caractéristiques des particules (état d'agglomération…) et des techniques de métrologie utilisées. D'autre part, il est à noter que la valeur d'exposition considérée comme réaliste et utilisée comme concentration de référence dans la plupart des études de toxicité est la valeur médiane de 53 µg.m^{-3} (Maynard *et al.,* 2004).

Tableau 3 : Données d'exposition aux NTC par voie respiratoire en milieu professionnel.

Secteur professionnel	Activité	Concentration en NTC dans l'air	Référence
Industrie Production	Synthèse	0,7 à 53 µg.m^{-3}	Maynard *et al.* (2004)
Industrie Utilisation	Pesée Mélange Découpage	64 µg.m^{-3} 93 µg.m^{-3} 1094 µg.m^{-3}	Mazzuckelli *et al.* (2007)
Laboratoire de recherche	Mélange Sonication	-	Johnson *et al.* (2010)
Laboratoire de recherche	Pas de protection Protection	430 µg.m^{-3} 40 µg.m^{-3}	Han *et al.* (2008)

B.I.2. Données d'exposition aux NTC dans la population générale

B.I.2.1. Exposition directe aux NTC

L'exposition directe de la population générale aux NTC résulterait d'une exposition aux produits de consommation contenant des NTC, comme les textiles ou les équipements sportifs et électroniques. Dans ces produits manufacturés, les NTC sont cependant intégrés dans une matrice, limitant les risques d'exposition qui ne surviendraient qu'en cas de destruction ou d'abrasion des produits. Ainsi, même si aucune donnée quantitative d'exposition n'est disponible, on peut considérer que le niveau d'exposition directe de la population générale aux NTC est très faible.

B.I.2.2. Exposition indirecte *via* l'environnement

La destruction ou l'incinération des produits et des déchets contenant des NTC pourrait entraîner une libération de NTC dans l'environnement. Ainsi, des auteurs ont modélisé la quantité de NP manufacturées (dont les NTC, les NP d'argent et les NP de dioxyde de

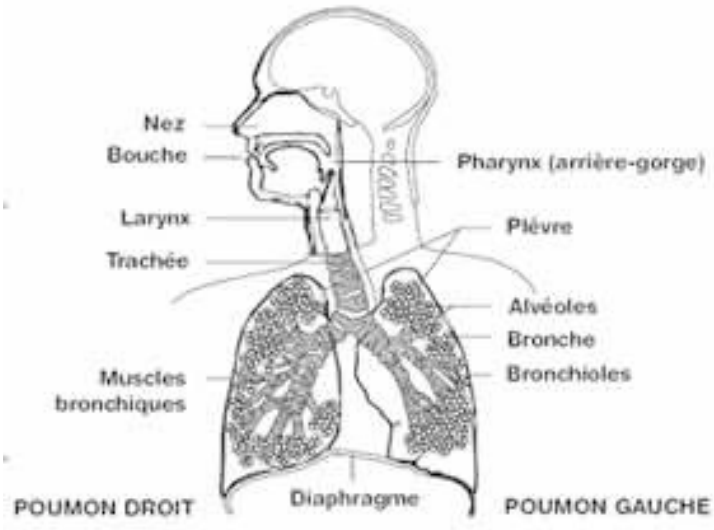


Figure 4. Représentation schématique de l'appareil respiratoire (Guide info-asthme, Association pulmonaire, Québec).

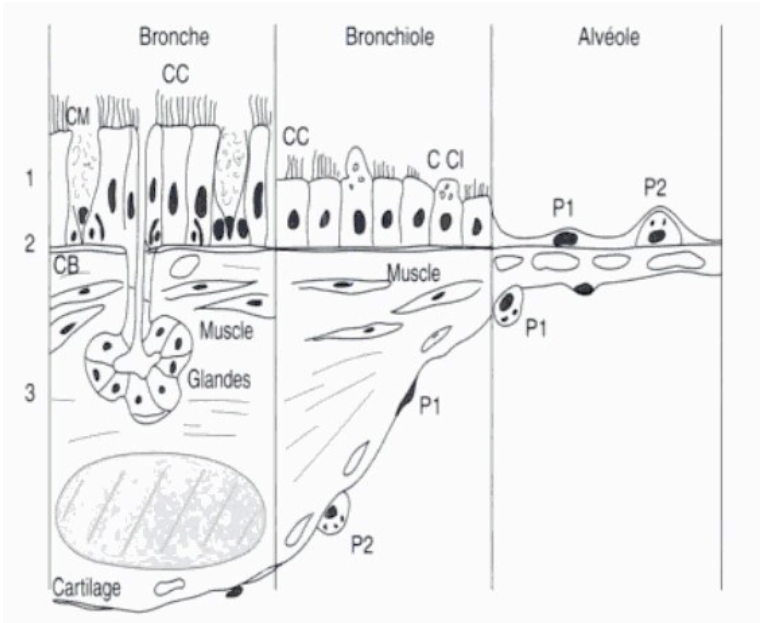


Figure 5. Représentation schématique du revêtement épithélial tapissant les voies respiratoires intra-pulmonaires : 1 : épithélium ; 2 : membrane basale ; 3 : sous-muqueuse ; CC : cellule ciliée ; CM : cellule à mucus ; CB : cellule basale ; C Cl : cellule de Clara ; P1 : Pneumocyte I ; P2 : Pneumocyte II (d'après Huchon, 2001).

titane) qui pourrait être libérée dans l'air, l'eau et le sol (Mueller et Nowack, 2008). Ce modèle s'est basé, entre autres, sur l'estimation des volumes de production mondiaux, la capacité de libération des NP à partir des produits de consommation et l'analyse des flux des NP dans les différents compartiments environnementaux. Dans cette étude, la concentration en NTC dans l'atmosphère a été estimée entre 0,0015 et 0,0023 $\mu g.m^{-3}$. Par ailleurs, la présence de NP carbonées, dont des MWCNT, a été rapportée dans les poumons de victimes de l'attentat du World Trade Center, laissant suggérer que les NTC pourraient constituer un des composants de la pollution environnementale particulaire (Wu *et al.,* 2010).

B.II. Devenir des NTC dans l'arbre respiratoire et l'organisme

B.II.1. Rappels sur l'organisation de l'appareil respiratoire

L'**appareil respiratoire** est constitué de deux régions : une région extra-pulmonaire, les voies aériennes supérieures, incluant les fosses nasales, le larynx, le pharynx et la trachée, et une région intra-pulmonaire incluant les bronches, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires (**Figure 4**).

Les voies respiratoires sont tapissées d'un épithélium qui assure une fonction de barrière physique entre le milieu extérieur et l'organisme. Au niveau des bronches, **l'épithélium respiratoire** est formé, d'une part, d'un épithélium de surface constitué par les cellules basales, les cellules ciliées et les cellules caliciformes qui sécrètent le mucus et, d'autre part, d'une sous-muqueuse contenant notamment les glandes mucipares. Le mucus sécrété au niveau de cet épithélium a pour rôle de piéger les particules pénétrant dans les poumons et permet ainsi leur évacuation grâce au mouvement des cils des cellules épithéliales ciliées. Au niveau des bronchioles, les cellules de Clara sont des cellules sécrétoires qui produisent de nombreuses protéines à activité anti-oxydante et antibactérienne, ainsi que des protéines associées au surfactant. Au niveau des alvéoles, l'épithélium comporte deux types cellulaires : les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II. Les pneumocytes de type I assurent les échanges gazeux avec le sang. Les pneumocytes de type II sécrètent le surfactant pulmonaire (**Figure 5**). Des macrophages sont présents dans la lumière alvéolaire. Ce sont des cellules résidantes des poumons qui jouent un rôle majeur dans les mécanismes de défense, en participant notamment à la phagocytose et à la clairance des particules.

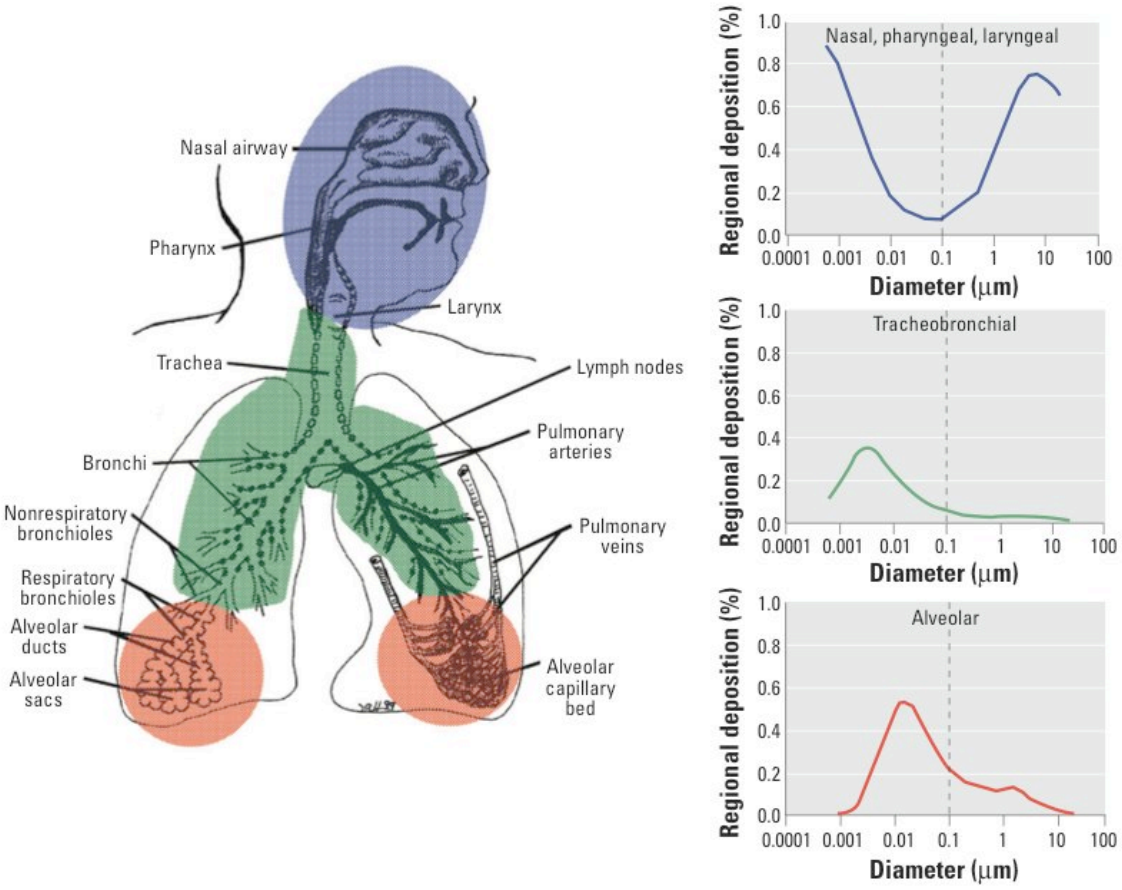


Figure 6. Sites de dépôt des NP dans l'appareil respiratoire (d'après Oberdorster *et al.,* 2005b).

B.II.2. Rappels sur le devenir des NP dans l'arbre respiratoire

Il est important de prendre en compte les principes relatifs au devenir des NP dans l'arbre respiratoire, afin de mieux comprendre le devenir des NTC après inhalation. Ce devenir dépend des mécanismes de dépôt, d'élimination et de dissémination des NP dans l'arbre respiratoire.

B.II.2.1. Dépôt

On distingue habituellement quatre mécanismes de dépôt de particules dans le tractus respiratoire. La **sédimentation** est liée à l'attraction gravitationnelle qui entraîne le dépôt des particules à la surface de l'épithélium. L'**impaction** entraîne l'adhésion des particules à la surface placée sur leur trajet. La probabilité d'impaction dépend de la vitesse de l'air et de la masse des particules. L'**interception** se produit lorsqu'une particule se déplace si près de la surface des voies aériennes qu'une de ses extrémités touche la paroi, ce qui l'arrête et entraîne son dépôt. La **diffusion** est liée au mouvement aléatoire des particules très fines et le dépôt de ces dernières se fait au hasard.

Les sites de dépôt, et donc la distribution, des particules inhalées dans le système respiratoire varient avec leur diamètre. Ainsi, 90% des NP de 1 nm de diamètre se déposent dans la région nasopharyngée, contre 10% dans la région trachéobronchique et quasiment aucune dans la région alvéolaire. Par contre, environ 30% des NP de 5 nm se déposent dans chacune des trois régions du système respiratoire. On retrouve les NP de 20 nm essentiellement dans la région alvéolaire (environ 50%) et plus faiblement dans les régions nasopharyngée et trachéobronchique (environ 15%). L'ensemble de ces données est présenté à la **figure 6**.

Ces différences de distribution ont des conséquences importantes sur les effets des NP inhalées sur la santé et sur les mécanismes impliqués dans leur élimination (Oberdorster *et al.,* 2005a; Oberdorster *et al.,* 2005b; Zhang *et al.,* 2005).

B.II.2.2. Élimination

Deux principaux mécanismes permettent d'éliminer les particules déposées dans le système respiratoire. Premièrement, la **clairance mucociliaire**, processus rapide (d'une durée inférieure à 36 heures) est le mécanisme de défense non spécifique le plus important des voies trachéobronchiques et du nasopharynx. Elle fait intervenir l'action conjuguée du mucus

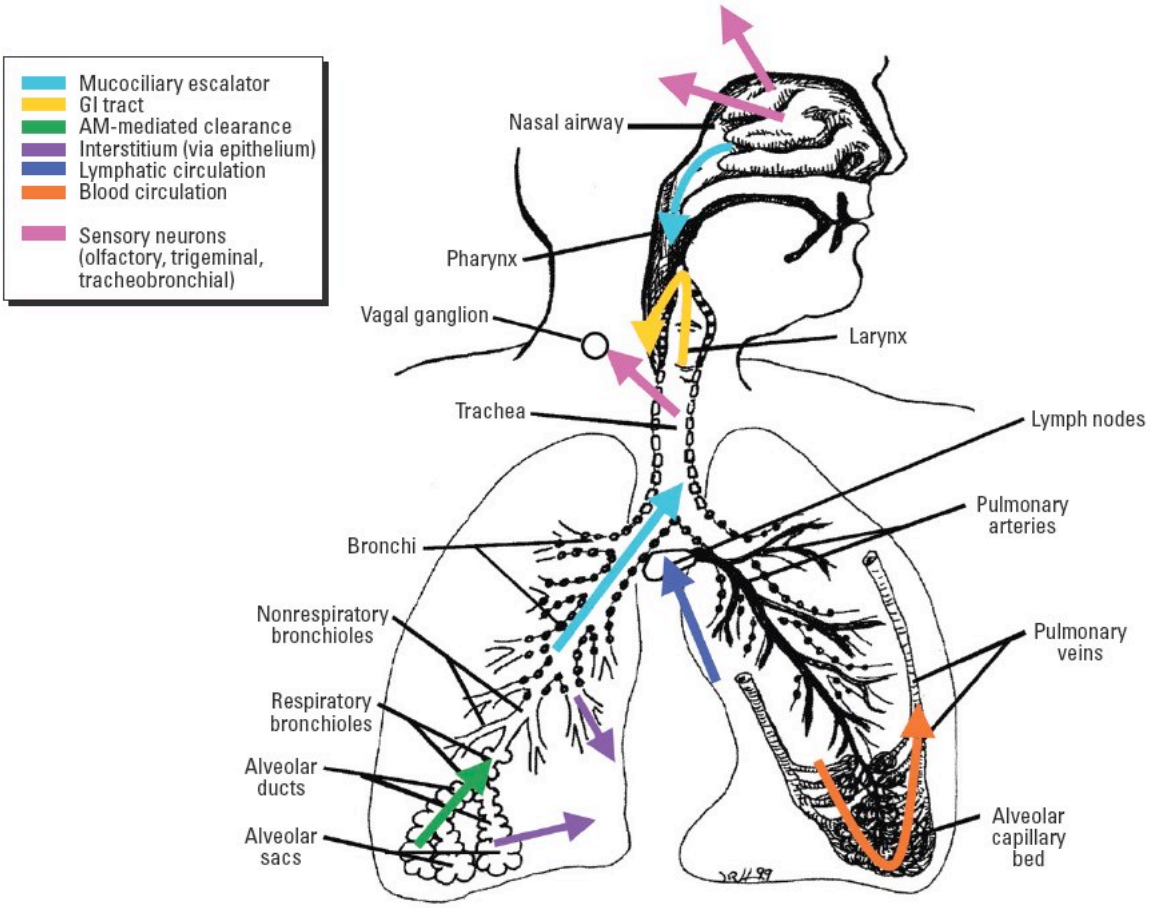


Figure 7. Mécanismes d'élimination et de dissémination des NP (dessin de J. Harkema, d'après Oberdorster *et al.,* 2005b).

recouvrant l'épithélium et du battement rétrograde des cils des cellules épithéliales ciliées. Les particules peuvent alors être dégluties (et accéder au système digestif) ou être rejetées vers l'extérieur (éternuement, mouchage).

Deuxièmement, la **clairance alvéolaire,** assurée essentiellement par les macrophages en charge de la phagocytose des particules, est un processus d'élimination plus lent (d'une durée allant de quelques mois à quelques années). Par ailleurs, l'efficacité de ce système semble varier selon la taille des particules. Oberdörster *et al.* ont ainsi rapporté que les particules de taille nanométrique pourraient être nettement moins éliminées par les macrophages que les particules de taille micrométrique (Oberdorster *et al.,* 2005b). Il peut en résulter une accumulation des NP dans les alvéoles pulmonaires.

Enfin, les particules se trouvant dans les alvéoles peuvent également **être dissoutes**, si elles sont biosolubles, et être éliminées dans le système sanguin ou la circulation lymphatique.

B.II.2.3. Dissémination

Après leur dépôt dans les voies respiratoires, les NP semblent pouvoir être transloquées vers des sites extra pulmonaires et atteindre différents organes cibles. Différents mécanismes de translocation ont été identifiés (**Figure 7**). Tout d'abord, la **translocation épithéliale** permet aux NP de passer des épithéliums bronchique et alvéolaire vers l'interstitium. Oberdörster *et al.* ont montré la présence de NP de polytétrafluoroéthylène dans l'interstitium bronchique et dans l'interstitium pulmonaire proche de la plèvre, 15 minutes après exposition inhalatoire chez le rat (Oberdorster *et al.,* 2000). Or, dès lors que les NP ont atteint l'interstitium pulmonaire, elles peuvent passer dans la **circulation sanguine** ou dans la **circulation lymphatique**, ce qui peut conduire à leur distribution dans tout l'organisme (Oberdorster *et al.,* 2005b). Néanmoins, l'importance de ce phénomène de translocation dépendrait des caractéristiques physico-chimiques des NP, comme la réactivité de surface, la taille et la charge, qui moduleraient leur passage à travers les monocouches de cellules épithéliales et endothéliales. Par exemple, Oberdörster *et al.* ont montré que la quantité de NP de noir de carbone passant dans l'interstitium pulmonaire représentait environ 4% de la dose administrée par voie intra-trachéale chez le rat, alors que pour les NP de dioxyde de titane, elle était de l'ordre de 50% (Oberdorster *et al.,* 1992).

Il existe une autre voie de translocation de NP à partir de l'appareil respiratoire. Il s'agit de la **translocation axonale** qui fait intervenir le transfert vers le **système nerveux central** *via* les

axones des neurones des nerfs olfactif et trigéminé innervant la muqueuse nasale. Oberdörster *et al.* ont montré qu'après une exposition par inhalation, des NP d'oxyde de manganèse s'accumulent de façon significativement plus importante dans le bulbe olfactif que dans le poumon des rats (Oberdorster *et al.,* 2004).

B.II.3. Devenir des NTC dans les voies respiratoires

Le devenir des NTC dans le tractus respiratoire après inhalation, mais aussi après exposition par voie systémique, est une question critique. Ainsi, différentes approches ont été utilisées *in vivo* et *in vitro* afin d'étudier la biodistribution des NTC. Certaines de ces approches utilisent des NTC marqués par des radionucléides ou des fluorophores. D'autres techniques comme la spectroscopie Raman, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'imagerie dans le proche IR, la microscopie optique (MO) en lumière blanche ou la microscopie électronique (ME), reposent sur la détection de NTC non marqués. Le présent sous-chapitre expose ces différentes approches, puis présente les données actuelles sur la distribution des NTC dans l'arbre respiratoire.

B.II.3.1. Méthodes d'étude de la biodistribution des NTC

B.II.3.1.1. Méthodes utilisant des NTC marqués à l'aide de radionucléides

Le marquage par des radionucléides permet d'étudier la biodistribution des NTC dans l'organisme en mesurant la radioactivité dans les différents organes ou en utilisant des techniques d'imagerie par scintigraphie, comme la tomographie par émission de positons (PET).

Les NTC radiomarqués ont surtout été utilisés dans des études *in vivo* de biodistribution après leur administration par voie systémique. Dans ces travaux, les NTC étaient la plupart du temps fonctionnalisés de façon à les rendre hydrosolubles. Certaines études ont montré que les NTC ainsi fonctionnalisés étaient rapidement éliminés par l'organisme et ne s'accumulaient pas dans les organes. Par exemple, Singh *et al.* ont trouvé que des SWCNT et MWCNT, fonctionnalisés avec du DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) et marqués par de l'indium ^{111}In, puis administrés par voie intra-veineuse chez la souris, étaient très rapidement excrétés par voie urinaire (95% éliminés dans les 3 h) et n'étaient retenus ni dans la rate, ni dans le foie (Singh *et al.,* 2006). De même, Guo *et al.* ont montré qu'après administration par voie intra-péritonéale, plus de 70% des MWCNT fonctionnalisés avec de la glucosamine et marqués avec du technétium ^{99m}Tc étaient éliminés dans l'urine et les

fèces en 24 h (Guo *et al.,* 2007). Cependant, ces résultats doivent être pris avec précaution car d'autres études ont au contraire montré que les NTC avaient une **clairance** urinaire relativement lente et pouvaient **s'accumuler dans certains organes**. Ainsi, des travaux menés sur des MWCNT marqués avec du carbone ^{14}C (Georgin *et al.,* 2009) ou des SWCNT marqués avec de l'indium ^{125}In (Wang *et al.,* 2004), de l'ytrium ^{86}Y (McDevitt *et al.,* 2007a) ou du cuivre ^{64}Cu (Liu *et al.,* 2007) ont rapporté une excrétion urinaire relativement lente (jusqu'à 24h) des NTC après leur administration systémique chez la souris. Ainsi, les NTC pourraient s'accumuler dans la rate et le foie à 24 heures (Liu *et al.,* 2007; Georgin *et al.,* 2009) et être encore présents dans ces organes à 15 jours (McDevitt *et al.,* 2007a).

Par PET, McDevitt *et al.* ont montré que 3 h après leur administration par voie intra-veineuse chez la souris, des SWCNT marqués avec de l'ytrium ^{86}Y s'étaient distribués dans les reins, la rate et le foie (McDevitt *et al.,* 2007a). De même, il a été rapporté que des SWCNT fonctionnalisés avec des hydrocarbones et marqués avec de l'indium ^{125}In pouvaient s'accumuler dans le poumon juste après leur administration par voie intra-veineuse et être encore présents dans cet organe 7 jours après (Hong *et al.,* 2010).

Le marquage par des radionucléides permet donc de suivre le devenir des NTC dans l'organisme de façon quantitative et qualitative. Cependant, cette approche reste limitée car elle nécessite des équipements particuliers pour la production des NTC radiomarqués (cyclotron) et un laboratoire habilité pour le travail sur les radionucléides. De plus, les images obtenues par les techniques d'imagerie classiques ont souvent une résolution spatiale faible, un bruit de fond important et manquent de corrélation anatomique. Toutefois, ce point peut être amélioré en utilisant des techniques qui permettent de générer des images complémentaires, comme la technique de PET. Enfin, la présence de radionucléide libre dans l'échantillon de NTC, du fait d'un lavage incomplet, peut induire de faux positifs, notamment concernant l'excrétion. De même, les radionucléides peuvent potentiellement être relargués des NTC *in vivo* et être éliminés sous forme libre. Ainsi, la technique de radiomarquage présente des limitations pour étudier l'excrétion et le devenir à long terme des NTC dans l'organisme (Roller *et al.,* 2011).

Une étude a utilisé des NTC marqués avec du carbone ^{14}C pour décrire le devenir des NTC après leur administration par voie respiratoire chez la souris. Elle sera détaillée un peu plus loin.

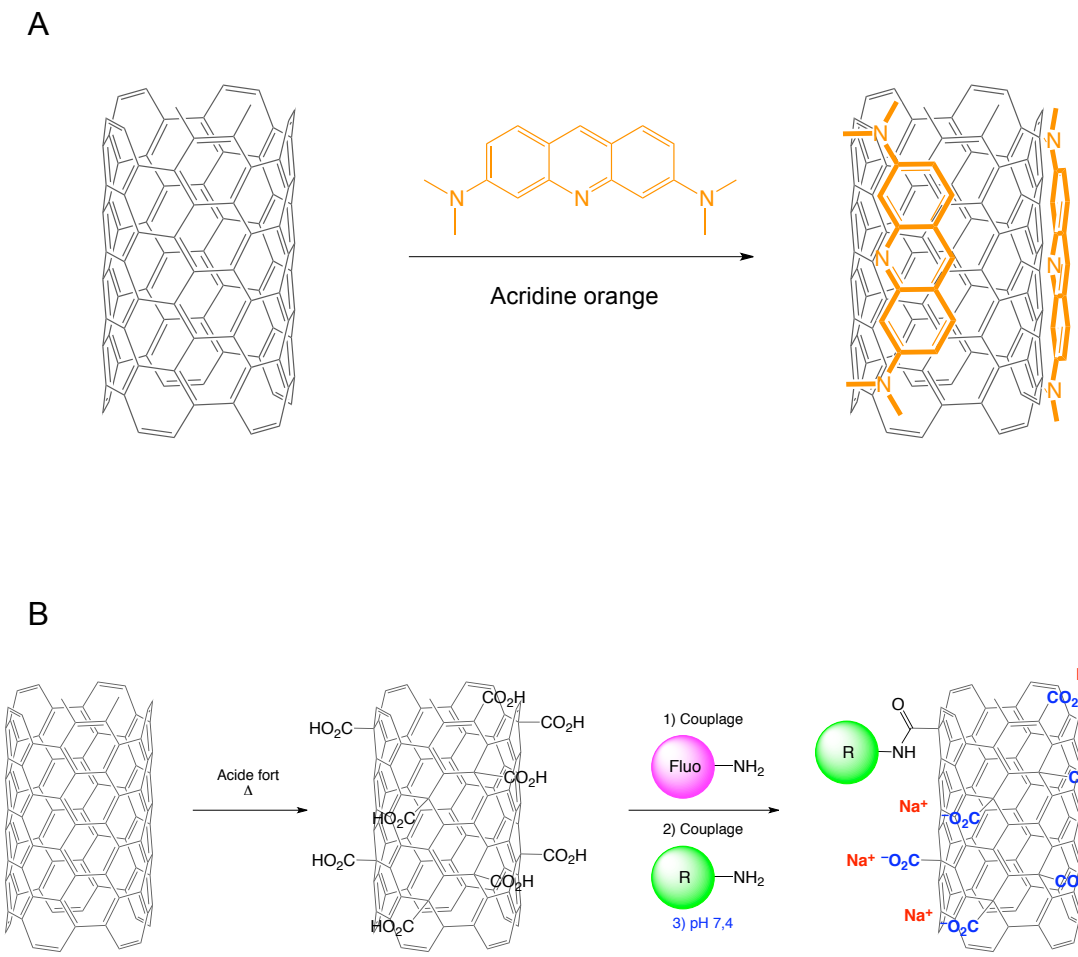


Figure 8. NTC marqués par des fluorophores. A : NTC marqués de façon non covalente par adsorption du fluorophore (ici l'acridine orange) à la surface des NTC sans modification chimique préalable. **B** : NTC marqués de façon covalente après traitement par un acide fort (oxydation) et couplage avec le fluorophore (dessin Luc Lebeau).

B.II.3.1.2. Méthodes utilisant des NTC marqués à l'aide de fluorophores

Comme beaucoup de structures biologiques, les NTC à l'état individualisé sont trop petits pour être visualisés par microscopie optique. Le marquage par des fluorochromes et l'imagerie de fluorescence ont donc été utilisés pour suivre leur devenir *in vitro* et *in vivo.* En effet, l'imagerie de fluorescence, qui permet de suivre des traceurs fluorescents dans des systèmes biologiques en observant l'émission de fluorescence après excitation par une source lumineuse, est une méthode sensible, qui présente l'avantage de ne pas utiliser de radiations ionisantes. Cependant, les systèmes biologiques peuvent présenter une auto-fluorescence (fluorescence naturelle émise par certains constituants comme l'hémoglobine) entraînant une diminution du contraste de l'image. Le choix de fluorophores de longueurs d'onde d'excitation et d'émission élevées est indispensable pour réduire cet effet d'auto-fluorescence. Parmi les fluorophores compatibles avec l'imagerie de fluorescence dans des systèmes biologiques, on distingue les fluorophores organiques, comme les dérivés des cyanines (Cy3 ou Cy5), la fluorescéine ou la porphyrine, et les protéines fluorescentes, comme la "Green Fluorescent Protein" (GFP).

Le marquage des NTC par ces fluorochromes peut se faire par fonctionnalisation non covalente ou covalente. La **fonctionnalisation non covalente** implique des interactions physiques faibles (comme le π-stacking, les forces de Van der Waals ou les forces hydrophobes) entre les NTC et le composé fluorescent (**Figure 8 A**). Ce type d'approche peut être mis en œuvre sur des NTC bruts (non préalablement modifiés chimiquement), ce qui présente l'avantage de préserver, dans une certaine limite, les propriétés d'hydrophobie des NTC ; certains fluorophores hydrophiles peuvent, en effet, permettre la solubilisation des NTC après adsorption (Backes *et al.*, 2009). Dans la littérature, la fonctionnalisation non covalente a été utilisé pour marquer des SWCNT ou des MWCNT par de l'acridine orange, des analogues de Cy3, des pérylènes ou encore de l'ADN marqué au Cy3 (Prakash *et al.*, 2003; Kam *et al.*, 2005; Backes *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Toutefois, la fluorescence du marqueur adsorbé à la surface des NTC peut être plus ou moins éteinte du fait de la proximité physique des deux entités et d'un transfert d'énergie (Prakash *et al.*, 2003; Backes *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). On parle alors d'extinction de fluorescence (« quenching »).

Un marquage par **fonctionnalisation covalente** nécessite l'introduction de groupements chimiques réactifs à la surface des NTC, ces groupements permettant par la suite le couplage du fluorophore. Pour cela, le traitement des NTC par des acides forts comme l'acide nitrique est largement utilisé (**Figure 8 B**) (Wu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Aprile *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Mais, ceci altère

irrémédiablement les propriétés des NTC. En effet, le traitement oxydant conduit au raccourcissement des NTC. D'autre part, la forte densité des groupements carboxyles introduits contribue à rendre les NTC hydrosolubles. Ces modifications ont sans aucun doute un impact sur la biodistribution des NTC. L'introduction de groupements réactifs peut toutefois se faire par des approches permettant un meilleur contrôle du taux de fonctionnalisation des NTC (réaction avec un sel de diazonium par exemple).

Le marquage à l'aide de fluorophores a été utilisé pour étudier *in vitro* l'**internalisation** des NTC par la cellule. De nombreuses études ont ainsi rapporté que des NTC marqués de façon non covalente à l'aide de Cy3 (Kam *et al.,* 2005) ou de Cy5 (Dong *et al.,* 2009), ou marqués de façon covalente par de la fluorescéine (Cheng *et al.,* 2008; Chen *et al.,* 2009; Heister *et al.,* 2009; Wu *et al.,* 2009; Cheng *et al.,* 2011), étaient internalisés par différents types cellulaires. De plus, il a été montré que l'endocytose de SWCNT marqués de façon non covalente à l'acridine orange (Zhang *et al.,* 2010) ou à la GFP (Wang *et al.*, 2010b) dépendait de la voie des clathrines.

Le marquage à l'aide de fluorophores a également permis d'étudier la **biodistribution** des NTC après leur administration par voie systémique chez l'animal. Après administration par voie intra-veineuse chez la souris, Ruggiero *et al.* ont par exemple observé que des SWCNT marqués de façon covalente par deux fluorochromes (Alexa Fluor AF_{488} et AF_{680}) étaient rapidement éliminés par clairance rénale (Ruggiero *et al.,* 2010). Au contraire, Kang *et al.* ont montré, par l'observation de coupes d'organes en imagerie de fluorescence, que des SWCNT marqués de façon non covalente avec de l'AF_{488} et injectés par voie intra-veineuse chez la souris, s'accumulaient dans le foie, la rate et les reins et étaient éliminés lentement (Kang *et al.,* 2009). De même, il a été montré que des MWCNT marqués de façon covalente avec de la porphyrine s'étaient accumulés dans le foie et les tissus sous-muqueux chez la souris, 130 jours après leur administration par voie sous-cutanée (Jia *et al.,* 2009). Dans cette dernière étude, les observations ont été réalisées *ex vivo* sur des homogénats d'organes en mesurant l'intensité du signal de fluorescence du marqueur associé aux NTC. Compte tenu de cette approche, il est impossible toutefois d'être sûr que la fluorescence mesurée est due aux NTC. **Il est important de préciser que, dans la plupart des études citées ici, les NTC avaient subi avant marquage, un traitement oxydant par des acides, visant à les raccourcir et à les rendre hydrosolubles.**

À notre connaissance, aucune étude n'a utilisé de NTC marqués par un fluorophore pour étudier le devenir des NTC après leur administration par voie respiratoire.

B.II.3.1.3. Méthodes basées sur la détection de NTC non marqués

La spectroscopie Raman, l'IRM, l'imagerie dans le proche IR, la MO en lumière blanche ou la ME ont été utilisées pour détecter des NTC non marqués *in vitro* ou *in vivo.*

B.II.3.1.3.a. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique qui permet, entre autres, de caractériser la composition moléculaire et la structure d'un matériau, en focalisant un faisceau laser sur l'échantillon et en analysant la lumière diffusée. Or, les NTC bruts ont une signature spectrale caractéristique en spectroscopie Raman. Ainsi, cette méthode peut permettre d'étudier le devenir des NTC *in vitro* et *in vivo* en utilisant leurs propriétés intrinsèques.

L'imagerie en spectroscopie Raman a été utilisée pour étudier *in vitro* l'**internalisation** des NTC par la cellule. Yaron *et al.* ont ainsi montré que les SWCNT bruts étaient internalisés par des cellules HeLa en culture et qu'ils étaient localisés dans le cytoplasme et la région périnucléaire de ces cellules (Yaron *et al.,* 2011). De plus, le processus d'entrée dans la cellule semblait énergie-dépendant car une température faible (4°C) entraînait une inhibition de l'internalisation des NTC.

La spectroscopie Raman a aussi permis d'étudier la **biodistribution** des NTC chez l'animal après administration par voie systémique. Il a ainsi été montré que des SWCNT, fonctionnalisés avec différents polyéthylènes glycols (PEG) et administrés par voir intra-veineuse chez la souris, s'accumulaient de façon prédominante dans le foie et la rate et qu'ils étaient éliminés dans les fèces et les urines de façon quasiment complète en deux mois (Liu *et al.,* 2008c). Ces observations ont été réalisées *ex vivo* **sur les organes** en mesurant l'intensité du signal caractéristique des NTC en spectroscopie Raman. De la même manière, Yang *et al.* ont observé que des SWCNT bruts s'étaient accumulés dans le foie, la rate et surtout le poumon, 90 jours après leur administration par voie intra-veineuse (Yang *et al.,* 2008).

À notre connaissance, aucune étude n'a utilisé la spectroscopie Raman pour étudier le devenir des NTC après leur administration par voie respiratoire.

B.II.3.1.3.b. Imagerie par résonance magnétique

L'IRM repose sur les propriétés magnétiques (densité protonique et temps de relaxation pour revenir à l'état d'équilibre) des tissus biologiques soumis à un champ magnétique. C'est une technique non invasive, qui permet d'éviter les radiations ionisantes et dont les images présentent une bonne résolution. Le poumon est cependant difficile à étudier en IRM car cet organe, constitué majoritairement d'air (80%), présente une faible densité protonique. Un agent de contraste, l'hélium-3 hyper polarisé par exemple, peut être introduit dans le poumon afin de permettre la visualisation des espaces alvéolaires. Par ailleurs, les particules de fer, rémanentes des procédés de synthèse et présentes à la surface des NTC, ont des propriétés magnétiques suffisamment puissantes pour induire une diminution de l'homogénéité du champ magnétique, générer un contraste en IRM et ainsi permettre la détection des NTC.

Comme nous le verrons plus loin, l'IRM associée à l'hélium-3 hyper polarisé a été utilisée pour étudier la biodistribution par voie respiratoire de NTC bruts contenant du fer.

B.II.3.1.3.c. Imagerie dans le proche IR

Les NTC bruts ont des propriétés de photoluminescence dans le proche IR (700 - 1400 nm). Ainsi, l'imagerie dans le proche IR, qui est une technique spécifique de fluorescence, permet d'étudier le comportement des NTC dans les systèmes biologiques en utilisant leurs propriétés intrinsèques. De plus, cette technique présente l'avantage de s'affranchir en partie de l'auto-fluorescence des cellules et des tissus, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de la détection.

L'imagerie dans le proche IR a ainsi été utilisée pour étudier *in vitro* l'**internalisation** des NTC par la cellule. Cherukuri *et al.* ont par exemple observé que des SWCNT bruts étaient internalisés par les macrophages péritonéaux de souris en culture (Cherukuri *et al.,* 2004). La mesure quantitative de l'intensité d'émission du signal de photoluminescence associée aux NTC leur a aussi permis de montrer que la quantité de NTC phagocytés augmentait avec le temps et avec la concentration en NTC du milieu. Jin *et al.* ont également étudié l'endocytose de SWCNT fonctionnalisés dans des fibroblastes murins (NIH-3T3) (Jin *et al.,* 2008). La mesure de la photoluminescence en temps réel a permis d'observer que les NTC s'accumulaient dans un premier temps autour des membranes plasmiques avant d'être internalisés par les cellules.

L'imagerie dans le proche IR a aussi permis d'étudier la biodistribution des NTC après leur administration par voie systémique chez l'animal. La présence de SWCNT bruts a par exemple été observée dans le foie de lapins, 24 heures après une administration par voie intra-veineuse (Cherukuri *et al.,* 2006). Ces observations ont été réalisées sur des **coupes d'organes**. Par contre, aucun signal significatif associé aux NTC n'a été constaté dans les autres organes.

L'imagerie dans le proche IR a aussi été utilisée pour observer la biodistribution des NTC chez **l'animal entier**. Leeuw *et al.* ont été les premiers à détecter des SWCNT bruts dans les intestins de drosophiles vivantes, dont l'eau de boisson contenait des NTC (Leeuw *et al.,* 2007). De plus, à l'aide de coupes de tissus, ils ont montré que les NTC pouvaient traverser la paroi de l'intestin, se retrouver dans la circulation générale et dans certaines structures du système nerveux central. De même, Welsher *et al.* ont étudié par imagerie dans le proche IR la biodistribution, chez la souris, de SWCNT fonctionnalisés avec différents PEG après une administration par voie intra-veineuse (Welsher *et al.,* 2011). Ils ont montré que les NTC se distribuaient très rapidement dans les poumons, les reins, le foie et la rate. Cependant, ces observations ont été réalisées à des temps très courts (minutes) et ne permettent pas d'étudier l'accumulation des NTC dans l'organisme entier.

À notre connaissance, aucune étude n'a utilisé les propriétés de photoluminescence des NTC dans le proche IR pour étudier leur biodistribution après administration par voie respiratoire.

B.II.3.1.3.d. Microscopie optique en lumière blanche et microscopie électronique

L'observation en MO en lumière blanche de coupes histologiques, réalisée en routine, peut être très utile pour localiser les agrégats de NTC dans les tissus, ainsi que pour évaluer l'intégrité de l'organe et le développement d'effets physiopathologiques comme la formation de granulomes par exemple. Cette approche présente cependant des limites. L'analyse plus fine d'une localisation des NTC sous forme non agrégée, ou encore l'étude de la localisation des NTC à un niveau subcellulaire ne sont pas possibles en MO en lumière blanche pour des raisons évidentes de résolution.

De résolution nanométrique, la ME constitue quant à elle une technique idéale pour analyser les changements de structure d'un organe en lien avec le dépôt des NTC et pour étudier la localisation fine des NTC au sein de cet organe, notamment à l'échelle subcellulaire. Néanmoins, cette technique reste encore un défi car elle demande des équipements

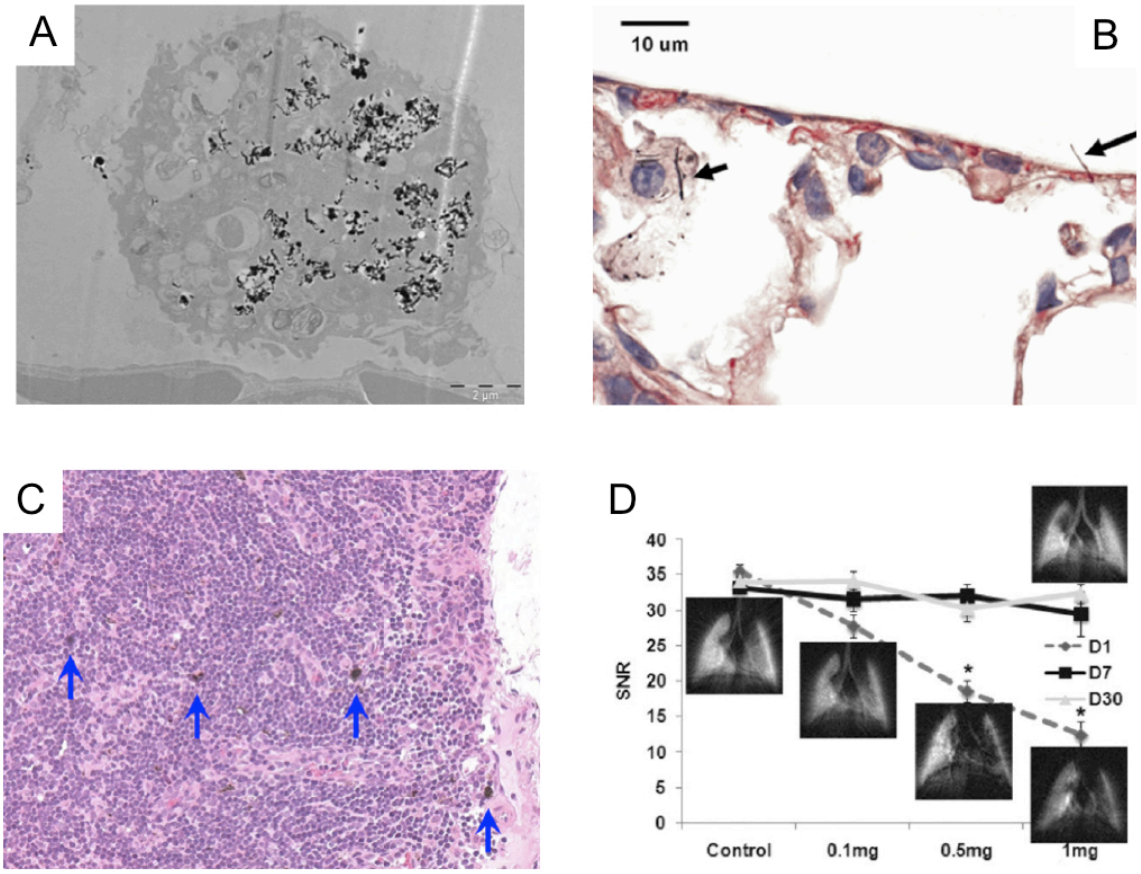


Figure 9. Exemples illustrant la distribution des NTC dans l'appareil respiratoire. A : Image en MET de la phagocytose de MWCNT par les macrophages alvéolaires 7 jours après leur administration (2 mg) par voie intra-trachéale chez le rat (d'après Elgrabli *et al.,* 2008b). **B** : Image en MO montrant des MWCNT dans la plèvre 28 jours après leur administration (80 µg) par voie oropharyngée chez la souris (d'après Mercer *et al.,* 2010). **C** : Image en MO du dépôt de MWCNT dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons 6 mois après leur administration (1 mg/kg) par voie intra-trachéale chez le rat (d'après Kobayashi *et al.,* 2010). **D** : Distribution analysée par IRM de SWCNT contenant du fer dans le poumon après leur administration par voie intra-trachéale chez le rat. Les NTC entraînent une diminution du signal IRM un jour après leur administration, mais le signal IRM redevient normal ensuite (d'après Al Faraj *et al.,* 2010).

particuliers et une expérience importante. En effet, l'analyse en ME nécessite une préparation et une préservation adéquates des organes, un échantillonnage représentatif du tissu analysé, ainsi qu'une identification sans ambigüité des NTC dans les tissus. Une autre limite de cette approche est qu'elle ne permet pas une quantification absolue des NTC présents dans l'organe.

Comme nous le verrons plus loin, la MO en lumière blanche et la ME sont les techniques qui ont été le plus souvent utilisées pour étudier le devenir des NTC dans le poumon et l'organisme après leur administration par voie respiratoire chez l'animal.

B.II.3.2. État des connaissances sur la distribution des NTC dans l'appareil respiratoire

Certains auteurs se sont tout d'abord intéressés **au dépôt et au devenir** des NTC dans le poumon après leur administration par voie respiratoire. Mercer *et al.* ont par exemple examiné la distribution de SWCNT marqués à l'or colloïdal dans les poumons de souris après l'administration pharyngée d'une dose de 10 µg (Mercer *et al.,* 2008). Les auteurs ont ainsi estimé par analyse des coupes de poumon **en MO** en lumière blanche, que 80% des NTC présents sous forme d'agrégats se déposent au niveau de la région alvéolaire supérieure, provoquant la formation de lésions granulomateuses. Le reste des NTC pourrait traverser le parenchyme pulmonaire et être incorporé dans l'interstitium pulmonaire, ce qui induirait la production de collagène. Enfin, une petite partie des NTC pourrait être phagocytée par les macrophages alvéolaires.

Plusieurs études ont rapporté une **internalisation** des NTC dans certaines cellules pulmonaires après administration par voie respiratoire chez le rat ou la souris. Ainsi, il a été montré par l'analyse de coupes de poumon **en microscopie électronique à transmission (MET)**, que les NTC étaient phagocytés par les macrophages alvéolaires (**Figure 9 A**) (Elgrabli *et al.,* 2008b; Al Faraj *et al.,* 2010; Porter *et al.,* 2010) et les cellules épithéliales alvéolaires (Mercer *et al.,* 2010; Porter *et al.,* 2010).

D'autres travaux ont montré une **biopersistance** des NTC dans le poumon. Par exemple, Muller *et al.* ont étudié la rémanence des MWCNT, broyés et non broyés, dans les poumons de rats exposés par instillation intra-trachéale unique (0,5, 2 et 5 mg) en **dosant le cobalt**, un contaminant métallique des NTC (Muller *et al.,* 2005). À la plus faible dose (0,5 mg), 80% des MWCNT non broyés et 40% des MWCNT broyés ont été retrouvés dans les poumons 60 jours après l'administration. Les auteurs concluent que les NTC sont persistants dans les

poumons et que la cinétique de leur clairance est influencée par leur longueur. Dans une étude d'inhalation menée chez le rat (241 ou 11 mg/m^3, 6 heures, 1 jour), Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn ont également montré en dosant le cobalt, que la clairance des NTC est lente et que ces derniers sont encore présents 90 jours après leur administration (Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009). De même, Elgrabli *et al.* ont montré, **en dosant le nickel**, un autre contaminant métallique des NTC, que les MWCNT étaient encore présents dans le poumon de rats 6 mois après leur administration par instillation intra-trachéale (1, 10 ou 100 µg) (Elgrabli *et al.,* 2008b). Concernant le mécanisme de **clairance** des NTC, ces auteurs ont montré qu'il y avait une phagocytose des NTC par les macrophages alvéolaires et que celle-ci était suivie de l'apoptose des macrophages. Dans cette étude, l'analyse des NTC présents dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire (LBA) a montré que ceux-ci avaient subi des modifications physiques (longueur diminuée) et chimiques (ajout de fonctions oxygénées et azotées), pouvant faciliter leur élimination.

Certains auteurs ont rapporté une **pénétration** des NTC dans **les cavités subpleurale et pleurale** après exposition par voie respiratoire. Ainsi, dans une étude par inhalation (30 mg/m^3, 6 heures, 1 jour) chez la souris, il a été montré, par analyse histologique et **en MET**, que les MWCNT pouvaient traverser la cavité subpleurale et rester dans les macrophages du tissu subpleural (Ryman-Rasmussen *et al.,* 2009a). Une pénétration des MWCNT dans la plèvre a aussi été observée dès le premier jour suivant leur administration (10 à 80 µg) par voie oropharyngée chez la souris (**Figure 9 B**) (Mercer *et al.,* 2010; Porter *et al.,* 2010).

Plusieurs études ont porté sur la **translocation** des NTC après leur administration par voie respiratoire. Certains auteurs ont ainsi montré, par **analyse histologique et/ou en MET**, qu'il existait une translocation des NTC vers les **ganglions lymphatiques associés aux poumons**. La présence de MWCNT a, par exemple, été rapportée dans les macrophages présents au niveau de ces ganglions, 30 jours après leur administration par voie intra-trachéale chez le rat (Elgrabli *et al.,* 2008b; Wako *et al.,* 2010). Aiso *et al.* ont montré que cette translocation augmentait avec la dose et avec le temps (Aiso *et al.,* 2011). Des MWCNT associés à la formation de granulomes ont été également observés dans les ganglions pulmonaires de rats, 6 mois après leur administration par voie intra-trachéale (Kobayashi *et al.,* 2010), ainsi qu'après une exposition de 3 mois par inhalation (Ma-Hock *et al.,* 2009). Dans ces deux études, les observations ont été effectuées par **analyse histologique** (**Figure 9 C**).

Une **translocation** des NTC du poumon vers la **circulation générale** après exposition par voie respiratoire a aussi été envisagée. Par exemple, une étude a montré à l'aide de la **MET**,

que des MWCNT administrés par voie intra-trachéale chez le rat pouvaient passer à travers la barrière alvéolo-capillaire, laissant suggérer une translocation potentielle vers la circulation sanguine et les autres organes (Liu *et al.,* 2008a). Cependant, d'autres auteurs n'ont pas mis en évidence de translocation vers la circulation générale (Deng *et al.,* 2007) ou estiment qu'elle est très limitée (Al Faraj *et al.,* 2010). Ainsi, après administration par voie intra-trachéale de MWCNT fonctionnalisés et marqués avec du carbone 14 et de la taurine chez la souris, Deng *et al.* ont montré que la quantité de NTC dans les poumons diminuait de 78 à 20% entre le 1er et le 28^{e} jour suivant l'exposition, et ont donc envisagé une translocation potentielle des NTC (Deng *et al.,* 2007). Néanmoins, ils n'ont pas mis en évidence de NTC dans le sang ou les autres organes. De même, dans leurs études menées chez le rat, Al Faraj *et al.* ont utilisé l'**IRM** pour étudier la biodistribution au cours du temps de SWCNT bruts contenant du fer, après administration par voie intra-trachéale (**Figure 9 D**) (Al Faraj *et al.,* 2009; Al Faraj *et al.,* 2010). Ils ont ainsi observé que les NTC entraînaient une diminution du signal IRM un jour après leur administration, mais que ce signal redevenait normal ensuite. D'après les auteurs, ce rétablissement pourrait être lié à une distribution plus homogène des NTC dans le poumon au cours du temps, à la formation de granulomes autour des agrégats de NTC ou à l'incorporation des particules de fer dans des molécules de ferritine. La présence de NTC dans les autres organes n'a pas été observée.

Ainsi, après leur administration par voie respiratoire, les NTC pourraient se distribuer dans tout le poumon et être notamment phagocytés par les macrophages alvéolaires. Cette phagocytose pourrait contribuer au mécanisme de clairance des NTC. Néanmoins, plusieurs études ont rapporté une biopersistance des NTC dans le poumon, ce qui pourrait être déterminant dans leur toxicité. De plus, une pénétration des NTC dans la cavité pleurale, ainsi qu'une translocation des NTC vers la circulation générale semblent possibles, bien que ces résultats soient encore très largement discutés. Ces données de distribution ont été obtenues essentiellement en MO en lumière blanche et en MET.

Particle diameter (µm)	Particle no. (cm^{-3})	Particle surface area ($µm^2/cm^3$)
5	153,000,000	12,000
20	2,400,000	3,016
250	1,200	240
5,000	0.15	12

Figure 10. Nombre de particules ainsi que leur surface pour avoir 10 $µg/m^3$ particules en suspension, en fonction du diamètre des particules (d'après Oberdorster *et al.,* 2005b)

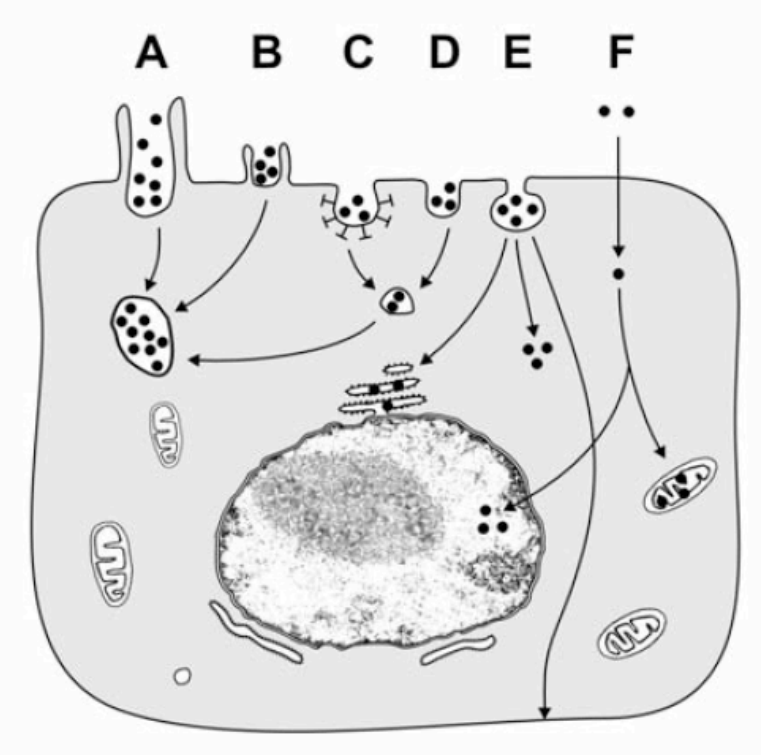


Figure 11. Mécanismes d'internalisation des NP dans la cellule. Les NP peuvent être internalisées dans la cellule par phagocytose (**A**), macropinocytose (**B**), endocytose dépendante de la voie des clathrines (**C**), endocytose indépendante de la voie des clathrines ou des cavéolines (**D**) ou par endocytose dépendante de la voie des cavéolines (**E**). Un transport passif des NP à travers la membrane plasmique est aussi possible (**F**) (d'après Muhlfeld *et al.,* 2008).

Partie C – Toxicité respiratoire des NTC

C.I. Rappels sur la toxicité des NP

Le terme de **nanotoxicologie** a été proposé par Donaldson *et al.* pour définir l'étude spécifique des effets toxicologiques potentiels des NP (Donaldson *et al.,* 2004). En effet, le nombre et la surface spécifique par unité de masse des particules augmentant quand leur diamètre diminue (**Figure 10**), ces deux paramètres sont très élevés pour les NP. Ces caractéristiques donnent aux NP des propriétés biologiques parfois fondamentalement différentes de celles que possèdent les mêmes matériaux micro ou macroscopiques. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires, en lien avec les effets toxiques des NP, est donc essentielle pour l'évaluation des risques pour l'homme et l'environnement, ainsi que pour le développement de nanomatériaux « sans danger ». Ce premier sous-chapitre présentera les mécanismes, démontrés ou encore hypothétiques, impliqués dans la survenue des effets biologiques des NP manufacturées, en lien avec leurs caractéristiques physico-chimiques.

C.I.1. Internalisation cellulaire

L'internalisation dans la cellule jouerait un rôle central dans la survenue des réponses biologiques induites par les NP. Même si les conditions et les modes exacts d'entrée des NP dans la cellule font encore débat, différents mécanismes d'internalisation, ont été proposés et sont résumés à la **figure 11**.

L'**endocytose** a été décrite dans plusieurs études comme le mode d'entrée clé des NP dans la cellule. *In vivo* (chez le rat après inhalation), des NP d'or sous forme isolée ou agglomérée ont été mises en évidence à l'intérieur de vésicules dans des macrophages alvéolaires et des cellules épithéliales de type I (Takenaka *et al.,* 2006). *In vitro*, des NP d'or ou de dioxyde de titane ont été localisées à l'intérieur de vésicules dans des macrophages (Shukla *et al.,* 2005), des cellules épithéliales alvéolaires (Singh *et al.,* 2007) ou des cellules épithéliales bronchiques (Belade *et al.,* 2012). Il semblerait que le processus d'entrée des NP dans la cellule soit **énergie-dépendant**. En effet, Kim *et al.* ont montré une inhibition de l'internalisation de NP magnétiques dans des cellules épithéliales alvéolaires A549 en présence d'inhibiteurs métaboliques ou suite à une incubation à 4°C (Kim *et al.,* 2006).

Un **transport passif** des NP à travers les membranes plasmiques est aussi possible. *In vitro* par exemple, des NP de polystyrènes et de dioxyde de titane ont été observées à l'intérieur

de globules rouges (Rothen-Rutishauser *et al.,* 2006). Ce mode d'entrée pourrait expliquer la présence de NP libres (et non dans des vésicules) dans le cytoplasme des cellules, même si la rupture de vésicules contenant les NP après endocytose peut aussi aboutir à leur présence dans le cytoplasme.

L'internalisation cellulaire des NP dépendrait de leurs **caractéristiques physico-chimiques**. Toute d'abord, **la taille des NP** conditionnerait leur mode d'entrée dans la cellule. Ainsi, la phagocytose serait principalement impliquée dans l'internalisation des particules de plus de 500 nm, et dans l'internalisation d'agrégats ou agglomérats de NP. Toutefois, il a été montré que des agrégats de NP de noir de carbone et de dioxyde de titane peuvent aussi être internalisés par macropinocytose (Singh *et al.,* 2007; Hussain *et al.,* 2009). Par ailleurs, la taille des NP orienterait vers un mécanisme d'endocytose dépendant de la voie des clathrines ou de la voie des cavéolines. Mais, les résultats publiés à ce jour dans ce domaine sont contradictoires. Certaines études montrent que les NP de petite taille (<200 nm) sont internalisées suivant la voie des clathrines alors que celles de plus grande taille entrent dans la cellule selon un processus dépendant de la voie des cavéolines (Rejman *et al.,* 2004). D'autres montrent au contraire qu'un petit diamètre (50-80 nm) oriente vers un processus d'internalisation médié par la voie des cavéolines et qu'un plus grand diamètre (120 nm) fait intervenir une entrée *via* les clathrines (Gratton *et al.,* 2008).

La charge de surface serait également un facteur important pour l'internalisation des NP dans la cellule. Il a été montré que des NP chargées positivement sont plus internalisées que des NP chargées négativement. En effet, la charge négative des membranes cellulaires favoriserait l'interaction des NP chargées positivement avec la cellule et ainsi leur endocytose (Mailander et Landfester, 2009). Plus précisément, la macropinocytose serait un mécanisme d'entrée important pour les NP chargées positivement (Dausend *et al.,* 2008). L'adsorption de protéines (du sérum) à la surface des NP, liée à la charge négative des NP par exemple, conduirait à une opsonisation et favoriserait par contre une entrée par phagocytose des NP dans la cellule (Dobrovolskaia et Mcneil, 2007).

La forme des NP pourrait aussi fortement influencer leur internalisation dans la cellule. Ainsi, Chithrani *et al.* ont rapporté que des NP d'or de forme sphérique sont beaucoup plus internalisées par les cellules HeLa que des NP d'or de forme allongée (Chithrani *et al.,* 2006).

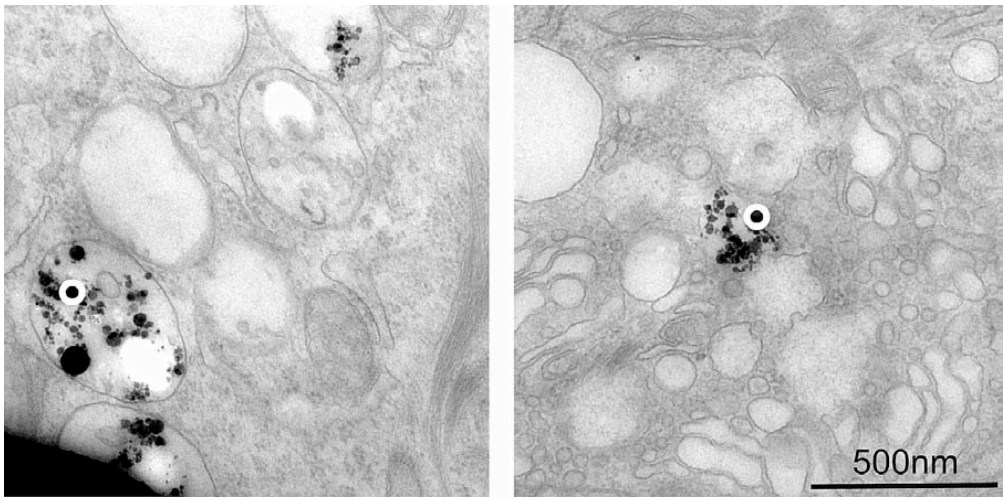


Figure 12. NP de dioxyde de titane à l'intérieur de cellules épithéliales alvéolaires A549. Les NP sont à l'intérieur de vésicules (gauche) ou sous forme libre dans le cytoplasme (droite) (d'après Rothen-Rutishauser *et al.,* 2007).

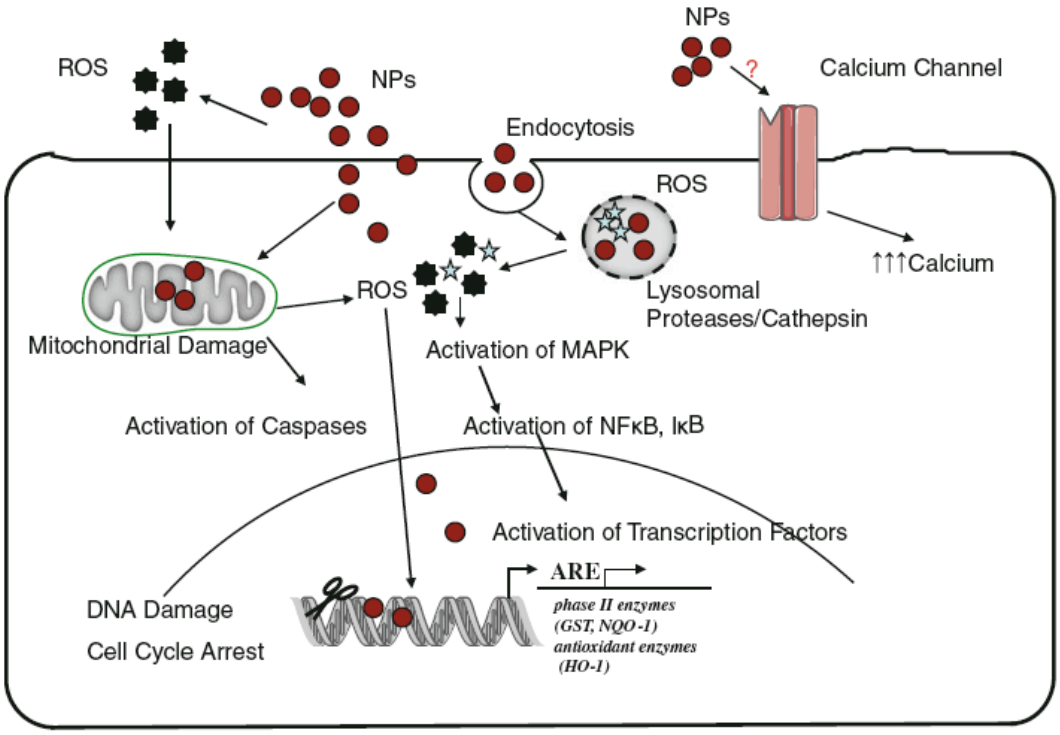


Figure 13. Implication du stress oxydant dans les réponses cellulaires induites par les NP comme l'inflammation ou les dommages à l'ADN (d'après Marano *et al.,* 2011).

Une fois internalisées, les NP pourraient avoir accès aux différents compartiments subcellulaires dont les mitochondries et le noyau, laissant suggérer une interaction directe possible entre les NP et la chaîne respiratoire mitochondriale ou l'ADN nucléaire. Ainsi, des NP d'oxyde de cuivre ont été observées dans les mitochondries et le noyau de cellules épithéliales en culture (Wang *et al.,* 2012). De même, des NP de fullerène ont été retrouvées dans le noyau de macrophages dérivés de monocytes humains en culture (Porter *et al.,* 2006). Un exemple de localisation intracellulaire des NP à l'intérieur de vésicules ou sous forme libre dans le cytoplasme de cellules épithéliales est montré à la **figure 12**.

C.I.2. Stress oxydant : un rôle central dans la toxicité des NP

De nombreuses études désignent le stress oxydant comme le mécanisme central en cause dans la survenue des effets toxiques des NP (Nel *et al.,* 2006; Li *et al.,* 2008). Du fait de leur réactivité chimique, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent interagir dans la cellule avec les lipides, les protéines ou encore l'ADN et être à l'origine des effets cytotoxiques des NP. Ainsi, le stress oxydant induit par les NP peut activer des voies de signalisation spécifiques incluant les MAP kinases et des facteurs de transcription sensibles au potentiel redox comme le facteur NF-κB, aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Le résultat de cette cascade de réaction est le déclenchement d'une **inflammation**, qui est un des effets majeurs de l'exposition aux NP. Le stress oxydant peut aussi provoquer des **dommages à l'ADN** pouvant induire un arrêt du cycle cellulaire, une **apoptose** ou encore une **génotoxicité** (**Figure 13**). Enfin, le stress oxydant peut également conduire à la mort de la cellule par **nécrose**.

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'ERO et leur dégradation par les systèmes antioxydants de l'organisme. Ce déséquilibre survient lors d'une augmentation de la production d'oxydants ou d'une diminution de l'activité des systèmes antioxydants. Ces systèmes antioxydants comprennent des systèmes de défense enzymatiques (la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase, l'hème oxygénase HO-1…) et des systèmes de défense non enzymatique (le glutathion, les vitamines C et E…). Les NP manufacturées seraient capables d'induire un stress oxydant par leur capacité à produire des ERO, de façon directe ou de façon indirecte après leur interaction avec des composants cellulaires (Nel *et al.,* 2006; Li *et al.,* 2008).

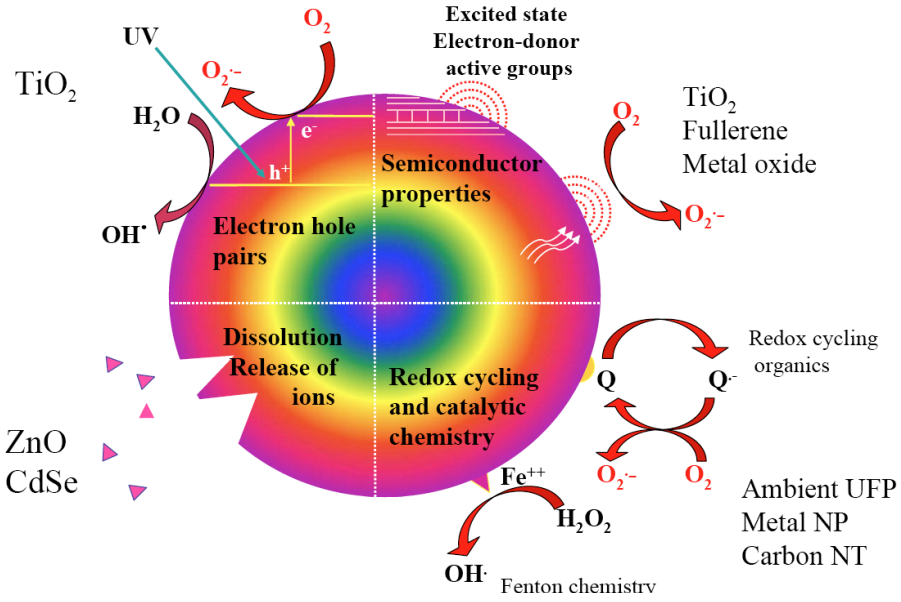


Figure 14. Propriétés de surface des NP responsables d'une génération d'espèces réactives de l'oxygène (d'après Li *et al.*, 2008).

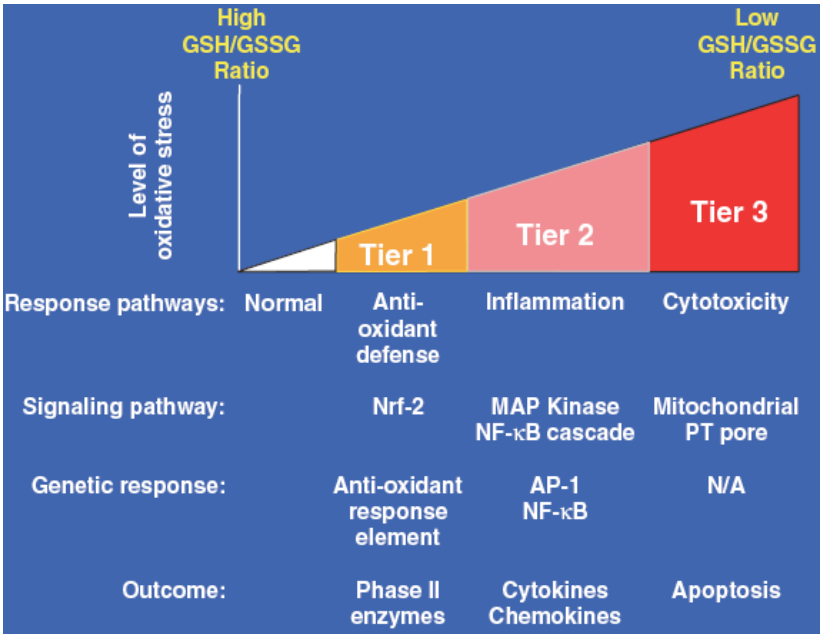


Figure 15. Théorie de la réponse hiérarchisée au stress oxydant (d'après Nel *et al.*, 2006).

Selon leurs propriétés de surface, les NP sont capables d'**engendrer la formation d'ERO de façon directe**, à l'instar des particules ultrafines de la pollution atmosphérique (Nel *et al.,* 2006). Les propriétés de surface responsables de cette génération d'ERO sont illustrées à la **figure 14**. Sous l'action des rayonnements ultraviolets, les NP de dioxyde de titane ont la capacité de produire des ERO comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et le radical hydroxyle $HO^{\cdot}$ (Figure 14, en haut à gauche). Dans un état d'énergie excité, des NP semi-conductrices comme les NP d'oxyde métallique ou les fullerènes pourraient aussi générer des ERO comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ (Figure 14, en haut à droite). La génération d'ERO peut aussi être catalysée par des ions métalliques libérés après dissolution de certaines NP (exemple : libération de Zn^{2+} après dissolution de NP d'oxyde de zinc ZnO) (Figure 14, en bas à gauche). Enfin, les NP manufacturées peuvent contenir une proportion variable d'impuretés rémanentes des procédés de synthèse, notamment des résidus de métaux comme le cobalt, le nickel, ou encore le fer. Ce paramètre est important à considérer, car les métaux de transition catalysent la formation d'ERO *via* la réaction de Fenton (Figure 14, en bas à droite).

La capacité de certaines NP manufacturées (noir de carbone, NTC, dioxyde de titane, silice…) à induire un **stress oxydant de façon indirecte** après interaction avec des composants de la cellule, a été montrée dans différentes études (Xia *et al.,* 2006; Sharma *et al.,* 2007; Park *et al.,* 2008; Hussain *et al.,* 2009). Comme nous l'avons vu précédemment, les NP, une fois internalisées, auraient accès aux différents compartiments subcellulaires. Une interaction avec les mitochondries peut aboutir à une perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale et à la production d'ERO. La production d'ERO peut aussi résulter de dommages vis-à-vis d'autres organites, comme les lysosomes riches en lipases, protéases et osidases.

L'ensemble de ces données est à l'origine de la théorie de la **réponse hiérarchisée au stress oxydant** définie par Nel *et al.* (2006). Selon cette théorie, différents types de réponse cellulaire seraient activés en fonction de l'importance du stress oxydant induit par les NP (**Figure 15**). À un faible niveau de stress oxydant (étape 1), la réponse antioxydante se met en place, médiée par le facteur de transcription Nrf2 capable, en se liant aux ARE (Anti-oxidant response element), d'activer l'expression et la synthèse d'enzymes de phase II et d'enzymes antioxydantes (NQO-1, GST, HO-1). À un niveau de stress oxydant intermédiaire (étape 2), l'inflammation peut être induite avec la production de cytokines et de chimiokines. Enfin, un stress oxydant élevé (étape 3) peut provoquer une détérioration des organites et de la membrane cellulaire aboutissant à la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose.

C.I.3. Inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme consécutif à une agression par des agents pathogènes, physiques ou chimiques. C'est un processus habituellement bénéfique dont le but est d'éliminer l'agent responsable de l'agression et de restaurer les tissus endommagés. Cependant, une réaction inflammatoire excessive ou persistante peut contribuer au développement de pathologies, dont des maladies respiratoires, comme l'asthme par exemple (voir partie D de l'introduction).

Un très grand nombre d'études ont rapporté que les NP manufacturées (NP de cobalt, de silice, d'oxyde de zinc, de dioxyde de titane, fullerènes, NTC…) sont capables de provoquer une réponse inflammatoire (Hussain *et al.,* 2012). Les effets pro-inflammatoires des NP seraient liés à leurs caractéristiques physico-chimiques. Ils seraient tout d'abord liés à leur **très petite taille**. Oberdörster *et al.* ont en effet rapporté les premiers, dans une étude menée par instillation intra-trachéale chez le rat, que les NP de dioxyde de titane (~30 nm) induisaient une réaction inflammatoire beaucoup plus importante que des particules de dioxyde de titane de même forme cristallographique mais de taille plus importante (~250 nm) (Oberdorster *et al.,* 1990).

La composition chimique des NP influencerait également le degré de la réponse inflammatoire induite. Des études ont ainsi comparé *in vitro* la réponse inflammatoire induite par des NP manufacturées de cobalt, de silice, de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc (Peters *et al.,* 2004; Gojova *et al.,* 2007). Les résultats de ces travaux ont permis de classer par ordre décroissant d'activité ces NP : NP de cobalt > NP de silice > NP de dioxyde de titane > NP d'oxyde de zinc.

La forme des NP (sphère, fibre, tube...) influencerait aussi leurs effets biologiques, dont leurs effets pro-inflammatoires. Ainsi, les particules sous forme de fibre seraient plus toxiques que les particules de forme sphérique. Dans une étude *in vitro* sur des macrophages alvéolaires de souris, il a été montré que des NP d'oxyde de titane sous forme de fibres longues (longueur = 15 – 30 µm) induisaient une réponse inflammatoire plus importante que des fibres courtes (longueur = 0,8 – 4 µm) ou des nanosphères (diamètre 60 – 200 nm) (Hamilton *et al.,* 2009).

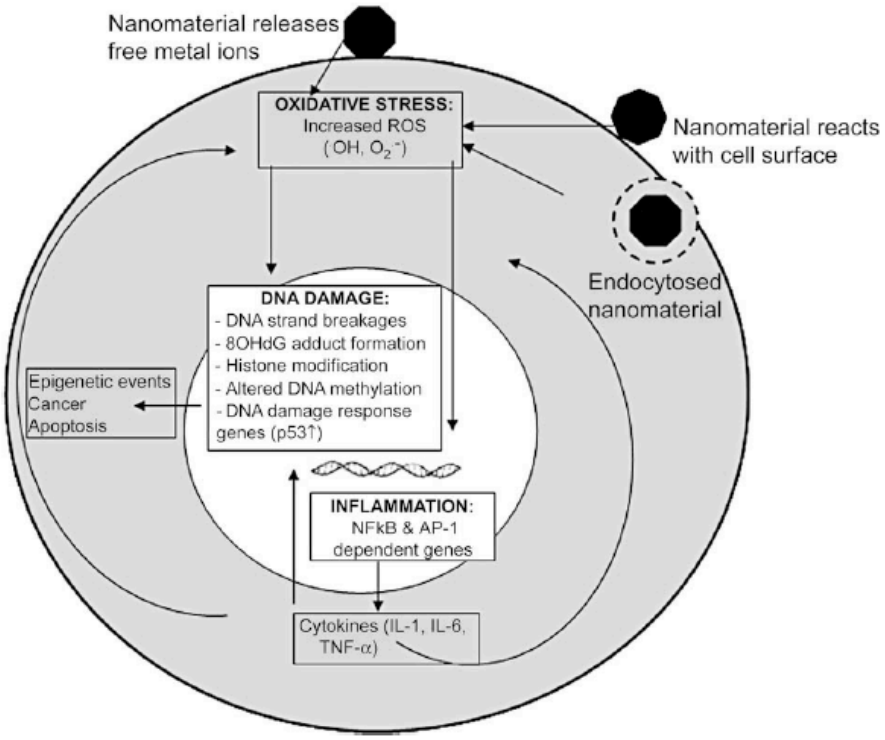


Figure 16. Mécanismes indirects (stress oxydant et inflammation) pouvant conduire à des dommages à l'ADN (d'après Singh *et al.,* 2009).

C.I.4. Génotoxicité

Le potentiel génotoxique des NP manufacturées a été évalué dans de nombreuses études, synthétisées dans la revue de Singh *et al.* (2009). Même si les résultats demeurent encore contradictoires, il apparaît que beaucoup NP sont capables de provoquer des fragmentations chromosomiques, des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles ou encore des adduits à l'ADN. Ces dommages à l'ADN feraient intervenir des mécanismes directs ou indirects.

Après internalisation, les NP pourraient atteindre le noyau, où une **interaction directe** avec l'ADN ou les protéines associées à l'ADN serait possible et pourrait conduire à des dommages du matériel génétique. Par exemple, il a été montré que des NP de silice peuvent entrer dans le noyau cellulaire et provoquer la formation d'agrégats de protéines intranucléaires, aboutissant à l'inhibition de la réplication, de la transcription et de la division cellulaire (Chen et von Mikecz, 2005).

Les NP pourraient également provoquer des dommages à l'ADN par des **mécanismes indirects**, c'est-à-dire sans interagir avec l'ADN. Ces mécanismes indirects sont présentés à la **figure 16**. Par exemple, une étude utilisant le test des comètes et des micronoyaux a montré que le stress oxydant entraînait des lésions oxydatives de l'ADN à l'origine des effets génotoxiques de NP de dioxyde de titane (Gurr *et al.,* 2005). De plus, bien que les liens entre inflammation et génotoxicité soient encore mal compris, l'inflammation induite par les NP pourrait également provoquer des lésions de l'ADN, des altérations de sa méthylation, ainsi qu'une inhibition de sa réparation (Singh *et al.,* 2009).

C.I.5. Mort cellulaire et prolifération

La capacité des NP manufacturées à induire une **mort cellulaire** a été rapportée dans de nombreuses études *in vitro* (Marano *et al.,* 2011). Selon certaines études, la mort cellulaire provoquée par les NP manufacturées serait induite par une **nécrose**. Cet effet a par exemple été rapporté sur des cellules exposées à des NP d'or (Pan *et al.,* 2009) ou des NTC (Tsukahara et Haniu, 2011). D'autres études ont rapporté une mort cellulaire induite par des **mécanismes d'apoptose.** Ces mécanismes ont par exemple été décrits sur des cellules épithéliales respiratoires exposées à des NP de carbone (Sydlik *et al.,* 2006), des NP de dioxyde de titane (Park *et al.,* 2008) ou des NTC (Ravichandran *et al.,* 2010). En outre, selon la nature chimique des NP manufacturées, différentes voies de signalisation conduisant à l'apoptose seraient impliquées. Hussain *et al.* ont ainsi montré sur des cellules épithéliales respiratoires, que les NP de noir de carbone induisent une apoptose impliquant les

mitochondries et le stress oxydant, alors que des NP de dioxyde de titane induisent une mort cellulaire par déstabilisation de la membrane lysosomale et peroxydation des lipides (Hussain *et al.,* 2010). De plus, Thibodeau *et al.* ont montré que les NP de silice induisent une apoptose des macrophages alvéolaires de souris par augmentation de la perméabilité lysosomale (Thibodeau *et al.,* 2004).

Les NP manufacturées pourraient également induire une **prolifération cellulaire**. En effet, il a été montré sur des cultures de fibroblastes, que l'exposition à des NP de dioxyde de titane, à des concentrations non cytotoxiques et pendant des temps longs (12 semaines), induit une augmentation de la croissance et de la prolifération cellulaire (Huang *et al.,* 2009). De même, des études ont montré sur des cultures épithéliales respiratoires, que les NP de noir de carbone sont capables d'induire une prolifération cellulaire (Tamaoki *et al.,* 2004; Sydlik *et al.,* 2006). Ces effets sur la prolifération cellulaire pourraient conférer aux NP un potentiel pro-fibrotique et pro-tumorigène.

C.II. État des connaissances sur la toxicité respiratoire des NTC bruts

Ce deuxième sous-chapitre fait le bilan des données actuelles sur les effets toxicologiques qui pourraient résulter d'une inhalation de NTC, en s'attardant plus particulièrement sur la réponse inflammatoire, le stress oxydant, la formation de granulomes et la réponse fibrotique. Ces données sont issues d'études *in vitro* et *in vivo* et portent exclusivement sur les NTC bruts, qu'ils soient de type SWCNT ou MWCNT. La toxicité des NTC fonctionnalisés sera abordée plus loin, dans la partie « Facteurs influençant la toxicité respiratoire des NTC ».

C.II.1 Réponse inflammatoire

De très nombreuses études ont rapporté la survenue d'une réaction inflammatoire dans les voies respiratoires d'animaux exposés à des NTC. La majorité de ces études a été menée chez le rat ou la souris après l'**administration unique** de NTC à des doses allant de 10 µg de SWCNT (Shvedova *et al.,* 2005) à 5 mg de MWCNT (Muller *et al.,* 2005). Quelques travaux ont également évalué l'effet pro-inflammatoire des NTC suite à des administrations répétées par inhalation (Shvedova *et al.,* 2008b; Ma-Hock *et al.,* 2009; Ravichandran *et al.,* 2011) ou par voie oropharyngée (Teeguarden *et al.,* 2011).

Dans la plupart de ces études, la **réponse inflammatoire pulmonaire** induite par les NTC s'est traduite par une augmentation du nombre total de cellules dans les LBA, résultant principalement d'une augmentation des macrophages et des neutrophiles (Muller *et al.,* 2005; Shvedova *et al.,* 2005; Elgrabli *et al.,* 2007; Erdely *et al.,* 2009; Han *et al.,* 2010; Teeguarden *et al.,* 2011; Wang *et al.,* 2011b). Cet infiltrat cellulaire était associé à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment de TNF-α, d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8 (Muller *et al.,* 2005; Shvedova *et al.,* 2005; Shvedova *et al.,* 2008b; Erdely *et al.,* 2009; Han *et al.,* 2010; Park *et al.,* 2011; Wang *et al.,* 2011b), ainsi qu'à une augmentation de marqueurs de cytotoxicité comme la LDH ou la concentration en protéines totales (Muller *et al.,* 2005; Shvedova *et al.,* 2005; Han *et al.,* 2010; Kobayashi *et al.,* 2010; Ravichandran *et al.,* 2011; Fenoglio *et al.,* 2012). De plus, il a été montré que la réponse inflammatoire pulmonaire induite par les NTC était **dose-dépendante** (Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009; Aiso *et al.,* 2010; Porter *et al.,* 2010). Toutefois, certains travaux publiés dans la littérature n'ont pas observé de réaction inflammatoire significative suite à l'exposition de souris ou de rats aux NTC (Mangum *et al.,* 2006; Mitchell *et al.,* 2007; Elgrabli *et al.,* 2008a; Mutlu *et al.,* 2010; Morimoto *et al.,* 2011).

Concernant les **mécanismes impliqués** dans la survenue de cette inflammation, des études *in vitro* ont montré que les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, ainsi que les macrophages alvéolaires, qui sont des cellules cibles potentielles des NTC, produisaient de nombreux médiateurs pro-inflammatoires en réponse aux NTC. Ainsi, une augmentation de l'expression ou de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 ou l'IL-8, a été rapportée dans des études portant sur des cellules épithéliales d'origine respiratoire exposées aux SWCNT (Davoren *et al.,* 2007) ou aux MWCNT (Ye *et al.,* 2009; Hirano *et al.,* 2010; Tsukahara et Haniu, 2011). De même, une augmentation du TNF-α (Muller *et al.,* 2005; Sato *et al.,* 2005; Brown *et al.,* 2007), mais également de l'IL-1β, de l'IL-6 et de MCP-1 (He *et al.,* 2011) a été observée dans des cultures de macrophages exposées aux MWCNT.

Une pré-exposition aux NTC pourrait amplifier la réaction inflammatoire pulmonaire induite par une **infection bactérienne**. Dans une étude menée chez la souris exposée à une dose unique de SWCNT (10 ou 40 µg) suivie 3 jours plus tard d'une exposition à *Listeria monocytogenes* (10^3 bactéries), il a été montré que l'infiltrat cellulaire et les taux d'IL-6 et de KC étaient plus importants chez les animaux qui avaient été pré-exposés aux SWCNT par rapport aux animaux exposés à *Listeria monocytogenes* seul (Shvedova *et al.,* 2008a). Cette réponse inflammatoire accrue était associée à une diminution de la clairance bactérienne par les macrophages.

Enfin, la toxicité respiratoire des NTC pourrait s'ajouter à celle induite par **des polluants chimiques**. Ainsi, Li *et al.* ont montré qu'une co-exposition aux MWCNT et au benzène par voie intra-trachéale chez la souris entraînait une toxicité pulmonaire aiguë plus importante (augmentation de la LDH, des protéines totales et des lésions pathologiques) comparée à une exposition aux MWCNT seuls (Li *et al.,* 2010). Le benzène seul induisait très peu d'effet. Toutefois, Han *et al.* n'ont pas montré d'effet additif ou synergique chez la souris lors d'une exposition aux MWCNT (20 µg) suivie 12 heures après d'une exposition à l'ozone (0,5 ppm) (Han *et al.,* 2008b). Les auteurs n'ont en effet pas mis en évidence d'augmentation de marqueurs de l'inflammation (infiltrat cellulaire, l'IL-1β, TNF-α) et de marqueurs de toxicité (LDH, protéines totales) chez les animaux exposés à la combinaison MWCNT/ozone par rapport aux animaux exposés aux MWCNT ou à l'ozone seuls.

C.II.2. Stress oxydant

Plusieurs études *in vivo* ont montré que les NTC sont capables d'induire un **stress oxydant** après leur administration par voie respiratoire. Ainsi, il a été montré qu'une exposition répétée par inhalation à des SWCNT (5 mg/m^3, 5 heures, 4 jours, correspondant à une dose déposée dans le poumon de 5 µg) induit un stress oxydant dans le poumon de souris (Shvedova *et al.,* 2008b). Dans cette étude, le stress oxydant a été mis en évidence par une diminution du glutathion réduit et du taux des protéines thiolées, ainsi que par une augmentation des produits de peroxydation des lipides et des protéines carbonylées. Ce stress oxydant apparaissait un jour après la fin de l'exposition et se maintenait jusqu'à 28 jours après l'arrêt de l'exposition. Une autre étude menée chez la souris a également montré que l'inhalation répétée de SWCNT ou de MWCNT (20 minutes/jour pendant 7 jours, correspondant à une dose de à 5 µg/g) provoquait la survenue d'un stress oxydant, qui était caractérisé par une augmentation de la myéloperoxydase (MPO), des ERO et des produits de peroxydation des lipides, ainsi que par une diminution du glutathion réduit et de l'activité de la catalase dans le poumon, un jour après la fin de l'exposition (Ravichandran *et al.,* 2011).

Cependant, d'autres auteurs n'ont pas observé de stress oxydant significatif suite à l'exposition aux NTC. Ainsi, Crouzier *et al.* ont rapporté que des MWCNT administrés par voie intra-nasale chez la souris provoquaient une réaction inflammatoire pulmonaire, mais n'induisaient pas de production d'ERO dans les poumons des animaux, 6 à 48 heures après l'exposition (Crouzier *et al.,* 2010).

Les cellules épithéliales et les macrophages seraient impliqués dans la survenue d'un stress oxydant après inhalation de NTC. En effet, de nombreuses études *in vitro* ont montré que les SWCNT et les MWCNT sont capables d'induire la production d'ERO dans des cellules épithéliales respiratoires (Pulskamp *et al.,* 2007; Herzog *et al.,* 2009; Yang *et al.,* 2009; Ye *et al.,* 2009; He *et al.,* 2011; Thurnherr *et al.,* 2011), ainsi que dans des cultures de macrophages (Muller *et al.,* 2005; Kagan *et al.,* 2006; Brown *et al.,* 2007; Fenoglio *et al.,* 2012). Comme nous l'avons vu précédemment, le stress oxydant induit par les NTC pourrait activer des voies de signalisation spécifiques incluant les voies des MAP kinases et des facteurs de transcription sensibles au potentiel redox comme le NF-κB, aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. En accord avec cette hypothèse, l'activation de ces voies de signalisation a été démontrée dans des cellules épithéliales respiratoires (Hirano *et al.,* 2010; Ravichandran *et al.,* 2010) et des macrophages (He *et al.,* 2011) exposés aux MWCNT.

C.II.3. Formation de granulomes

Un autre aspect de la toxicité respiratoire des NTC serait la **formation de granulomes.** Les granulomes sont des structures anatomopathologiques constituées d'un amas de cellules immunitaires au niveau du parenchyme pulmonaire et généralement dus à une réaction localisée face à la présence d'un élément étranger. De nombreuses études ont ainsi rapporté la formation de granulomes chez la souris ou chez le rat suite à l'exposition unique à des SWCNT (Lam *et al.,* 2004; Warheit *et al.,* 2004; Shvedova *et al.,* 2005; Chou *et al.,* 2008; Mercer *et al.,* 2008) ou à des MWCNT (Aiso *et al.,* 2010; Kim *et al.,* 2010; Porter *et al.,* 2010), ou suite à l'exposition répétée à des SWCNT (Teeguarden *et al.,* 2011) ou à des MWCNT (Ma-Hock *et al.,* 2009).

Ces granulomes ont été décrits pour des doses de NTC allant de 10 µg de MWCNT chez la souris (Porter *et al.,* 2010) à 1,25 mg de SWCNT chez le rat (Warheit *et al.,* 2004). Même si une étude répétée par inhalation menée chez le rat a montré que la formation de granulomes était dose-dépendante (Ma-Hock *et al.,* 2009), la plupart des études ont au contraire rapporté que la formation de granulomes n'était **pas dose-dépendante** et que les granulomes étaient souvent associés aux sites de dépôts des agrégats de NTC (Warheit *et al.,* 2004; Shvedova *et al.,* 2005).

Par ailleurs, il a été montré que les granulomes apparaissaient rapidement, dès 7 jours après l'administration de NTC (Lam *et al.,* 2004; Shvedova *et al.,* 2005; Mercer *et al.,* 2008; Porter *et al.,* 2010) et qu'il y avait une **persistance** de ces structures au cours du temps. Par exemple, Lam *et al.* ont observé une persistance des granulomes dans le poumon des souris jusqu'à 3 mois après une exposition unique aux SWCNT (Lam *et al.,* 2004). De plus, une autre étude menée chez le rat a montré que le nombre et la sévérité de ces granulomes pouvaient augmenter au cours du temps (Aiso *et al.,* 2010). Enfin, la formation et la persistance des granulomes dans le poumon pourraient être associées à d'autres dommages, comme la survenue d'une fibrose pulmonaire (Mercer *et al.,* 2008; Aiso *et al.,* 2010; Porter *et al.,* 2010; Teeguarden *et al.,* 2011).

C.II.4. Réponse fibrotique

Associée ou non à des granulomes, il semblerait qu'une **fibrose pulmonaire** puisse se développer chez le rat ou la souris en réponse à une administration unique (Muller *et al.,* 2005; Shvedova *et al.,* 2005; Mangum *et al.,* 2006; Porter *et al.,* 2010; Mercer *et al.,* 2011; Park *et al.,* 2011; Wang *et al.,* 2011a; Wang *et al.,* 2011b) ou à des administrations répétées de NTC (Shvedova *et al.,* 2008b).

Cette fibrose pulmonaire surviendrait **rapidement** après l'exposition aux NTC. En effet, une augmentation du taux de collagène et l'apparition de lésions fibrotiques dans les poumons de souris ont respectivement été mises en évidence dès 7 jours après l'administration unique de 100 µg/kg de SWCNT (Park *et al.,* 2011) ou de 10 µg de MWCNT (Porter *et al.,* 2010). De même, plusieurs études ont rapporté une augmentation du taux de facteurs pro-fibrotiques comme le TGF-β1 ou le PDGF dès un jour après l'administration de SWCNT chez le rat (Mangum *et al.,* 2006) ou la souris (Shvedova *et al.,* 2008b; Park *et al.,* 2011).

La réponse fibrotique induite par les NTC pourrait également se développer de façon **progressive**. En effet, il a été montré chez la souris, que l'administration unique de 80 µg de MWCNT induisait une réaction fibrotique augmentant au cours du temps, avec une augmentation du dépôt de collagène dans les poumons entre les 28ème et 56ème jours suivant l'exposition (Mercer *et al.,* 2011).

Par ailleurs, une étude menée chez le rat a montré qu'une **inflammation pulmonaire pré-existante** pouvait augmenter la réaction fibrotique induite par les MWCNT (Cesta *et al.,* 2010). Dans cette étude, les animaux ont reçu une dose de 2,5 mg/kg de lipopolysaccharide (LPS) qui est une endotoxine et un composant de la paroi bactérienne, suivie 24 heures après d'une dose de 4 mg/kg de MWCNT. Les auteurs ont montré l'apparition d'une fibrose à 21 jours, ainsi qu'une augmentation de la production de PDGF-AA à 1 jour, plus importantes chez les animaux exposés à l'association LPS/MWCNT par rapport aux animaux exposés aux MWCNT seuls. Le LPS seul n'avait pas d'effet fibrotique.

C.II.5. Génotoxicité et mésothéliome

C.II.5.1. Génotoxicité

Des études *in vivo* et *in vitro* ont suggéré une **génotoxicité** potentielle des NTC. *In vivo*, la formation de micronoyaux (Muller *et al.,* 2008b) ainsi que des aberrations chromosomiques (Muller *et al.,* 2008a) ont été mises en évidence dans des pneumocytes de rat 3 jours après l'injection intra-trachéale de MWCNT. Des dommages à l'ADN ont été retrouvés dans les cellules de LBA de souris exposées à des SWCNT par instillation ou inhalation (Jacobsen *et al.,* 2009). Enfin, des mutations du gène K-*ras* ont été rapportées dans les poumons de souris exposées à des SWCNT par inhalation (Shvedova *et al.,* 2008b).

In vitro, la formation de micronoyaux a été mise en évidence dans des cultures de cellules épithéliales pulmonaires exposées aux MWCNT (Muller *et al.,* 2008b) ou aux SWCNT (Lindberg *et al.,* 2009). Des dommages à l'ADN ont également été observés sur des cellules épithéliales pulmonaires exposées à des SWCNT (Sargent *et al.,* 2009) ou des MWCNT (Karlsson *et al.,* 2008). De même, Pacurari *et al.* ont observé des dommages à l'ADN associés à un stress oxydant sur des cellules mésothéliales humaines exposées aux SWCNT (Pacurari *et al.,* 2008). Cependant, d'autres auteurs n'ont pas observé d'effet génotoxique significatif induit par les SWCNT (Kisin *et al.,* 2007) ou les MWCNT (Di Sotto *et al.,* 2009; Wirnitzer *et al.,* 2009) sur des fibroblastes ou par les SWCNT sur des cellules épithéliales pulmonaires (Jacobsen *et al.,* 2008).

C.II.5.2. Mésothéliome

Les NTC présentant une structure fibrillaire, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle leur toxicité puisse être comparable à celle de l'amiante et puisse résulter notamment en l'apparition d'un **mésothéliome** (Donaldson *et al.,* 2010).

Plusieurs études ont donc examiné les effets des NTC après leur injection dans la **cavité péritonéale.** En effet, la cavité péritonéale constitue un modèle pour étudier les effets des fibres dans la cavité pleurale, car ces deux cavités sont recouvertes d'un mésothélium (tissu constitué de cellules mésothéliales qui tapissent la surface des cavités séreuses). Ainsi, Poland *et al.* ont montré, suite à une injection intra-péritonéale de 50 µg/souris de fibres d'amiante ou de MWCNT de différentes longueurs, que les fibres de MWCNT de longueur comprise entre 13 et 56 µm induisaient des effets équivalents à ceux des longues fibres d'amiante (Poland *et al.,* 2008). Les souris présentaient dans les deux cas une augmentation

des cellules pro-inflammatoires à 24 heures et une formation de granulomes à 7 jours. De même, dans leurs travaux, Takagi *et al.* ont injecté 3 mg de MWCNT ou d'amiante dans la cavité péritonéale de souris $p53^{+/-}$ (portant une mutation du gène p53 suppresseur de tumeur) et ont observé la formation de lésions cancéreuses et l'apparition d'un mésothéliome après 25 semaines (Takagi *et al.,* 2008). Sakamoto *et al.* ont également rapporté l'apparition d'un mésothéliome après 40 semaines chez des rats ayant reçu une dose unique (1mg/kg) de MWCNT par voie intra péritonéale (Sakamoto *et al.,* 2009). Bien qu'intéressants, les résultats de ces études, notamment celle de Tagaki, ont été très discutés. En effet, les NTC se trouvant sous forme de gros agglomérats et les doses injectées étant très élevées, certains auteurs se sont demandé si les NTC inhalés auraient eu la capacité d'atteindre la plèvre et à des concentrations suffisantes pour y induire un effet comparable (Donaldson *et al.,* 2008). De plus, Muller *et al.* ont injecté 2 ou 20 mg de MWCNT dans la cavité péritonéale de rats et n'ont pas observé l'apparition d'un mésothéliome ou d'autres cancers après 2 ans chez ces animaux, alors que 35% des animaux qui avaient reçu des fibres d'amiante (2 mg) avaient développé un cancer (Muller *et al.,* 2009).

Une étude a récemment examiné les effets des NTC après leur injection dans la **cavité pleurale** (Murphy *et al.,* 2011). Les auteurs ont injecté 5 µg de MWCNT de différentes longueurs dans la cavité pleurale de souris et ont montré que les MWCNT de longue taille (13 à 56 µm) provoquaient une inflammation aiguë pouvant conduire à une fibrose au niveau de la cavité pleurale pariétale, alors que les MWCNT courts (0,5 à 5 µm) n'induisaient pas ces effets. D'après les auteurs, une fraction des particules déposées dans le poumon pourrait traverser la plèvre (la pénétration des NTC dans les cavités pleurales a en outre été rapportée par d'autres auteurs, voir Partie B.II.3.2 de l'Introduction). Les fibres courtes pourraient ensuite être éliminées *via* le système lymphatique, alors que les fibres longues seraient retenues dans la cavité pleurale pariétale. La rétention des fibres dans la cavité pleurale pourrait alors provoquer une inflammation à l'origine de pathologies pleurales, dont la fibrose et le mésothéliome.

C.II.6. Effets sur le système cardiovasculaire

La translocation et la distribution des NTC dans l'ensemble de l'organisme pourraient jouer un rôle dans le développement de certaines **pathologies cardiaques**. Il a été observé que l'exposition de souris à des SWCNT par aspiration pharyngée (dose unique de 10 et 40 µg) entraînait des altérations de l'ADN mitochondrial au niveau de l'aorte après 7, 28 et 60 jours (Li *et al.,* 2007). Les effets observés au niveau de l'aorte des souris pourraient être un effet direct des NTC se retrouvant dans la circulation systémique ou un effet indirect de l'inflammation des poumons. De même, il a été montré que l'administration par voie intra-trachéale de SWCNT (0,6 mg, dose répétée 2 jours de suite) chez le rat hypertendu augmenterait le niveau d'endothéline-1 dans les LBA, ainsi que le niveau de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I dans le plasma (deux marqueurs à activité vasoconstrictrice), suggérant un dysfonctionnement de l'endothélium dans la circulation pulmonaire et une thrombose vasculaire périphérique (Ge *et al.,* 2011). De plus, dans une étude menée chez le rat, il a été observé que l'administration par voie intra-trachéale de SWCNT entraînerait une diminution de la fonction artérielle des baroréflexes, suggérant une altération de la régulation autonome cardiovasculaire (Legramante *et al.,* 2009).

L'exposition aux NTC pourrait également accélérer la progression de l'**athérosclérose**. En effet, il a été montré chez des souris ApoE-/- ayant un taux élevé de cholestérol, que l'exposition par instillation pharyngée à des SWCNT (20 µg toutes les 2 semaines pendant 8 semaines) provoquait une augmentation du pourcentage de la surface de l'aorte recouverte de plaques d'athérosclérose, ainsi qu'une augmentation des lésions athérosclérotiques (Li *et al.,* 2007).

L'ensemble de ces données suggèrent, non sans contradiction, une toxicité respiratoire des NTC, caractérisée par la survenue d'une réponse inflammatoire, d'un stress oxydant, de la formation de granulomes et d'une réponse fibrotique.

C.III. Facteurs influençant la toxicité respiratoire des NTC

C.III.1. Caractéristiques physiques des NTC

Quelques études ont comparé la toxicité respiratoire des SWCNT à celle des MWCNT. Bien que ces études laissent penser que **le nombre de parois** des NTC puisse jouer un rôle dans leur toxicité, les résultats rapportés sont contradictoires. En effet, selon certains travaux menés *in vitro* sur des macrophages alvéolaires ou des cellules épithéliales respiratoires, les SWCNT seraient plus toxiques que les MWCNT (Jia *et al.,* 2005; Pulskamp *et al.,* 2007). À l'inverse, une étude *in vitro* sur des macrophages a rapporté que les MWCNT étaient plus toxiques que les SWCNT (Bussy *et al.,* 2008) et une étude *in vivo* a également montré que les MWCNT induisaient une réponse inflammatoire plus importante que les SWCNT après leur administration par voie oropharyngée chez le rat (Erdely *et al.,* 2009).

La longueur des NTC pourrait aussi influencer leur toxicité. Ainsi, *in vitro* sur des macrophages humains, Sato *et al.* ont trouvé que les MWCNT« longs » (825 nm) avaient un effet pro-inflammatoire plus important que les MWCNT « courts » (220 nm) (Sato *et al.,* 2005). De même, *in vivo* chez la souris, Poland *et al.* ont montré, suite à une injection intra-péritonéale de MWCNT de différentes longueurs, que seuls les NTC les plus longs (15 à 50 µm vs 1 à 15 µm) induisaient une augmentation des cellules inflammatoires et la formation de granulomes (Poland *et al.,* 2008). Au contraire, Muller *et al.* ont montré que les MWCNT broyés (longueur moyenne de 0,7 µm) induisaient une réaction inflammatoire plus forte que les MWCNT non broyés (longueur moyenne de 5,9 µm) après leur administration par voie intra-trachéale chez le rat (Muller *et al.,* 2005).

Le diamètre des NTC pourrait aussi jouer un rôle dans leur toxicité, même si les résultats de la littérature sont là encore contradictoires. Il a par exemple été montré sur des macrophages alvéolaires de cochon d'inde, que les MWCNT de diamètre important (40 à 100 nm) étaient plus toxiques que les MWCNT de plus petit diamètre (10 à 20 nm) (Wang *et al.,* 2009). À l'inverse, Fenoglio *et al.* ont rapporté *in vitro* sur des macrophages alvéolaires murins et *in vivo* après leur administration par voie oropharyngée chez le rat, que les MWCNT de petit diamètre (9,4 nm) étaient plus toxiques que les MWCNT de plus grand diamètre (70 nm) (Fenoglio *et al.,* 2012).

C.III.2. Caractéristiques chimiques des NTC

C.III.2.1. Pureté des NTC

Les NTC contiennent une proportion variable d'impuretés rémanentes des procédés de synthèse, notamment des **résidus de métaux** comme le cobalt, le fer ou le nickel. Une partie de la toxicité des NTC pourrait être liée à la présence de ces contaminants, qui interviennent, comme nous l'avons vu précédemment dans la formation d'ERO. Ainsi, il a été démontré, sur des kératinocytes humains (Shvedova *et al.,* 2003) et des macrophages alvéolaires de souris (Kagan *et al.,* 2006), que la cytotoxicité des SWCNT était corrélée à la quantité de fer présente dans ces nanomatériaux. Toutefois, d'autres études ont montré à l'inverse que les résidus catalytiques n'avaient pas de rôle significatif dans la toxicité des NTC. Par exemple, après instillation intra-trachéale chez le rat de SWCNT bruts ou purifiés (sans résidus métalliques), Lam *et al.* ont observé l'apparition de granulomes pour les deux types de particules, quelque soit le degré de pureté (Lam *et al.*, 2004). De même, Wick *et al.* n'ont pas montré de rôle significatif d'impuretés comme le nickel ou l'yttrium dans la cytotoxicité des SWCNT *in vitro* (Wick *et al.,* 2007). Les méthodes de purification des NTC utilisées dans certaines de ces études peuvent expliquer en partie ces résultats contradictoires. En effet, la purification par lavage ou ultrasonication en présence d'acide peut induire des défauts ou des modifications de la surface des NTC, avec l'introduction de groupes fonctionnalisés qui peuvent modifier les propriétés biologiques de ces NP. Le processus de purification peut aussi casser les NTC en des particules plus courtes.

C.III.2.2. Fonctionnalisation des NTC

Si l'on sait que les modifications chimiques apportées aux NTC peuvent considérablement changer leurs propriétés (solubilité, dispersion, agrégation), l'influence de ces modifications sur les effets toxiques des NTC n'est pas clairement établie. Ce paragraphe s'intéressera donc à l'influence, d'une part, de la **fonctionnalisation covalente** des NTC (introduction de groupements chimiques -OH, -COOH, -NH2), et d'autre part, du **revêtement de surface** des NTC (fonctionnalisation non covalente).

Selon certains auteurs, **la fonctionnalisation covalente des NTC permet de diminuer leurs toxicité** (Lacerda *et al.,* 2006). Par exemple, il a été montré sur des fibroblastes humains en culture que la cytotoxicité des SWCNT diminuait quand la densité de fonctionnalisation (groupements phényl-SO3 et phényl-COOH) augmentait (Sayes *et al.,* 2006). Ali-Boucetta *et al.* ont également rapporté que des MWCNT-NH_2 étaient moins

cytotoxiques que des MWCNT bruts, tout en étant plus internalisés dans des cellules épithéliales respiratoires (Ali-Boucetta *et al.,* 2011).

D'un autre côté, des études suggèrent au contraire que l**es NTC fonctionnalisés de façon covalente ne seraient pas dénués de toxicité** et qu'ils pourraient même être plus toxiques que les NTC bruts. Ainsi, des études *in vitro* sur des macrophages ou des cellules épithéliales respiratoires ont montré que des SWCNT ou des MWCNT fonctionnalisés par des fonctions acides ou amines induisent une cytotoxicité (Coccini *et al.,* 2010; Dong *et al.,* 2012) ou un effet pro-inflammatoire (Zhang *et al.,* 2012) plus importants que des NTC bruts. Par ailleurs, Ursini *et al.* ont suggéré que les mécanismes impliqués dans la cytotoxicité des NTC bruts ou des NTC fonctionnalisés sont différents (Ursini *et al.,* 2012). Dans cette étude, il a en effet été montré que les MWCNT bruts induisent une mort cellulaire par nécrose, alors que les MWCNT fonctionnalisés par une fonction hydroxyle induisent une mort cellulaire par apoptose. D'après les auteurs, ces différences seraient liées à des mécanismes d'internalisation différents entre les deux types de NTC. Enfin, des études de toxicité respiratoire menées chez le rat ou la souris ont également montré que des SWCNT ou des MWCNT fonctionnalisés par des fonctions acides ou amines étaient aussi toxiques (Roda *et al.,* 2011) voire plus toxiques (Saxena *et al.,* 2007; Tong *et al.,* 2009) que des NTC bruts.

Le **revêtement de surface** des NTC serait également un paramètre pouvant modifier la toxicité des NTC. Par exemple, la toxicité de MWCNT bruts, de MWCNT enrobés avec un polymère de polyacide carboxylique (50%/50%) ou de MWCNT enrobés avec un polymère de polystyrène (50%/50%), a été étudiée *in vitro* sur des macrophages de souris et *in vivo* après leur administration par voie intra-trachéale chez la souris (Tabet *et al.,* 2011). Les auteurs ont montré que si l'enrobage avec le polymère acide augmentait les effets toxiques des NTC (cytotoxicité, stress oxydant et réponse inflammatoire), l'enrobage avec le polymère de polystyrène diminuait leur toxicité.

C.III.3. État d'agrégation des NTC

Les NTC à l'état brut sont des particules hydrophobes qui ont tendance à s'agréger du fait des forces de Van der Waals. Les agrégats formés ont une taille considérablement plus grande (dimension micrométrique) que les NTC dont ils sont formés. Une question non résolue à l'heure actuelle est l'incidence de ces agrégats sur la réponse biologique des NTC.

Certains résultats laissent supposer que **la formation d'agrégats de NTC serait responsable de la toxicité de ces NP.** Par exemple, la signification toxicologique des

granulomes observés chez les animaux exposés aux NTC a été questionnée, étant donné que la formation de ces granulomes n'était pas dose-dépendante et qu'elle était associée aux sites de dépôt des agrégats de NTC (Warheit *et al.,* 2004; Shvedova *et al.,* 2005). De plus, Mutlu *et al.* ont rapporté que seuls les SWCNT non dispersés induisaient une réponse fibrotique et la formation de granulomes dans le poumon de souris après leur administration par voie intra-trachéale, comparé aux SWCNT dispersés en présence d'un agent dispersant, le Pluronic® (Mutlu *et al.,* 2010).

D'autres auteurs estiment au contraire que **les NTC dispersés sont plus toxiques que les NTC sous forme agrégée**. Ainsi, Mercer *et al.* ont rapporté que les SWCNT dispersés étaient rapidement incorporés dans l'interstitium alvéolaire et qu'ils y induisaient une augmentation du dépôt de collagène plus importante que des objets moins dispersés (Mercer *et al.,* 2008). Les mêmes auteurs ont également suggéré que les MWCNT dispersés pourraient traverser la plèvre après administration oro-pharyngée chez la souris (Mercer *et al.,* 2010). De même, Muller *et al.* ont comparé la toxicité respiratoire de MWCNT broyés et non broyés chez le rat (Muller *et al.,* 2005). Ils ont montré que les MWCNT non broyés s'accumulaient sous la forme de larges agglomérats dans les voies respiratoires principales, alors que les MWCNT broyés se déposaient dans le parenchyme pulmonaire et induisaient une inflammation plus importante. En outre, l'existence d'une fibrose interstitielle a été observée dans les régions du poumon qui n'affichaient pas d'agrégats de SWCNT, suggérant que cette fibrose était la conséquence des SWCNT dispersés (Shvedova *et al.,* 2005). Enfin, Wang *et al.* ont montré *in vitro* sur des macrophages et des cellules épithéliales respiratoires, ainsi qu'*in vivo* chez la souris après leur administration par voir oro-pharyngée, que les MWCNT dispersés induisaient une réponse fibrotique plus importante que les MWCNT moins bien dispersés (Wang *et al.,* 2011a). **Ainsi, l'état de dispersion des NTC pourrait influencer leur dépôt et leurs effets biologiques dans le poumon.**

Ainsi les données, parfois contradictoires, relatives à la toxicité respiratoire des NTC laissent supposer une variabilité liée aux caractéristiques physico-chimiques des NTC, mais également aux conditions expérimentales des études (état de dispersion des NTC par exemple).

Partie D – Impact des NTC sur l'asthme allergique

D.I. Rappels sur l'asthme allergique

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires, caractérisée par des épisodes récurrents de dyspnées, de sifflements, d'oppression thoracique et de toux, survenant notamment la nuit et en début de matinée. Ces symptômes, couramment appelés « crise d'asthme », sont associés à une obstruction des voies aériennes, qui est souvent réversible de manière spontanée ou après traitement, et à une hyperréactivité bronchique, qui constitue une contraction exagérée des bronches suite à un stimulus (Bousquet *et al.,* 2000). Parmi les formes d'asthme, l'asthme allergique résulte, à l'instar des autres pathologies allergiques (comme la dermatite atopique, la rhinite allergique ou encore les allergies alimentaires), d'une réponse immunitaire exagérée de l'organisme contre des allergènes communs se traduisant par la synthèse d'immunoglobulines IgE spécifiques de l'antigène en cause.

La prévalence des pathologies allergiques et de l'asthme a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, en particulier dans les pays industrialisés, et l'asthme représente désormais un problème majeur de santé publique. Ainsi, selon l'Organisation mondiale de la santé, environ 300 millions de personnes dans le monde seraient asthmatiques et l'asthme constituerait la maladie chronique la plus fréquente chez les enfants (Eder *et al.,* 2006). En France, les dernières enquêtes de santé estiment à 3,5 millions le nombre de personnes asthmatiques, avec une prévalence de plus de 10% chez l'enfant et de 6 à 7% chez l'adulte (Delmas *et al.,* 2010).

Les causes pouvant expliquer l'augmentation de la prévalence de l'asthme sont complexes. En effet, l'asthme est une pathologie multifactorielle qui résulte d'une interaction entre des facteurs génétiques (plus de 100 gènes seraient impliqués) et des facteurs environnementaux (Holgate *et al.,* 2007). Ainsi, chez des individus présentant une susceptibilité génétique, l'exposition à certains stimuli environnementaux comme les allergènes (acariens, pollens...), les infections (en particulier les virus) ou encore la pollution environnementale (fumée de cigarette, particules Diesel, ozone) pourrait induire et/ou aggraver la maladie (Gilmour *et al.,* 2006; Kelly et Fussell, 2011).

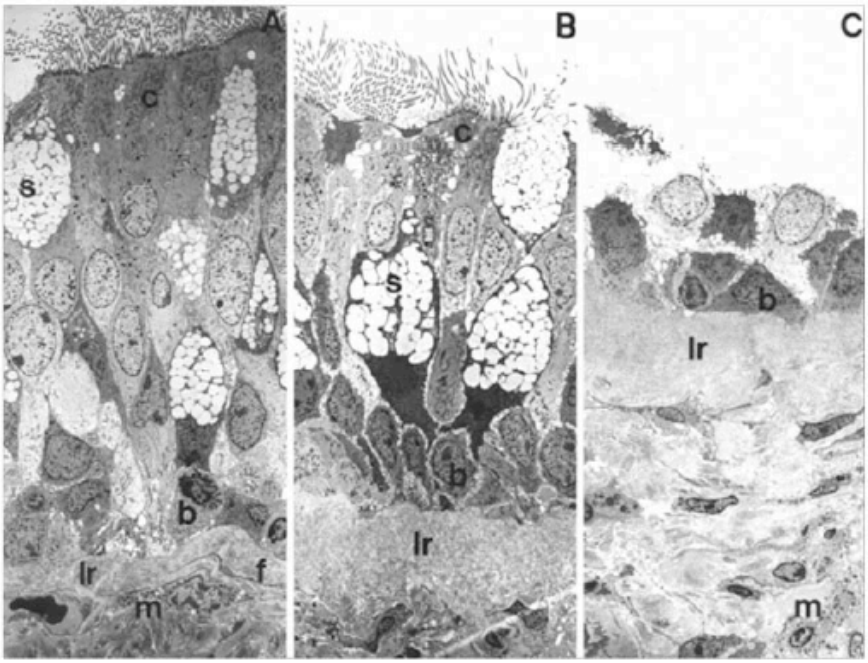


Figure 17. Altérations de l'épithélium bronchique dans l'asthme, observées au microscope électronique à transmission. Dans l'asthme sévère, l'épithélium est desquamé, la majorité des cellules ciliées (c) et caliciformes (s) sont perdues et la lame réticulaire (lr) est épaissie (d'après Holgate, 2008).

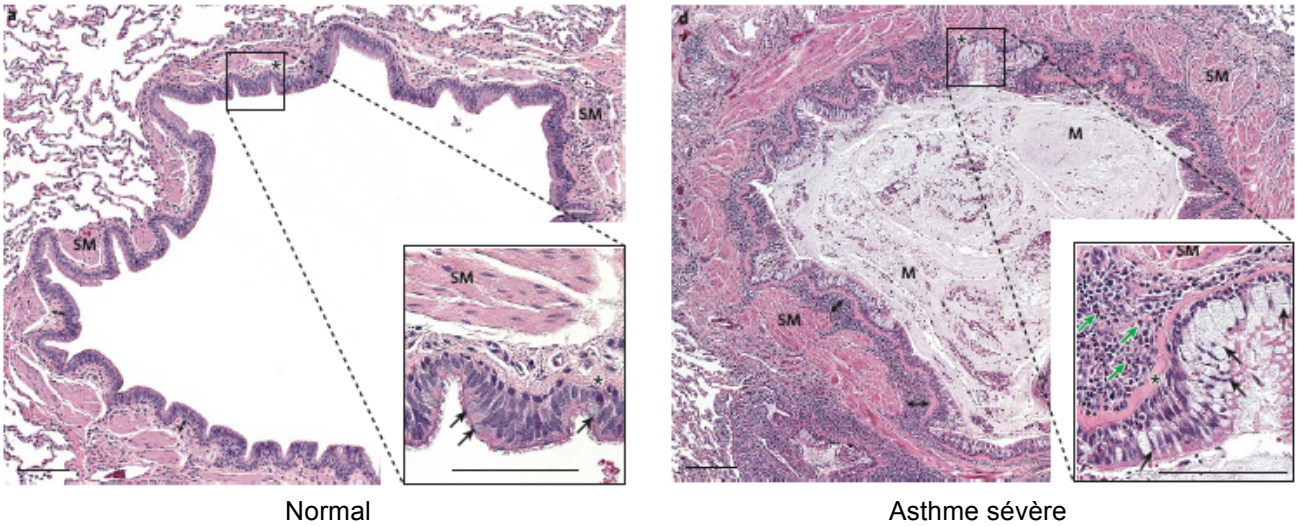


Figure 18. Remodelage des voies respiratoires dans l'asthme, observé sur des coupes histologiques. Dans l'asthme, on peut noter la présence d'une hypersécrétion de mucus (M), d'un épaississement de la membrane basale (*) et d'une hyperplasie du muscle lisse bronchique (SM) (d'après Galli *et al.,* 2008).

D.I.1. Caractéristiques physiopathologiques de l'asthme allergique

L'asthme allergique est caractérisé par :

- une inflammation des voies respiratoires. Cette réaction inflammatoire est caractérisée par un infiltrat cellulaire polymorphe composé en particulier d'**éosinophiles**, mais également de neutrophiles, de lymphocytes, de macrophages et de mastocytes (Holgate, 2008).

- un remodelage des voies respiratoires. Le terme de remodelage désigne classiquement l'ensemble des changements structurels et fonctionnels survenant au cours de l'asthme. Ces changements incluent : une **détérioration de l'épithélium** des voies respiratoires **(Figure 17)**, une hyperplasie et une hypertrophie des cellules du muscle lisse bronchique, une **hypersécrétion de mucus** liée à une augmentation du nombre de cellules épithéliales sécrétrices ainsi qu'à une hyperplasie des glandes mucipares au niveau de la sous-muqueuse **(Figure 18)**, une **fibrose subépithéliale** caractérisée par un dépôt de collagène et de fibronectine sous la membrane basale de l'épithélium et au niveau de la sous-muqueuse, et enfin une **prolifération des vaisseaux sanguins** au niveau de l'endothélium (Bousquet *et al.,* 2000; Corrigan, 2008; Al-Muhsen *et al.,* 2011).

- une hyperréactivité bronchique. L'hyperréactivité bronchique peut se définir comme l'augmentation de la **capacité des bronches à se rétrécir** en réponse à une grande variété de stimuli, qui peuvent être spécifiques (l'allergène) ou non spécifiques (air froid, fumée de tabac…), les sujets asthmatiques ayant acquis une sensibilité et une réactivité accrues vis-à-vis de ces facteurs. L'hyperréactivité bronchique pourrait être associée aux changements physiopathologiques décrits précédemment, comme la présence d'un infiltrat inflammatoire, la détérioration de l'épithélium des voies respiratoires, ou encore l'augmentation de la contractilité bronchique (Bousquet *et al.,* 2000; Murdoch et Lloyd, 2010).

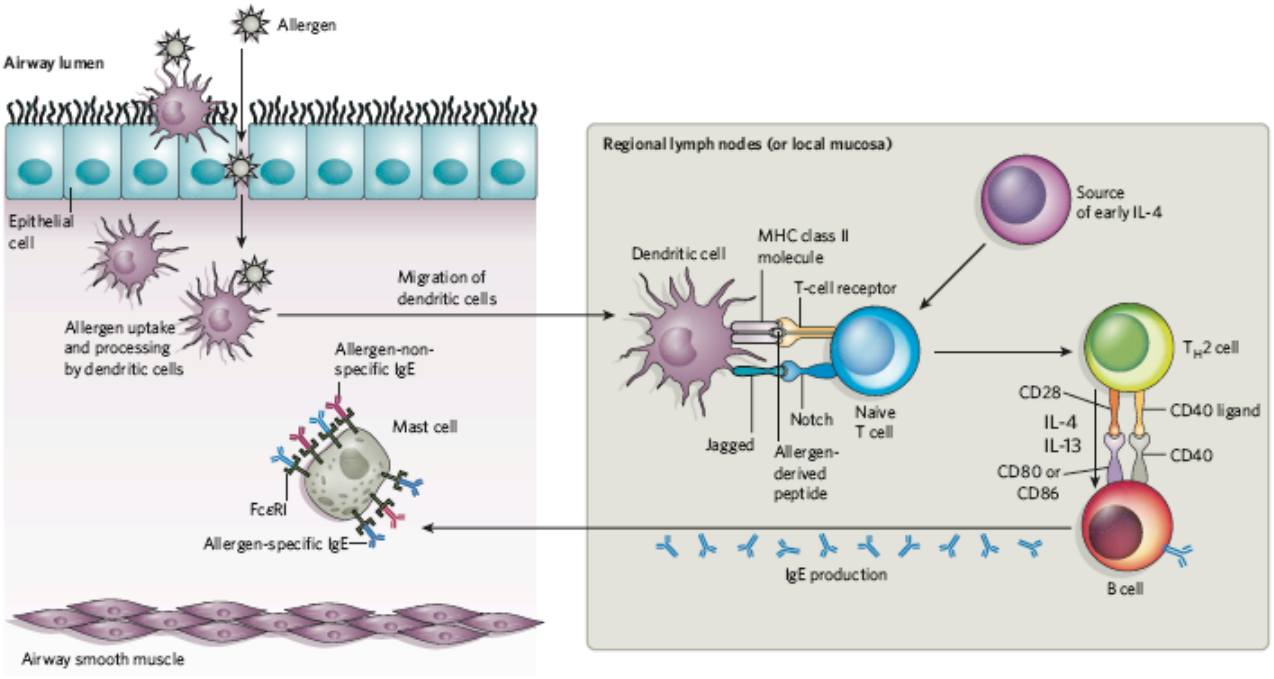


Figure 19. Mécanismes immunologiques de la phase de sensibilisation à l'allergène (d'après Galli *et al.,* 2008).

D.I.2. Mécanismes immunologiques de l'asthme allergique

Les mécanismes immunologiques à l'origine du développement de l'asthme allergique se décomposent en trois phases : la phase de sensibilisation à l'allergène, la réponse inflammatoire allergique aiguë et l'évolution vers une inflammation chronique et un remodelage des voies aériennes.

D.I.2.1. La phase de sensibilisation à l'allergène

La sensibilisation à un allergène reflète la capacité d'un allergène à induire une réponse immunitaire de type Th2, dans laquelle des cytokines comme IL-4 et IL-13 vont conduire à la production d'IgE spécifiques de l'allergène par les lymphocytes B **(Figure 19)**.

Tout d'abord, l'allergène inhalé est capturé par les **cellules dendritiques** (DC) immatures, qui sont des cellules présentatrices de l'antigène, soit au niveau de l'épithélium, soit directement dans la sous-muqueuse épithéliale, dans le cas d'allergènes possédant une activité protéase, qui permet le clivage des jonctions serrées entre les cellules épithéliales. À la suite de cette capture, les DC sont activées et subissent un processus de maturation, caractérisé par une augmentation de leur capacité à présenter efficacement l'antigène (augmentation de l'expression des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et des molécules de co-stimulation) et permettant leur migration vers les ganglions lymphatiques associés aux poumons. Les DC matures présentent alors le peptide dérivé de l'allergène aux lymphocytes T naïfs présents dans les ganglions et induisent, en présence d'IL-4, leur **différenciation en lymphocytes Th2**. Puis, les lymphocytes Th2 ainsi activés produisent des cytokines de type Th2, dont l'IL-4 et l'IL-13, et expriment à leur surface des molécules de co-stimulation, dont le CD40-Ligand (CD40L). Ces deux paramètres sont indispensables à l'interaction entre les lymphocytes Th2 et les lymphocytes B conduisant à la **production d'IgE spécifiques de l'allergène par les lymphocytes B**. Une partie des lymphocytes B, appelés plasmocytes, sécrètent alors les IgE et une autre partie, qui constituent les lymphocytes B mémoire, ne les sécrètent pas mais les expriment à leur surface. Les IgE sécrétées se distribuent localement puis de façon systémique, et se fixent sur les **mastocytes** résidant dans le tissu pulmonaire, ainsi que sur les basophiles circulants, *via* le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) exprimé à leur surface. À l'issue de cette phase, les individus sont sensibilisés à l'allergène (Galli *et al.,* 2008).

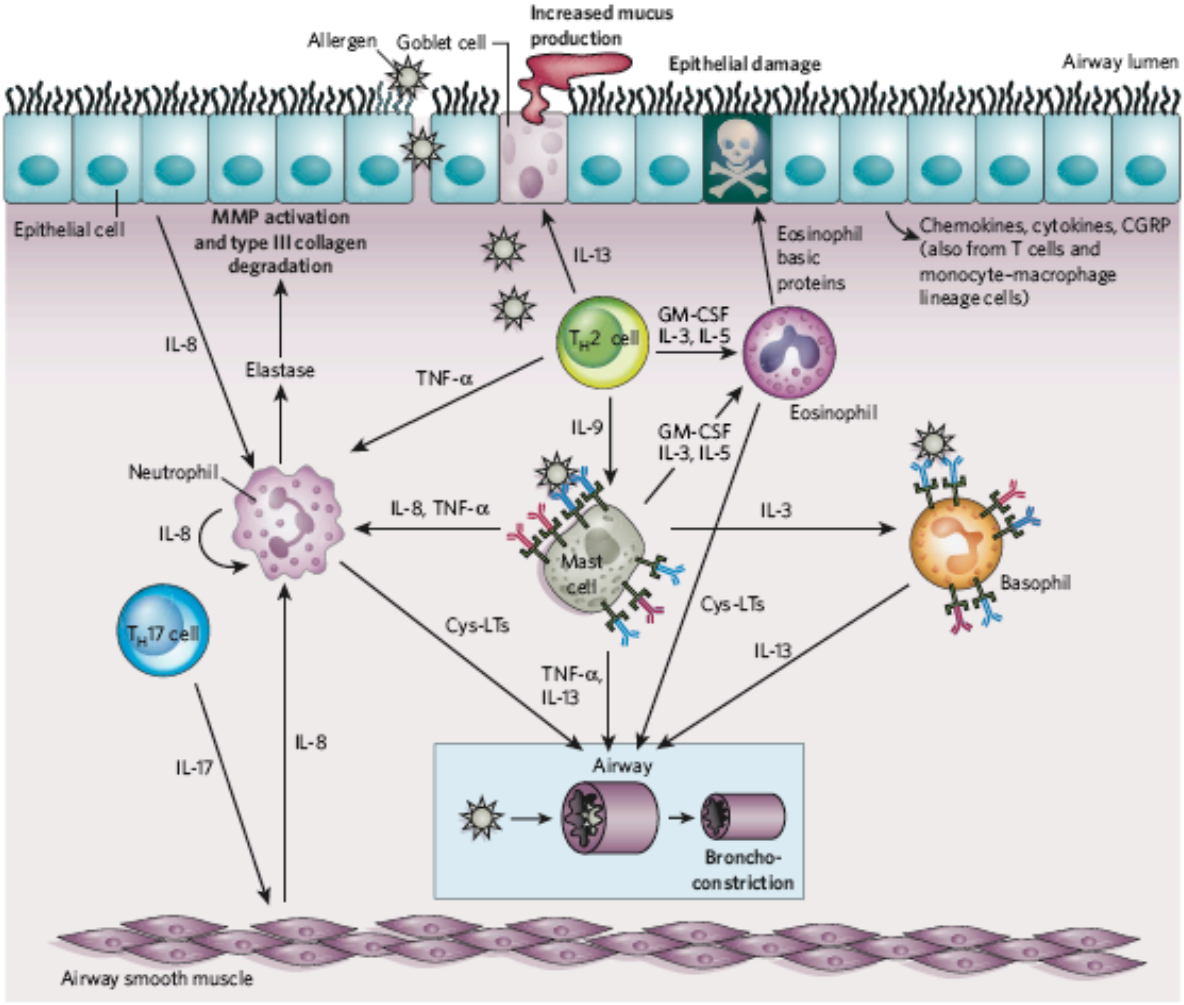


Figure 20. Mécanismes immunologiques de la réponse allergique inflammatoire aiguë (d'après Galli *et al.,* 2008).

D.I.2.2. La réponse inflammatoire allergique aiguë

Dans l'asthme allergique, une réponse inflammatoire aiguë se produit lors du contact de l'individu sensibilisé avec l'allergène ; elle se décompose en deux phases : la réaction immédiate et la réaction retardée (**Figure 20**).

Ainsi, chez les individus sensibilisés, l'allergène inhalé se fixe sur les complexes FcεRI/IgE présents à la surface des **mastocytes**, entraînant l'activation des mastocytes. Une fois activés, les mastocytes libèrent rapidement des médiateurs préformés et néoformés, comme l'histamine, des prostaglandines et des leucotriènes, qui sont responsables d'une bronchoconstriction, d'une vasodilatation, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'une augmentation de la production de mucus. L'ensemble de ces effets conduit à une obstruction des voies aériennes et aux symptômes (dyspnées, sifflements et toux) observés lors de la **réaction immédiate** de la crise d'asthme (survenant dans les 30 à 60 minutes suivant l'exposition à l'allergène). Les mastocytes activés sécrètent également des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines, comme l'IL-4, l'IL-5 et le TNF-α, impliqués dans le recrutement des cellules inflammatoires, et contribuent de ce fait à la transition vers la réaction retardée de la réponse inflammatoire (Bousquet *et al.,* 2000; Holgate, 2008).

Lors de la **réaction retardée** (qui apparaît 2 à 6 heures après l'exposition à l'allergène), la réponse inflammatoire est caractérisée par un afflux de neutrophiles, de lymphocytes, de basophiles, et surtout d'**éosinophiles**. Une fois recrutées, ces cellules inflammatoires libèrent à leur tour des **médiateurs cytotoxiques**, dont les protéines cationiques libérées par les éosinophiles et responsables d'une détérioration de l'épithélium, ainsi que des **médiateurs pro-inflammatoires** (le TNF-α par exemple) et des **cytokines Th2** (comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13) induisant une inflammation au niveau de la sous-muqueuse épithéliale. Cette réaction inflammatoire aboutit à une bronchoconstriction et au déclenchement d'une hyperréactivité bronchique.

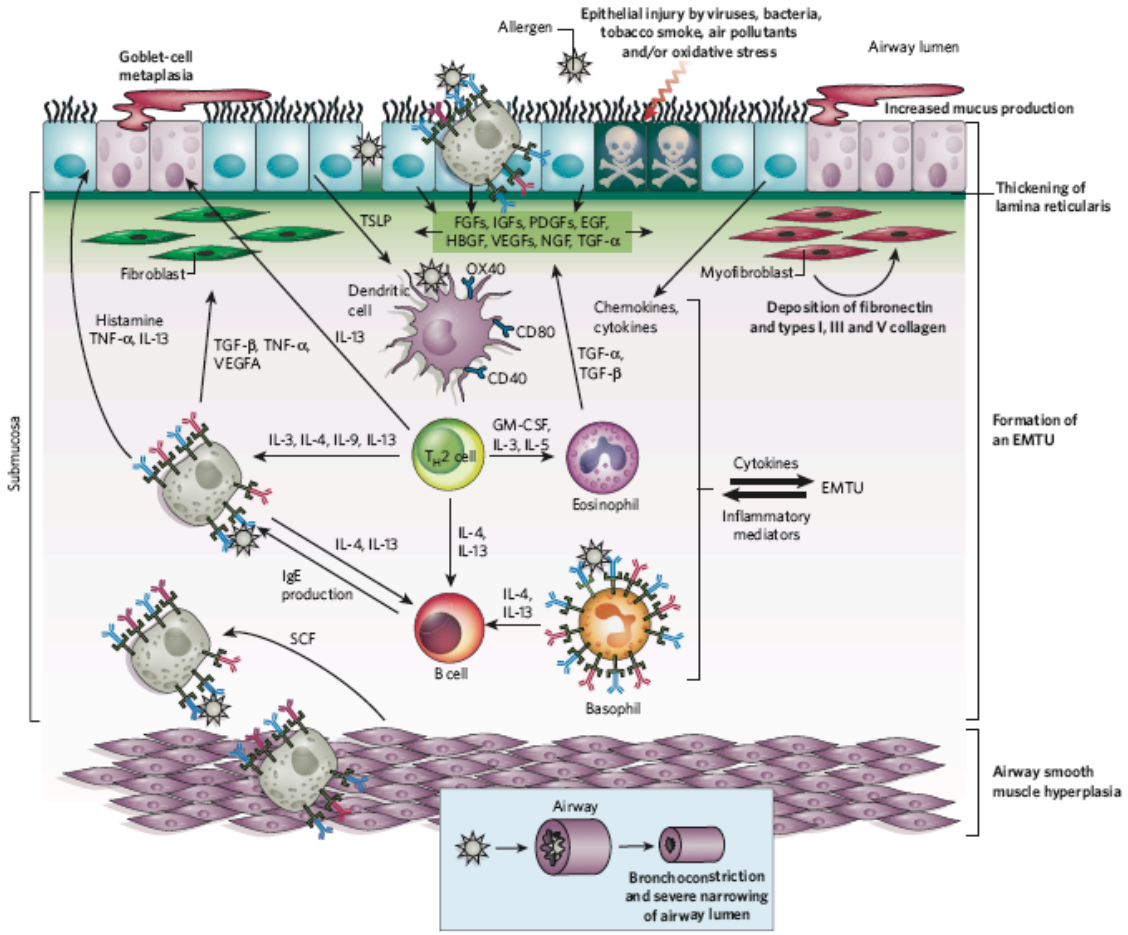


Figure 21. Mécanismes immunologiques de l'inflammation chronique et du remodelage des voies aériennes (d'après Galli *et al.,* 2008).

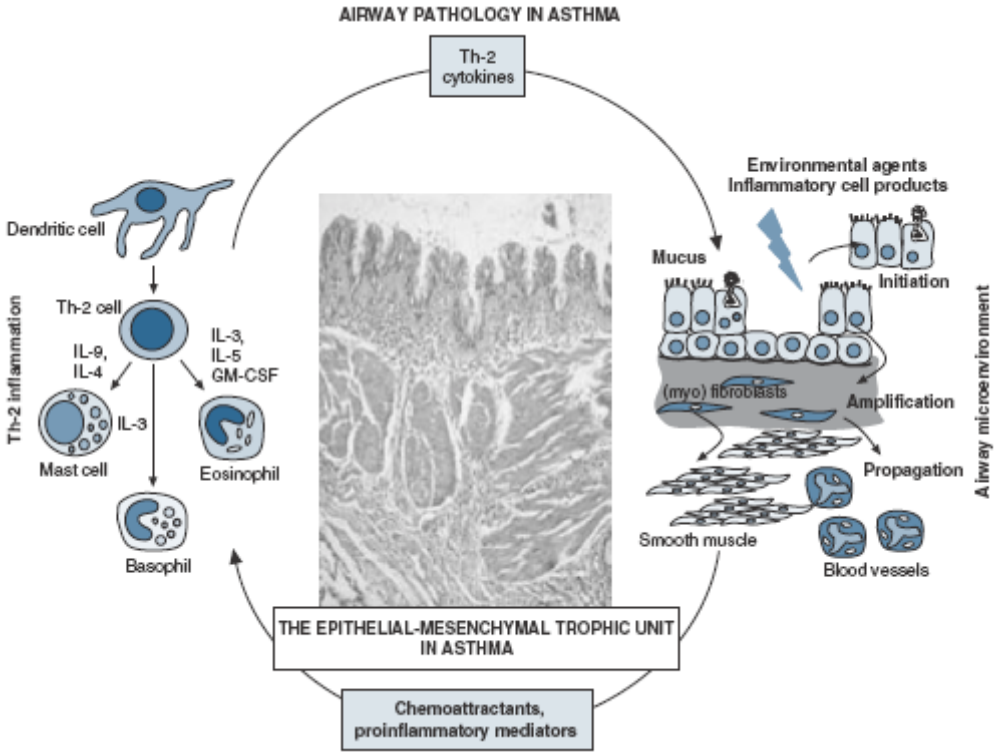


Figure 22. Implication de l'épithélium dans les processus d'inflammation chronique et de remodelage (d'après Holgate, 2008).

D.I.2.3. L'évolution vers une inflammation chronique et un remodelage des voies respiratoires

Si l'exposition à l'allergène est continue ou survient de manière répétitive, la réponse allergique évolue vers **une inflammation chronique**. Cette inflammation chronique est liée à la persistance et à l'activation des cellules immunitaires recrutées (éosinophiles, basophiles, neutrophiles, macrophages, lymphocytes Th2 et lymphocytes B) dans le tissu pulmonaire (Galli *et al.,* 2008). À long terme, la persistance de l'inflammation conduit à une modification de l'architecture des voies respiratoires (**Figure 21**).

En effet, un grand nombre de médiateurs et de facteurs de croissance pro-fibrotiques sont sécrétés par les cellules immunitaires infiltrées. Parmi elles, les éosinophiles jouent un rôle central dans le **processus de remodelage** des voies aériennes, en produisant en particulier du TGF-β (Transforming Growth Factor), qui conduit à la prolifération et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, ainsi qu'à l'augmentation du dépôt du collagène et de la fibronectine dans la matrice extracellulaire. Les mastocytes sécrètent également des facteurs de croissance, dont du TGF-β. Les lymphocytes Th2 contribuent aussi au processus de remodelage en sécrétant des cytokines Th2 (l'IL-13 notamment), qui sont impliquées dans l'induction de l'hypersécrétion de mucus et de la fibrose subépithéliale (Bousquet *et al.,* 2000; Holgate, 2008; Al-Muhsen *et al.,* 2011).

L'épithélium bronchique est également un orchestrateur important des processus d'inflammation chronique et de remodelage dans l'asthme (**Figure 22**). En effet, en réponse aux dommages répétés survenant au cours de l'inflammation allergique et pouvant être exacerbés par l'exposition à d'autres facteurs environnementaux (pathogènes, fumée de cigarette, polluants...), l'épithélium produit de nombreux médiateurs qui amplifient les réponses immunitaire Th2 et inflammatoire préexistantes. Ainsi, les **cytokines de la réponse innée** produites par les cellules épithéliales activées telles que TSLP, l'IL-25, l'IL-33 ou le GM-CSF, ont la capacité de renforcer la réponse Th2, en activant différentes cellules du système immunitaire, dont les cellules dendritiques et les mastocytes. Ces cytokines sont aussi capables d'amplifier l'inflammation, en participant au recrutement et à l'activation des cellules inflammatoires, notamment des éosinophiles (Hammad et Lambrecht, 2008; Holgate, 2008). Les cellules épithéliales activées produisent également de nombreux facteurs de croissance, dont le TGF-β, qui contribuent au développement d'une fibrose subépithéliale (Al-Muhsen *et al.,* 2011).

D.II. Impact des NP manufacturées sur l'asthme allergique

Des études épidémiologiques ont montré qu'il existait une association entre l'exposition aux particules ultrafines de la pollution atmosphérique, dont les DEP, et la survenue d'une aggravation de l'asthme allergique (McCreanor *et al.,* 2007; Morgenstern *et al.,* 2008). En outre, de nombreuses études expérimentales ont rapporté que les DEP pouvaient avoir un effet adjuvant sur la réponse immunitaire et augmenter la réponse inflammatoire allergique (Takano *et al.,* 1997; Hao *et al.,* 2003; Matsumoto *et al.,* 2006; Takahashi *et al.,* 2010). La connaissance de ces effets a récemment motivé l'étude, dans des modèles animaux, de l'impact que pourraient avoir les NP manufacturées sur l'asthme allergique. Ce sous chapitre présentera tout d'abord les études portant sur les effets sur l'asthme des NP manufacturées autres que les NTC, puis les études portant spécifiquement sur les NTC, et enfin les mécanismes potentiellement responsables de ces effets.

D.II.1. Données concernant les NP manufacturées autres que les NTC

Selon des études réalisées dans des modèles animaux d'asthme, les NP de dioxyde de titane ou de noir de carbone pourraient avoir un **effet adjuvant** sur la réponse immunitaire et **augmenter la réponse inflammatoire** allergique.

Inoue *et al.* ont par exemple montré que des administrations répétées par voie intra-trachéale de **NP de noir de carbone** (de diamètre 14 nm ou 56 nm) pouvaient augmenter la production d'immunoglobulines IgG1 et IgE spécifiques de l'allergène et aggraver la réponse inflammatoire allergique, caractérisée par un infiltrat de cellules inflammatoires (éosinophiles, neutrophiles) et une production de médiateurs pro-inflammatoires (MCP-1 et IL-6) et de cytokines Th2 (IL-5 et IL-13), dans un modèle murin d'asthme à l'ovalbumine (Inoue *et al.,* 2005). L'effet était plus prononcé pour les particules les plus petites (14 nm). De même, toujours dans un modèle à l'ovalbumine, de Haar *et al.* ont montré que l'instillation intra-nasale de **NP de dioxyde de titane** (~29 nm) avaient un effet adjuvant sur la réponse immunitaire et aggravaient la réponse inflammatoire allergique, alors que les particules de taille plus importante (~250 nm) n'induisaient pas d'effet (de Haar *et al.,* 2006). Par ailleurs, Hussain *et al.* ont évalué les effets des NP de dioxyde de titane (~22 nm) et des NP d'or (~40 nm), administrées par voie oropharyngée dans un modèle d'asthme aux diisocyanates, substances chimiques responsables d'asthme professionnel (Hussain *et al.,* 2011). Ils ont montré que ces deux types de NP étaient capables d'augmenter l'inflammation pulmonaire induite par le diisocyanate de toluène.

L'ensemble de ces études suggère que les NP manufacturées ont un effet aggravant sur l'asthme allergique.

D.II.2. Données concernant les NTC

Des études récentes dans des modèles murins d'asthme ont également rapporté un effet des NTC sur la **réponse immunitaire**, ainsi que sur **l'inflammation** et le **remodelage** des voies aériennes induits par un allergène.

Ainsi, dans un modèle à l'ovalbumine, Inoue *et al.* ont montré que des administrations répétées par voie intra-trachéale de 50 µg de SWCNT ou de MWCNT (1 fois par semaine pendant 6 semaines) induisaient une augmentation des **IgG1 et IgE** spécifiques de l'antigène dans les sérums, ainsi qu'une augmentation des **cellules inflammatoires** (éosinophiles, neutrophiles), des **médiateurs pro-inflammatoires** (KC, MCP-1, IL-6 et IL-1β) et des **cytokines Th2** (IL-4) dans les LBA ou le tissu pulmonaire de souris, en comparaison à l'ovalbumine seule (Inoue *et al.,* 2009; Inoue *et al.,* 2010).

De même, toujours dans un modèle à l'ovalbumine, Nygaard *et al.* ont observé que 3 administrations par voie intra-nasale de 130 µg de SWCNT ou de MWCNT induisaient une augmentation des **IgG1, IgG2a et IgE** spécifiques de l'antigène dans les sérums, ainsi qu'une augmentation des **cellules** (éosinophiles, neutrophiles, lymphocytes, macrophages) et des **cytokines inflammatoires** (MCP-1) dans les LBA, en comparaison à l'ovalbumine seule (Nygaard *et al.,* 2009).

Par ailleurs, Ryman-Rasmussen *et al.* ont montré que l'exposition par inhalation aux MWCNT (100 mg/m^3 pendant 6 heures, correspondant à une dose totale de 240 µg) augmentait la **fibrose pulmonaire** (mise en évidence par une augmentation des facteurs de croissance PDGF et TGF-β1, et du collagène dans le tissu pulmonaire) chez la souris présentant une inflammation allergique, dans un modèle d'asthme utilisant également l'ovalbumine (Ryman-Rasmussen *et al.,* 2009b).

D.II.3. Mécanismes mis en jeu

Les mécanismes potentiellement responsables des effets des NP manufacturées, dont les NTC, dans l'asthme restent encore incertains.

D.II.3.1. Activation des cellules présentatrices de l'antigène

Compte tenu du rôle clé des cellules présentatrices de l'antigène dont **les DC** dans l'asthme, des études se sont intéressées à l'impact des NP sur ces cellules. Ainsi, il a été montré dans un modèle murin d'asthme à l'ovalbumine, que l'exposition par voie intra-trachéale à des **NP de noir de carbone** (14 nm) entraînait une augmentation du nombre de cellules présentatrices de l'antigène, ainsi qu'une augmentation de l'expression des molécules de classe II du CMH et des molécules de co-stimulation dans le poumon (Koike *et al.,* 2008). Ces effets étaient associés à une augmentation de la production d'immunoglobulines et de la réponse inflammatoire pulmonaire induites par l'ovalbumine. De la même manière, de Haar *et al.* ont rapporté que l'exposition par instillation intra-nasale à des **NP de noir de carbone** dans un modèle d'asthme à l'ovalbumine, entrainait une augmentation du nombre de DC, ainsi qu'une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 dans les ganglions lymphatiques péri-bronchiques de souris (de Haar *et al.,* 2008). Dans leurs travaux menés dans un modèle d'asthme à l'ovalbumine, Inoue *et al.* ont également proposé que les **NTC** soient capables d'amplifier la maturation et l'activation des cellules présentatrices de l'antigène, dont les cellules dendritiques (Inoue *et al.,* 2009; Inoue *et al.,* 2010). Par ailleurs, dans un modèle *in vitro* de DC dérivées de moelle osseuse de souris, il a été montré que les NP de noir de carbone pouvaient promouvoir la maturation (augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86) et la fonction de présentation des DC (Koike *et al.,* 2008). De même, Palomaki *et al.* ont également montré *in vitro* sur des macrophages et des DC dérivées de moelle osseuse de souris, que les NP de dioxyde de titane et les NP de silice amorphe enrobées de TiO_2 pouvaient induire une augmentation de la maturation et de la fonction de présentation de ces cellules (Palomaki *et al.,* 2010).

L'ensemble de ces études semble donc montrer que les NP ont la capacité d'activer de façon inappropriée les cellules présentatrices de l'antigène, notamment les DC, ce qui pourrait expliquer leur effet adjuvant sur la réponse allergique décrit dans la littérature.

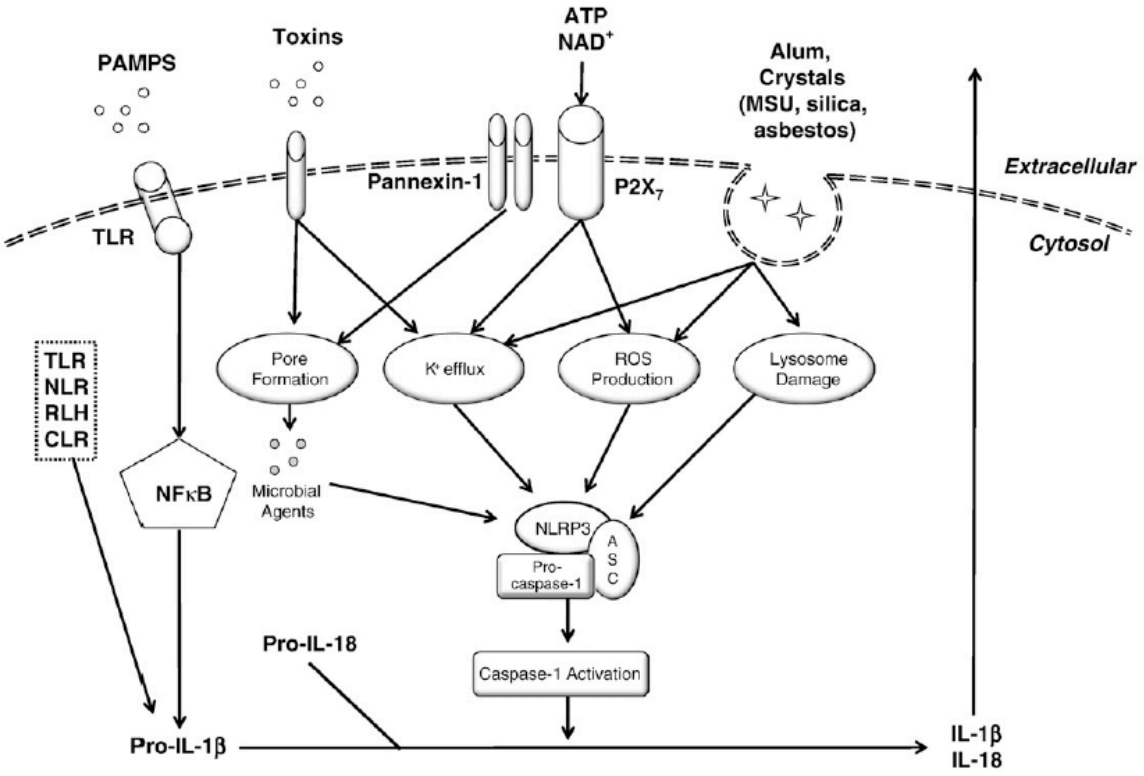


Figure 23. Cascade de signalisation associée à l'inflammasome NLRP3. Le processus conduisant à la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 *via* la caspase-1 est dépendant de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (d'après Birrell et Eltom, 2011).

D.II.3.2. Stress oxydant

Le rôle du stress oxydant dans la pathogénèse de l'asthme a été démontré dans de nombreuses études (Dozor, 2010). Celui-ci est impliqué dans l'activation de voies de signalisation sensibles au potentiel redox comme le voie des MAP kinases ou de NF-κB, aboutissant à la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires. Le résultat de cette cascade de réaction est le déclenchement ou l'amplification de l'inflammation, qui peut contribuer, si elle est excessive ou persistante, au développement de l'asthme allergique. Or, comme nous l'avons vu précédemment, il a été montré qu'une grande variété de NP manufacturées (noir de carbone, NTC, dioxyde de titane, silice…) pouvait induire un stress oxydant, en augmentant la production d'ERO (Xia *et al.,* 2006; Sharma *et al.,* 2007; Park *et al.,* 2008; Hussain *et al.,* 2009). D'après les travaux d'Inoue *et al.* menés dans un modèle d'asthme à l'ovalbumine, les NTC seraient ainsi capables d'augmenter le stress oxydant induit par l'allergène dans le poumon de souris, ce qui pourrait conduire à une exacerbation de la réponse allergique (Inoue *et al.,* 2010).

Ainsi, le stress oxydant pourrait être un des facteurs pouvant expliquer les effets aggravant des NP sur l'asthme allergique.

D.II.3.3. Activation de l'inflammasome

Selon de très récentes études, **l'activation de l'inflammasome NLRP3** (NOD-like receptor, pyrin containing 3) jouerait un rôle dans la pathogénèse de maladies respiratoires inflammatoires, dont l'asthme (Birrell et Eltom, 2011). L'inflammasome NLRP3, dont la cascade de signalisation est présentée à la **figure 23**, peut être brièvement décrit de la façon suivante. L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique multimérique permettant l'activation de la caspase-1. La caspase-1 ainsi activée permet de cliver la pro-IL-1β et la pro-IL-18 en IL-1β et IL-18, cytokines pro-inflammatoires qui seront ensuite libérées dans le milieu extracellulaire. Ces deux pro-cytokines peuvent être produites après la détection de molécules du non soi appelées PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). L'inflammasome peut quant à lui être activé en réponse à des signaux de danger endogènes (l'ATP par exemple) ou des irritants environnementaux comme les fibres d'amiante ou les particules micrométriques de silice (Cassel *et al.,* 2008; Dostert *et al.,* 2008). Ces signaux de danger peuvent en effet conduire à un afflux de potassium, une production d'ERO et une déstabilisation lysosomale, pouvant entraîner une activation subséquente de l'inflammasome.

Quelques études ont très récemment montré que certaines NP manufacturées étaient capables d'activer l'inflammasome. Ainsi, en mettant en évidence le clivage de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1β dans des modèles *in vitro* de macrophages et de kératinocytes humains, Yazdi *et al.* ont montré que les NP de dioxyde de titane et les NP de dioxyde de silice pouvaient activer l'inflammasome NLRP3 (Yazdi *et al.,* 2010). De plus, les mêmes auteurs ont montré *in vivo* que l'inflammation pulmonaire observée après instillation intra-nasale de NP de dioxyde de titane était dépendante de l'activation de l'inflammasome et de la libération d'IL-1β (Yazdi *et al.,* 2010). De même, Winter *et al.* ont montré *in vitro* sur des DC dérivées de moelle osseuse de souris, que les NP de dioxyde de titane et les NP de dioxyde de silice activaient l'inflammasome NLRP3 (induction de la libération d'IL-1β après activation de la caspase-1) (Winter *et al.,* 2011). De la même manière, Reisetter *et al.* ont montré que les NP de noir de carbone activaient l'inflammasome NLRP3 dans des modèles *in vitro* de macrophages humains (Reisetter *et al.,* 2011). Enfin, deux études menées *in vitro* sur des macrophages humains ont montré que les NTC étaient également capables d'activer l'inflammasome. Selon les auteurs, cette activation nécessiterait la phagocytose des NTC et serait liée à un afflux de potassium et à une déstabilisation lysosomale (Meunier *et al.,* 2011), ainsi qu'à la production d'ERO induite par les NTC (Palomaki *et al.,* 2011).

Ainsi, l'activation de l'inflammasome NLRP3 pourrait être impliquée dans les effets des NP sur l'asthme allergique.

Objectifs

L'analyse des données présentées dans ce chapitre d'introduction montre qu'une meilleure connaissance de l'impact potentiel des NTC sur la santé respiratoire des populations saines, mais également des populations sensibles comme les populations d'atopiques et/ou d'asthmatiques, est nécessaire. Par ailleurs, la toxicité respiratoire des particules dépendant fortement de leur biodisponibilité, évaluer le lien entre l'activité des NTC et leur biodistribution dans les voies aériennes est essentiel. Dans ce contexte, l'objectif du projet de thèse a été d'étudier la toxicité respiratoire de NTC d'origine industrielle en lien avec leur biodistribution, chez la souris normale, mais également dans un modèle murin d'asthme. Ce travail a porté sur des NTC à multi-parois, ce type de NTC représentant plus de 95% de la production industrielle de NTC, ainsi que la majorité des applications industrielles.

La première étape du travail a consisté à mettre au point un protocole de dispersion des NTC. En effet, afin d'étudier leur toxicité dans des systèmes biologiques, les NTC doivent être dispersés dans un milieu biocompatible. Les NTC bruts ayant tendance à s'agréger en milieu aqueux, le recours à des agents dispersants et à une étape de sonication est généralement nécessaire. Ainsi, l'objectif de ce premier volet de la thèse a été d'identifier un agent compatible avec la voie respiratoire capable de disperser efficacement nos NTC, parmi un ensemble d'agents décrits dans la littérature et de nouveaux dispersants potentiels.

La deuxième étape de la thèse a été d'étudier la distribution spatiale des NTC dans les voies respiratoires de la souris. Dans ce travail, deux approches expérimentales ont été mises en œuvre, l'une basée sur l'utilisation de NTC marqués par des fluorophores, l'autre basée sur l'utilisation de NTC bruts (non marqués).

La troisième étape du projet de thèse a été de décrire les effets respiratoires de doses croissantes de NTC chez la souris normale après exposition unique et/ou répétée, afin d'établir notamment une relation dose-effet. Dans ce travail, nous avons évalué la capacité des NTC à induire une inflammation et un remodelage (réponse fibrotique et production de mucus) des voies aériennes.

La dernière partie des travaux de thèse a porté sur l'étude de l'impact des NTC sur la réponse allergique dans un modèle murin d'asthme aux acariens. Dans ce travail, ont été évalués, en plus de l'inflammation et du remodelage des voies aériennes, la réponse immunitaire systémique.

Chapitre 2 – Matériel et méthodes

I. NTC utilisés dans cette étude

I.1. NTC bruts

Les NTC utilisés dans ce travail (MWCNT, Graphistrengh C100) ont été fournis par la société ARKEMA (Colombes, France). Ils ont été synthétisés par la méthode CCVD. Les caractéristiques des NTC données par le fabricant ou déterminées par des analyses ultérieures sont résumées au **Tableau 4**. La pureté en carbone et les résidus de métaux ont été analysés par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Auger Electron Spectroscopy). La teneur en endotoxines a été déterminée par le test *Limulus amebocyte* lysate (Chromo-LAL, Associates of Cape Cod Inc., East Falmouth, États-Unis, limite de détection 0,005 EU/mL).

Tableau 4. Caractéristiques des NTC bruts.

Caractéristiques	Données
Taille moyenne des agglomérats	200 - 500 µm [a]
Contenu en carbone	92,75 % [b]
Carbone amorphe	Non détectable [a]
Contenu en métaux	Al = 2,40 % [b]
	Fe = 2,21 % [b]
	Autres < 0,1 % [b]
Nombre de parois	5 - 15 [a]
Diamètre moyen extérieur	10 - 15 nm [a]
Longueur	0,1 - 10 µm [a]
Endotoxines	< 0,005 EU/mg [c]

[a] caractéristiques fournies par le fabricant.

[b] caractéristiques déterminées par ICP-AES.

[c] teneur déterminée par le test *Limulus amebocyte* lysate.

I.2. NTC marqués par des fluorophores

Des NTC marqués par des fluorophores ont également été utilisés dans ce travail afin d'étudier leur biodistribution chez la souris après administration par voie respiratoire. Ces conjugués NTC-fluorophores ont été préparés, à partir des NTC bruts décrits ci-dessus, par l'équipe de Chimie Organique Appliquée de l'UMR 7199 (Directeur L. Lebeau). Ils seront présentés et justifiés dans la partie "Résultats" correspondante.

II. Animaux

Les souris mâles de souche BALB/c, âgées de 9 semaines au moment de l'expérience, ont été fournies par les laboratoires Charles River (Saint Germain-sur-l'Arbresle, France). Les animaux ont été maintenus dans des conditions environnementales contrôlées avec un cycle jour/nuit de 12 h/12h en accord avec les règles européennes concernant l'expérimentation animale. L'alimentation (UAR-alimentation, Villemoisson, France) et l'eau de boisson étaient disponibles *ad libitum*. L'expérimentation animale a été conduite en conformité avec la loi en vigueur en France.

III. Mise au point d'une méthode de dispersion des NTC bruts en vue de leur administration chez l'animal par voie respiratoire

III.1. Préparation du surfactant pulmonaire synthétique et des autres milieux de dispersion

Le surfactant pulmonaire synthétique développé dans ce travail a été préparé de la manière suivante. De la Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), du Phosphatidylglycérol (PG), du Cholestérol (Chol) et de l'albumine de sérum de bœuf (albumine) (tous les réactifs proviennent de Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ont été dissous dans du chloroforme-méthanol (9:1) à un ratio massique de 70:10:10:10 %. Après l'évaporation du solvant, le résidu a été mis en suspension dans un tampon Hépès-NaCl (10 mM-145 mM, pH 7,4) de façon à obtenir une concentration finale en DPPC de 1 mg/mL. La solution obtenue a été soniquée dans un bain à ultrasons (Bioblock Scientific, Strasbourg, France) à une puissance de 56 W et une fréquence de 40 kHz pendant 10 secondes. Les autres milieux de dispersion utilisés pour comparaison incluaient une solution saline (NaCl 0,9% dans de l'eau) et des solutions saline contenant 0,1% de DPPC, 0,5% d'albumine, 1% de Pluronic® F68 (BASF Corp, New Milford, CT) ou 1% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS, Qbiogene, Strasbourg, France).

III.2. Préparation et caractérisation des dispersions de NTC

Les dispersions de NTC ont été préparées en ajoutant 1 mg de NTC dans 4 mL de surfactant synthétique ou 4 mL des autres milieux de dispersion, suivie d'une sonication dans un bain à ultrasons (56 W, 40 kHz) pendant 30 minutes. Les dispersions ont été caractérisées juste après leur préparation et 24h plus tard pour évaluer leur stabilité dans le temps. Cette caractérisation a été réalisée sur des préparations pures ou diluées au 1/4

dans de l'eau. Tout d'abord, la dispersion ou l'absence de dispersion a été estimée visuellement. Ensuite, la formation potentielle d'agglomérats grossiers a été recherchée par MO en lumière blanche. Quelques microlitres de dispersion diluée au 1/4 ont été déposés au fond d'une microplaque de titration, puis observés au microscope optique (microscope Diaphot 300, Nikon Instruments, Lisses, France) à un grossissement de 100. La taille des agrégats observables à cette résolution est de l'ordre de 10 à 100 µm. Des images représentatives ont été prises à l'aide d'une caméra CDD (CoolSNAP Photometrics, Roper Scientific, Ottobrun, Allemagne). La distribution de la taille des particules dispersées a été analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Zetasizer Nano ZEN3600, Malvern Instruments, Paris, France) sur des préparations diluées au 1/4. Les résultats ont été exprimés sous forme d'une distribution représentative de la taille des particules, déduite du graphique de distribution exprimé en intensité. L'organisation et les dimensions physiques (largeur et longueur) des NTC dispersés ont été analysées par MET. Des gouttes des dispersions de NTC ont été déposées sur des grilles de carbone et ont été séchées à l'air avant l'observation à l'aide d'un microscope électronique à transmission (CM 12, Philips, 80 kV). L'acquisition des images a été réalisée en utilisant une caméra Orius 1000 CCD (GATAN). Les dimensions des NTC ont été déterminées sur 160 NTC choisis au hasard à partir d'un ensemble de 16 images. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Yannick Schwab au service d'imagerie de l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC, Strasbourg).

IV. Étude de la biodistribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris

Au cours de cette étude, plusieurs techniques de microscopie ont été utilisées :
- la microscopie optique à champ large en lumière blanche, appelée dans ce manuscrit microscopie optique (MO) en lumière blanche,
- la microscopie confocale de fluorescence avec excitation dans le visible, que nous appellerons dans ce manuscrit MCF,
- la microscopie confocale avec excitation dans l'IR (800 nm), appelée ici microscopie confocale IR,
- et la microscopie électronique à transmission (MET).

Ces techniques ont été mises en œuvre en collaboration avec l'équipe de Jean-Luc Vonesch au service d'imagerie de l'IGBMC (Strasbourg).

IV.1. Observation des NTC marqués en MCF

Les NTC marqués par des fluorophores ont été observés en MCF, sous la forme de poudres sèches, de dispersions dans le surfactant ou encore après incubation *in vitro* sur des cellules HeLa en culture.

IVI.1.1. Préparation des échantillons

• Poudres sèches

Les poudres sèches de NTC marqués ont été déposées entre lame et lamelle en verre (la lamelle a été fixée à l'aide d'un vernis) avant l'observation en MCF.

• Dispersions dans le surfactant

Les dispersions de NTC marqués ont été préparées en ajoutant 1 mg de NTC dans 4 mL de surfactant (concentration 250 µg/mL), suivie d'une sonication dans un bain à ultrasons (56 W, 40 kHz) pendant 30 minutes. Les préparations pures ou diluées au 1/8 dans de l'eau ont été déposées (250 µL) dans des Lab-Tek® (8 puits, Chambered 1.0. Borosilicate Coverglass System, Nunc) pour observation en MCF.

• Incubation *in vitro* sur des cellules HeLa en culture

Des dispersions de NTC marqués ont été préparées en ajoutant 1 mg de NTC dans du milieu de culture des cellules HeLa (concentration 250 µg/mL), suivie d'une sonication dans un bain à ultrasons (56 W, 40 kHz) pendant 30 minutes. Les préparations ont été ensuite diluées dans le milieu de culture afin d'obtenir une suspension finale en NTC marqués à 10 µg/mL.

Les cellules HeLa ont été cultivées à 37°C et 5% de CO_2 dans du milieu de culture RPMI (RPMI 1640, Gibco) supplémenté avec 10 mM d'HEPES (Gibco), 1 mM de L-glutamine, 100 IU de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco), puis ensemencées dans des Lab-Tek® (8 puits, Nunc). À 72 heures après l'ensemencement (correspondant à 50% de confluence), le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture contenant les NTC (10 µg/mL). Les cellules HeLa ont été cultivées en présence des NTC marqués pendant 1h30 ou 24h et observées en MCF au terme de ces temps d'incubation.

IV.1.2. Observation des échantillons en MCF

Les préparations précédemment décrites ont été observées à l'aide d'un microscope inversé confocal (TCS SP2 AOBS MP, Leica Microsystems, Nanterre, France) avec un objectif HC PL APO CS 10x/0.4 IMM. Les observations des NTC marqués au TDI ou aux dérivés du Cy5 ont été faites à une longueur d'onde d'excitation de 633 nm et une détection du signal dans une fenêtre de longueur d'onde comprise entre 645 et 745 nm, et celles des NTC marqués à la fluorescéine à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une détection dans une fenêtre comprise entre 500 nm et 700 nm. Ces observations ont été complétées par l'acquisition d'une image en MO en lumière transmise pour chaque échantillon observé. Dans les deux cas, des spectres d'émission ont été recueillis.

IV.2. Étude de la biodistribution des NTC non marqués dans le poumon de souris

IV.2.1. Traitement des animaux

• Étude de la distribution par MO en lumière blanche et MET

Les souris ont été exposées aux NTC non marqués selon un protocole d'exposition unique ou selon un protocole d'exposition répétée, protocoles présentés à la figure 24 (page 77).

• Étude de la distribution par microscopie confocale IR

- Dans un premier essai, les souris ont été exposées à trois administrations de 25 µg de NTC (soit une dose totale de 75 µg), selon le protocole d'exposition répétée présenté à la figure 24 (page 77) et les poumons ont été recueillis 7 jours après la dernière administration.
- Dans un deuxième essai, les souris ont reçu neuf doses répétées de 25 µg de NTC (soit une dose totale de 225 µg) selon le protocole d'exposition présenté à la figure 55 B (page 107) et les poumons ont été recueillis 5 jours après la dernière administration.

IV.2.2. Préparation des échantillons

En vue d'observations en MO en lumière blanche, les cellules des LBA ont été collectées et des préparations cytologiques ont été réalisées (voir parties V.3 et V.5 du Matériel et Méthodes).

Pour la préparation de coupes de tissu servant à l'analyse en MO en lumière blanche et en microscopie confocale IR, les poumons, perfusés *in situ* avec du PBS après recueil des LBA, ont été prélevés et fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (dans du tampon

PBS) pendant 24 h à 4°C. Les poumons fixés ont ensuite été rincés dans du PBS, déshydratés dans des bains successifs d'alcool, puis inclus en paraffine selon des procédures histologiques standard. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (RM 2245, Leica Microsystems). Les coupes ont ensuite été soit colorées à l'hématoxyline-éosine (observation en MO en lumière blanche), soit simplement déparaffinées (observation en microcopie confocale IR).

Pour l'observation en MET, les poumons fraîchement perfusés ont été coupés en petits morceaux et fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% / formaldéhyde à 4% (dans du tampon phosphate 0,1 M). Les tissus pulmonaires ont ensuite été post-fixés dans du tétroxyde d'osmium à 1%, déshydratés et inclus dans la résine à l'aide d'un appareil automatisé d'inclusion à micro-ondes (AMW, Leica Microsystems). Des coupes ultrafines ont ensuite été réalisées à l'aide d'un ultra-microtome et recueillies sur des grilles.

IV.2.3. Observation des échantillons

• Observation des échantillons en MO en lumière blanche

Les cellules collectées du LBA et les coupes histologiques ont été observées par macroscopie optique (M420, Leica Microsystems) et/ou microscopie optique (microscope Diaphot 300, Nikon Instruments). Elles ont été photographiées à l'aide d'une caméra couleur (CoolSNAP Photometrics) couplée à un logiciel d'acquisition d'images (CoolSNAP).

• Observation des échantillons en microscopie confocale IR

Les coupes histologiques ont été observées à l'aide d'un microscope confocal IR (TCS SP5 AOBS CFS X, Leica Microsystems) doté d'un laser IR femtoseconde (Coherent Chameleon Ultra II). Les observations ont été réalisées, avec un objectif HCX IRAPO L 25x/0.95 W, en microscopie confocale IR après excitation des échantillons à 800 nm et détection du signal dans une fenêtre de longueur d'onde comprise entre 405 et 805 nm, ainsi qu'en MO en lumière transmise. Des spectres d'émission ont été recueillis.

• Observation des échantillons en MET

Les coupes ultrafines du tissu pulmonaire recueillies sur les grilles ont été observées en MET à l'aide d'un microscope CM12 Philips opérant à 80 kV. L'acquisition des images a été réalisée avec une caméra Orius 1000 CCD (GATAN).

V. Étude de l'impact des NTC bruts chez la souris

V.1. Mode d'administration des NTC et de l'extrait d'allergènes d'acariens dans les voies respiratoires de la souris

L'administration des NTC ou de l'extrait d'allergènes d'acariens dans les voies respiratoires de la souris s'est faite par instillation intra-nasale de dispersions (NTC) ou de solutions (allergènes) de ces agents à raison de 12,5 µL de préparation/narine. Les instillations ont été réalisées sous anesthésie légère par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (50 mg/kg, Imalgène®, Merial, Lyon, France) et de xylazine (3,33 mg/kg, Rompun®, Bayer, Puteaux, France).

V.2. Protocoles d'exposition aux NTC

V.2.1. Protocoles d'exposition chez la souris normale

Les souris ont été exposées aux NTC dispersés dans le surfactant selon un protocole d'exposition unique ou selon un protocole d'exposition répétée (**Figure 24**). Dans le protocole d'exposition unique, les souris ont reçu une administration de NTC et ont été utilisées 24 h après. Dans le protocole d'exposition répétée, les souris ont reçu les NTC aux jours 0, 7 et 14 du protocole et ont été utilisées au jour 21. Les doses de NTC administrées étaient de 1,5 ; 6,25 et 25 µg. Ce choix s'est fait compte tenu d'un volume d'administration fixé à 25 µL, d'un protocole de dispersion établi pour des préparations de NTC à 1 mg/4 mL de dispersant, et de doses de NTC de 10 à 20 µg/souris décrites dans la littérature comme pertinentes d'une exposition professionnelle (Shvedova *et al.*, 2005; Mercer *et al.*, 2008; Porter *et al.*, 2010). Ces doses ont été administrées aux souris par instillation intra-nasale de 25 µL d'une dispersion de NTC à 1 mg/4 mL (dose de 6,25 µg), de cette dispersion diluée 4 fois (dose de 1,5 µg) ou d'une préparation de NTC à 4 mg/4 mL (dose 25 µg). Les propriétés de dispersion du surfactant ont été conservées dans la préparation de NTC à 4 mg/4 mL. Les animaux contrôles ont reçu des instillations intra-nasales de 25 µL de surfactant ou de sérum physiologique.

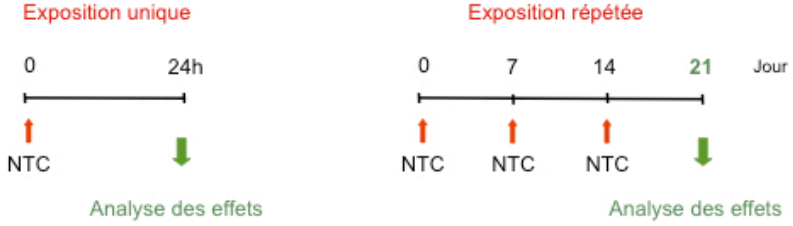


Figure 24. Protocoles d'exposition aux NTC chez la souris normale.

V.2.2. Protocoles d'exposition dans un modèle murin d'asthme

V.2.2.1. Modèle d'asthme allergique aux acariens

Les allergènes d'acarien utilisés dans cette étude sont des extraits d'acariens de l'espèce *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Dpt) (GREER®, Laboratories Inc., Lenoir, NC, États-Unis). L'extrait a été dissous dans du sérum physiologique. Son contenu en allergène majeur Der p1 (210 µg/mL) a été déterminé par ELISA (Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, États-Unis) et sa teneur en endotoxines (12,5 ng/mL) a été déterminée par le test *Limulus amebocyte* lysate (Chromo-LAL, Associates of Cape Cod Inc., East Falmouth, États-Unis).

Le modèle d'asthme, mis au point dans le cadre de ce travail à partir d'études de la littérature (Yu et Chen, 2003; Lewkowich *et al.*, 2005; Wakahara *et al.*, 2008), est un modèle entièrement respiratoire. Les souris ont reçu des instillations intra-nasales répétées d'une quantité d'extrait d'acariens (Dpt) correspondant à 2 µg de Der p1 dans 25 µL de sérum physiologique (12,5 µL/narine) aux jours 0, 7, 14 et 21 du protocole. Les animaux ainsi traités ont été utilisés 48 heures (c'est-à-dire au jour 23 du protocole) ou deux semaines (c'est-à-dire au jour 35 du protocole) après la dernière administration de l'extrait allergénique (**Figure 25**).

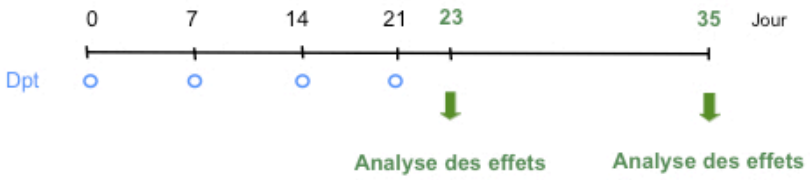


Figure 25. Protocole expérimental du modèle murin d'asthme allergique aux acariens.

V.2.2.2. Exposition des animaux aux NTC dans ce modèle

Afin d'étudier, dans ce modèle, l'impact des NTC sur le développement et la progression de l'asthme allergique, différents protocoles et différentes doses d'exposition aux NTC ont été utilisés. Pour la clarté du manuscrit, ces protocoles sont présentés et justifiés dans la partie « Résultats » correspondante.

V.3. Prélèvements des tissus et liquides biologiques

Les souris ont été euthanasiées par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (150 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg). Le sang a été prélevé au niveau de la veine cave inférieure. Après coagulation du sang pendant 1 h à température ambiante, le sérum a été collecté par centrifugation (3000 g, 15 min, 4°C) et conservé à -80°C jusqu'au dosage des Ig. Après prélèvement du sang, un cathéter trachéal a été mis en place et les poumons ont été lavés avec du sérum physiologique contenant 2,6 mM d'EDTA, à raison de 6 instillations de 0,5 mL. Les liquides des deux premiers LBA ont été centrifugés (200 g, 5 min, 4°C) et le surnageant obtenu a été congelé à -80°C jusqu'au dosage des médiateurs. Les culots cellulaires de l'ensemble des lavages ont été remis en suspension dans du sérum physiologique-EDTA et utilisés pour le comptage des cellules totales et différentielles. Après recueil des LBA, les poumons, perfusés *in situ* avec du PBS, ont été prélevés. La partie plurilobée de l'organe a été immédiatement congelée dans l'azote liquide, puis stockée à -80°C jusqu'à la préparation des homogénats en vue du dosage des médiateurs. La partie unilobée du poumon a été fixée dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (dans du tampon PBS) pendant 24 h à 4°C pour l'histologie.

V.4. Dosage des immunoglobulines dans le sérum

Les concentrations sériques en IgG1 totales et en IgG1 spécifiques des allergènes d'acariens ont été déterminées par *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA).

Pour la détermination des IgG1 totales, un anticorps anti-IgG1 de souris dilué à 2 µg/mL dans du PBS (clone A 85-3, BD Biosciences, Le pont de Claix, France) a été adsorbé sur des microplaques 96 puits pendant une nuit à 4°C. Les plaques ont ensuite été bloquées avec du PBS contenant 1% d'ASB (PBS-ASB) pendant 2h à température ambiante. Les sérums à analyser ou le standard d'IgG1 de souris (clone MOPC-31C, BD Biosciences) dilués dans du PBS-ASB ont été incubés pendant une nuit à 4°C. Les plaques ont ensuite été incubées à température ambiante successivement avec un anticorps biotinylé anti-IgG1 de souris (clone A 85-1, BD Biosciences) pendant 1 h, puis un conjugué extravidine-péroxydase de radis noir (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes. Le substrat tetraméthylbenzidine (TMB, BD Biosciences) a été ajouté et la réaction de coloration a été arrêtée par addition d'acide H_2SO_4 à 0,5 M. L'absorbance a été mesurée à 450 nm avec une correction à 570 nm. Les concentrations en IgG1 totales ont été exprimées en µg/mL.

Pour la détermination des IgG1 spécifiques des allergènes d'acariens, une quantité d'extrait d'acariens correspondant à 0,25 µg de Der p1/puits (dans du tampon bicarbonate 0,1 M, pH 9,6) a été adsorbé sur des microplaques 96 puits pendant une nuit à 4°C. Les plaques ont ensuite été bloquées avec du PBS contenant 1% d'ASB (PBS-ASB) pendant 2 h à température ambiante. Les sérums ont été dilués dans du PBS-ASB et incubés pendant une nuit à 4°C. Selon le même protocole que précédemment, les plaques ont ensuite été incubées à température ambiante successivement avec un anticorps biotinylé anti-IgG1 de souris (clone A 85-1, BD Biosciences) pendant 1h et avec un conjugué extravidine-péroxydase de radis noir (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes. Le substrat TMB (BD Biosciences) a été ajouté et la réaction de coloration a été arrêtée par addition d'acide H_2SO_4 à 0,5 M. L'absorbance a été mesurée à 450 nm avec une correction à 570 nm. Les concentrations en IgG1 spécifiques ont été exprimées en unités arbitraires.

V.5. Comptage des cellules totales et différentielles dans les LBA

Les cellules contenues dans les LBA ont été récupérées par centrifugation (200 g, 5 min, 4°C). Les érythrocytes ont été lysés par choc hypotonique, puis les cellules ont été remises en suspension dans 0,5 mL de sérum physiologique contenant 2,6 mM d'EDTA. Le comptage des cellules totales a été réalisé à l'aide d'un hémocytomètre (chambre de Neubauer). La suspension cellulaire a été ensuite diluée pour obtenir une concentration d'environ 250 000 cellules par mL, puis 200 µL de cette suspension diluée ont été cytocentrifugés (Cytospin® 4 Shandon, Thermo-Scientific). Les préparations cytologiques ainsi obtenues ont été ensuite colorées à l'hématoxyline/éosine (Microscopy Hemacolor®, Merck, Darmstadt, Allemagne). Le comptage des cellules différentielles a été effectué sur ces préparations cytologiques en dénombrant au moins 400 cellules par préparation. Les cellules ont été différenciées en macrophages, neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes et ont été exprimées en nombre absolu à partir du nombre total de cellules.

V.6. Préparation des homogénats de poumon

Des homogénats ont été préparés à partir du lobe droit du poumon, afin de réaliser les mesures des cytokines, du collagène, de TIMP-1, des ERO et du contenu en mucines. Les poumons congelés ont été broyés dans 2 mL de PBS contenant des inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free tablets, Roche, Allemagne) en utilisant un Ultra-Turrax (T25, Ika, Staufen, Allemagne). Les homogénats obtenus ont été centrifugés (12 000 g, 15 min, 4°C) avant dosage des différents médiateurs.

V.7. Dosage des cytokines

Les cytokines ont été quantifiées dans les LBA et/ou les homogénats de poumon par ELISA à l'aide de kits commerciaux conformément aux instructions des fabricants (BD Biosciences ou R&D Systems, Lille, France). Le TNF-α, KC, l'IL-17, l'éotaxine et le TGF-β1 sous forme totale ont été mesurés dans les LBA (BD Biosciences pour le TNF-α, KC et IL-17 ; R&D Systems pour l'éotaxine et le TGF-β1). L'IL-13, l'éotaxine, TARC, TSLP, GM-CSF, IL-25, IL-33 et IL-1β ont été mesurés dans les homogénats de poumon (R&D Systems).

V.8. Dosage du collagène

Le contenu en collagène a été évalué dans les homogénats de poumon en quantifiant le collagène soluble total à l'aide du kit commercial *Sircol Collagen Assay kit* (Biocolor, Carrickfergus, Royaume-Uni), conformément aux instructions du fabricant.

V.9. Dosage de la MMP-9 et de TIMP-1

Les concentrations en MMP-9 (métalloprotéinase-9 matricielle) sous forme totale (MMP-9 active et pro-MMP-9) dans les LBA et en TIMP-1 (inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-1) dans les homogénats de poumon ont été mesurées par méthode ELISA à l'aide de kits commerciaux conformément aux instructions des fabricants (R&D Systems).

V.10. Mesure du contenu en mucines

Le contenu en mucines a été déterminé dans les homogénats de poumon par *Enzyme-Linked Lectin Assay* (ELLA) en utilisant la lectine de *Triticum vulgaris* (Wheat germ agglutinin, WGA) spécifique de la N-acetylglucosamine. Cent microlitres d'homogénats de poumon dilués dans du PBS ont été adsorbés sur des microplaques 96 puits pendant 2h à 37°C. Les plaques ont ensuite été bloquées avec du PBS contenant 0,05% de Tween et 1% d'ASB pendant 1h à 37°C. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 1h à 37°C avec la lectine conjuguée à une péroxydase de radis noir (WGA-HRP, Sigma-Aldrich) diluée à 1 µg/mL dans du PBS contenant 0,05% de Tween. Le substrat TMB a été ajouté et la réaction de coloration a été arrêtée par addition d'acide H_2SO_4 à 0,5 M. L'absorbance a été mesurée à 450 nm avec une correction à 570 nm. Le contenu en mucines a été exprimé en unités arbitraires.

V.11. Mesure de la production d'ERO

La production d'ERO a été mesurée dans les homogénats de poumon en utilisant la sonde 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate (H_2DCF-DA, Molecular Probes®), selon le protocole décrit par Ravichandran *et al.* (Ravichandran *et al.*, 2011). Cette sonde non fluorescente est convertie, en présence d'espèces oxydantes, en 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF), qui est une molécule hautement fluorescente. Vingt-cinq microlitres d'homogénats de poumon ont été mélangés à 75 µL de PBS contenant la sonde H_2DCF-DA à 20 µM. La fluorescence des échantillons a été mesurée après 30 minutes d'incubation à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde d'émission de 525 nm à l'aide d'un fluorimètre Spectra Max Gemini XPS (Molecular Devices). Les résultats ont été exprimés en unités de fluorescence.

V.12. Histologie

Les poumons fixés (paraformaldéhyde à 4%, 24h, 4°C) ont été rincés dans du PBS, déshydratés dans des bains successifs d'alcool, puis inclus en paraffine selon des procédures histologiques standards. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (RM 2245, Leica Microsystems). Les coupes ont ensuite été colorées à l'hématoxyline-éosine, qui permet de visualiser les structures histologiques et les cellules inflammatoires, au trichrome Masson afin d'examiner le dépôt de collagène, ou encore à l'acide périodique et au réactif de Schiff (PAS), qui permettent de visualiser les mucines. Les coupes ont été observées par macroscopie optique (M420, Leica Microsystems) et/ou microscopie optique (DM 4000B, Leica Microsystems) et ont été photographiées à l'aide d'une caméra couleur (CoolSNAP Photometrics) couplée à un système d'acquisition d'images (CoolSNAP).

V.13. Analyses statistiques des données

Les données ont été présentées sous la forme de moyennes +/- l'erreur-type de la moyenne (SEM). Les différences entre les groupes ont été analysées par une analyse de la variance univariée (ANOVA) suivie d'un test de Tukey ou d'un test de Dunnett, en utilisant le logiciel GraphPad Prism 4.0. Les différences ont été considérées comme significativement différentes pour des valeurs de $p<0,05$.

Tableau 5. Exemple d'agents utilisés dans la littérature pour disperser des NTC bruts en vue d'études toxicologiques *in vivo.*

Agent dispersant	Référence
DPPC	Sager *et al*., 2007
Albumine	Bihari *et al*., 2008 ; Elgrabli et *al*., 2007
Liquides de lavage bronchoalvéolaire	Sager et *al*., 2007
Sérum	Bihari *et al.,* 2008 ; Buford *et al*., 2007 ; Lam *et al*., 2004
SDS	Park *et al*., 2011
Tween 80®	Kobayashi *et al*., 2010 ; Muller *et al*., 2005 ; Warheit *et al*., 2004
Pluronic®	Mutlu *et al*., 2010

Chapitre 3 – Résultats

Partie A – Mise au point d'une méthode de dispersion des NTC

A.I. Introduction

Du fait des forces de Van der Waals, les NTC bruts, qui sont des particules hydrophobes, ont tendance à s'agréger dans les milieux physiologiques aqueux utilisés comme véhicule dans les études toxicologiques. Or, l'état de dispersion des NTC pourrait influencer leur dépôt et leurs effets biologiques dans le poumon (voir Partie C.III.3. de l'Introduction). Par ailleurs, des études ont rapporté la survenue d'une mort par obstruction des voies aériennes chez des animaux exposés à des NTC non dispersés (Lam *et al.*, 2004; Warheit *et al.*, 2004). **Ainsi, le développement de méthodes de dispersion est un élément essentiel pour l'évaluation toxicologique des NTC bruts dans les voies respiratoires.**

Différentes stratégies ont été expérimentées dans la littérature pour tenter de disperser des NTC bruts dans des milieux physiologiques, comme le sérum physiologique (NaCl 0,9%) ou le tampon phosphate salin (PBS). Ces stratégies reposent sur la dispersion par sonication en présence d'un **agent dispersant** (**Tableau 5**). Parmi les agents utilisés, on retrouve des phospholipides comme la DPPC, qui est le principal lipide du surfactant pulmonaire et qui possède des propriétés tensio-actives (Sager *et al.*, 2007), des protéines comme l'albumine, qui est la protéine la plus abondante du surfactant pulmonaire (Elgrabli *et al.*, 2007; Bihari *et al.*, 2008), les LBA (Sager *et al.*, 2007) ou encore le sérum (Lam *et al.*, 2004; Buford *et al.*, 2007; Bihari *et al.*, 2008). Pour certains auteurs, le recours à un détergent serait essentiel pour permettre une dispersion des NTC. L'utilisation du SDS (Park *et al.*, 2011), du Tween 80® (Warheit *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2010) ou du Pluronic® (Cesta *et al.*, 2010; Mutlu *et al.*, 2010) a ainsi été rapportée.

Cependant, certaines de ces stratégies ne se sont pas révélées satisfaisantes en termes de dispersion des NTC ou ont fait appel à des agents non physiologiques et/ou potentiellement toxiques.

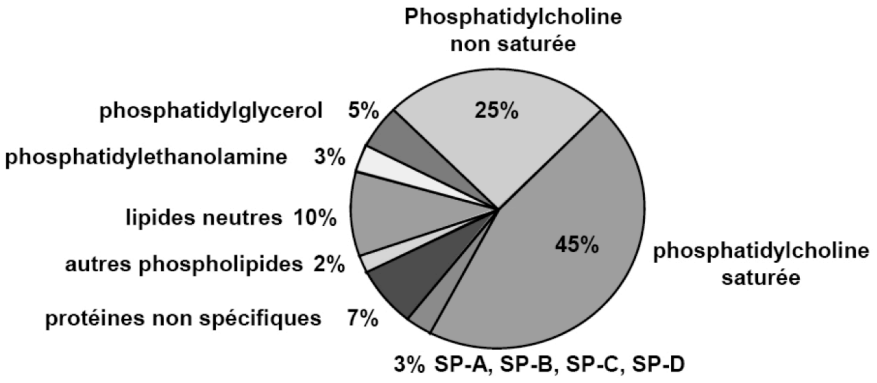


Figure 26. Composition du surfactant pulmonaire. Le surfactant pulmonaire est un complexe lipoprotéique qui est constitué à 10% de protéines (dont majoritairement l'albumine) et à 90% de lipides, dont 75% de phospholipides incluant de la DPPC (70%), du phosphatidylglycérol (PG, 5%) et des lipides neutres (dont du cholestérol, 10%).

A.II. Objectifs

Le but de cette première partie du travail de thèse a été d'identifier un agent dispersant des NTC bruts, efficace et compatible avec la voie respiratoire. Pour cela, la capacité à disperser les NTC d'agents décrits dans la littérature a été comparée à celle de deux milieux élaborés au cours de ce travail.

• En prenant appui sur ce qui avait déjà été **décrit dans la littérature**, des dispersions de NTC ont été préparées dans du NaCl contenant : un **phospholipide** (DPPC 0,1%), un **détergent** seul (Pluronic® 1% ou SDS 1%) ou une **protéine** (albumine 0,5%).

• En parallèle, un premier système de dispersion des NTC basé sur un **mélange phospholipide - détergent** a été imaginé. Ce genre de système est utilisé notamment dans la préparation de vésicules lipidiques pour des applications pharmaceutiques (encapsulation de principe actif, thérapie génique) ou dans la reconstitution de membranes protéo-lipidiques, utilisées en recherche comme modèle des membranes cellulaires (Ollivon *et al.*, 2000; de Jonge *et al.*, 2006; Andrieux *et al.*, 2009). L'idée était ici de disperser les NTC dans le mélange phospholipide-détergent, le détergent rendant possible la dispersion et l'organisation des phospholipides autour des NTC, puis d'éliminer le détergent par dialyse, afin d'obtenir une dispersion finale des NTC uniquement en présence de phospholipides. Les NTC ont donc été préparés dans du NaCl contenant un mélange (0,1%/1%) de DPPC (lipide)/cholate de sodium (détergent que nous savions dialysable contrairement au Pluronic® par exemple). La dispersion a ensuite été dialysée de manière à éliminer le cholate de sodium.

• Une deuxième approche imaginée pour rendre possible la dispersion des NTC en utilisant un milieu compatible avec la voie respiratoire, a été d'élaborer un surfactant pulmonaire synthétique. En effet, le surfactant pulmonaire est l'interface naturelle que les NP inhalées vont rencontrer lors de leur contact avec les bronchioles et les alvéoles pulmonaires. Dans cette démarche, trois alternatives étaient possibles : l'utilisation de LBA issus d'animaux donneurs (Sager *et al.*, 2007), l'utilisation de surfactants commerciaux utilisés en thérapie de remplacement (Wang *et al.*, 2010a) ou la préparation d'un surfactant pulmonaire synthétique. Nous avons choisi de concevoir **un surfactant synthétique basé sur la composition du surfactant pulmonaire**, ce qui nous permettait de travailler avec une préparation de composition définie et reproductible. À notre connaissance, cette stratégie n'a jamais été investiguée jusqu'ici. Le surfactant pulmonaire est un complexe lipoprotéique constitué à 10% de protéines, dont principalement de l'albumine, et à 90% de

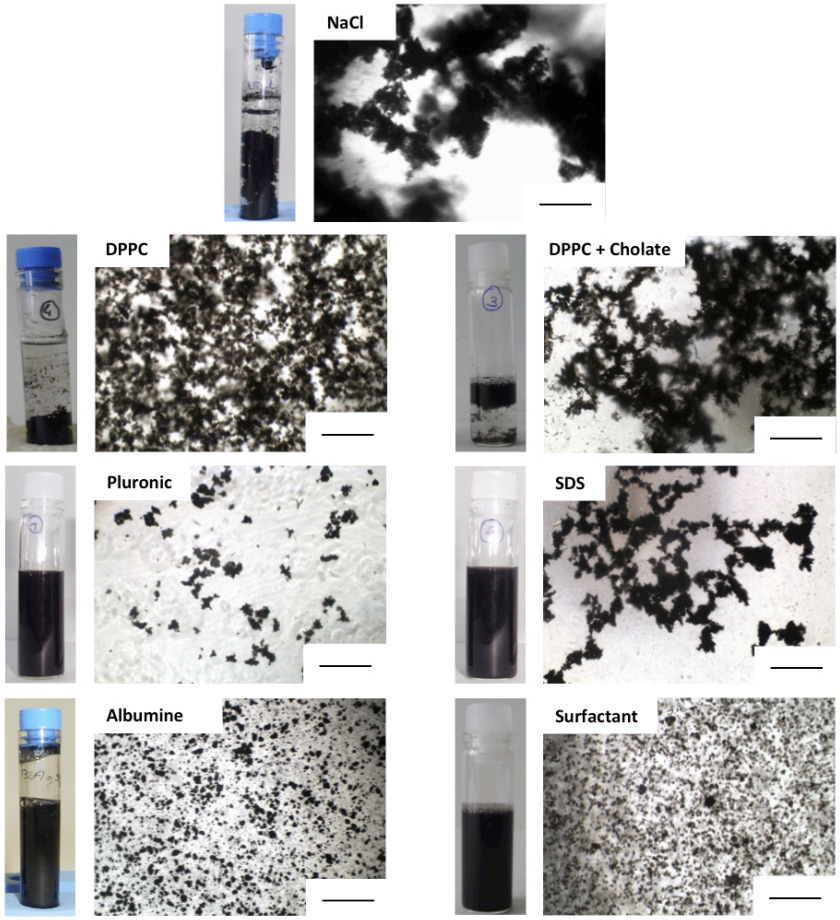


Figure 27. Observations visuelles et en MO en lumière blanche des NTC dispersés dans du NaCl seul, dans du NaCl contenant de la DPPC, un mélange DPPC/cholate de sodium, du Pluronic®, du SDS ou de l'albumine, ou dispersés dans le surfactant. Les dispersions de NTC (0,25 mg/mL) ont été préparées selon la description de la partie Matériel et Méthodes. Échelle = 250 µm.

Tableau 6. Résumé des données de caractérisation des dispersions de NTC selon l'agent dispersant utilisé.

Agent dispersant	Dispersion [a] (Observation visuelle)	Agrégats [b] (Microscopie optique)	Stabilité [c] (Observation visuelle)
NaCl	non	++++	non
DPPC	non	+++	non
DPPC / Cholate (après dialyse détergent)	non	+++	non
Pluronic®	oui	++	oui
SDS	oui	+++	oui
Albumine	oui	+	non
Surfactant	oui	+	oui

Les dispersions de NTC (0,25 mg/mL) ont été préparées selon la description de la partie Matériel et Méthodes.
[a] Oui = dispersion ; Non = absence de dispersion
[b] Taille des agrégats observés
[d] Oui = maintien de la dispersion ; Non = sédimentation des NTC

lipides, dont 75% de phospholipides incluant de la DPPC (70%), du phosphatidylglycérol (PG, 5%) et des lipides neutres (dont du cholestérol, 10%) (**Figure 26**) (Goerke, 1998; Veldhuizen *et al.*, 1998). **En nous basant sur cette composition, nous avons formulé un surfactant synthétique constitué de DPPC (70%), PG (10%), Chol (10%) et albumine (10%)**.

A.III. Résultats

A.III.1. Comparaison des différents agents dispersants utilisés

Les NTC ont été dispersés dans du NaCl seul, dans du NaCl contenant les différents agents dispersants (DPPC, mélange DPPC/cholate de sodium, Pluronic®, SDS ou albumine) ou encore dans le surfactant pulmonaire, selon la description de la partie Matériel et Méthodes. Les dispersions ont ensuite été caractérisées par observation visuelle et par MO en lumière blanche juste après leur préparation, ou 24h après pour l'évaluation de leur stabilité.

L'**observation visuelle** des suspensions permet de constater une dispersion des NTC avec le surfactant, ainsi qu'en présence d'albumine, de Pluronic® ou de SDS (**Figure 27**). Ces dispersions sont restées stables à 24h dans le cas du Pluronic®, du SDS et du surfactant (**Tableau 6**). En revanche, aucune dispersion des NTC n'est obtenue dans le NaCl seul, le NaCl contenant de la DPPC ou le mélange DPPC/cholate de sodium. Dans ce dernier cas, il y a bien eu dispersion des NTC dans le mélange DPPC/cholate de sodium, mais cette dispersion n'est pas restée stable après la dialyse du cholate de sodium.

L'observation des dispersions en **MO en lumière blanche** révèle la présence d'agglomérats grossiers de NTC quel que soit le milieu de dispersion utilisé (**Figure 27**). Cependant, la taille de ces agglomérats est plus petite dans les dispersions préparées dans le surfactant ou l'albumine, que dans celles réalisées dans le Pluronic® ou le SDS.

En résumé, ces premiers résultats montrent que quatre des agents dispersants évalués (le Pluronic®, le SDS, l'albumine et le surfactant) permettent d'obtenir une dispersion des NTC, mais que pour deux d'entre eux (le surfactant et l'albumine) les agglomérats de NTC encore présents apparaissent nettement plus petits. Ainsi, les dispersions dans le surfactant et l'albumine ont fait l'objet d'une caractérisation approfondie.

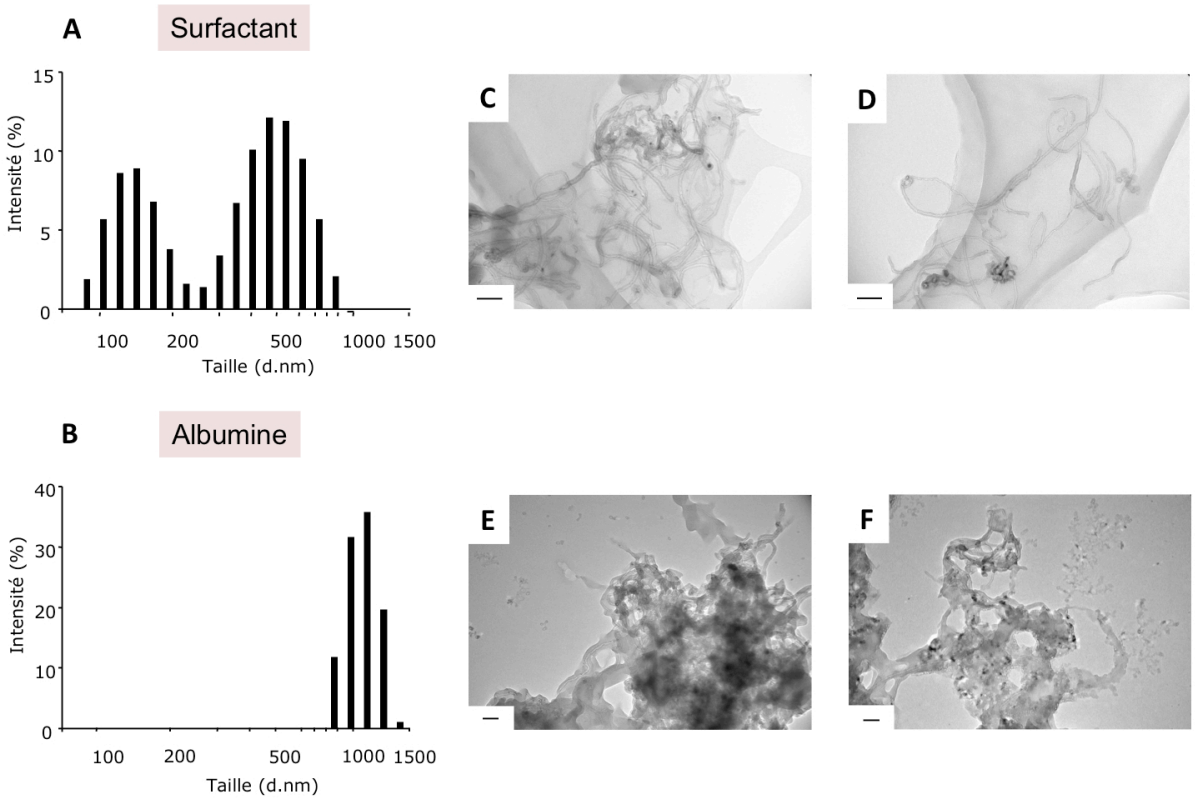


Figure 28. Distribution représentative de la taille des particules de NTC dispersés dans le surfactant (**A**) ou l'albumine (**B**), analysée par DLS. Images représentatives de MET des NTC dispersés dans le surfactant (**C** et **D**) ou l'albumine (**E** et **F**). Les NTC dispersés dans le surfactant sont organisés en agglomérats (C) ou individualisés (D), alors que les NTC dispersés dans l'albumine forment des agglomérats larges et denses (E et F). Échelle = 100 nm.

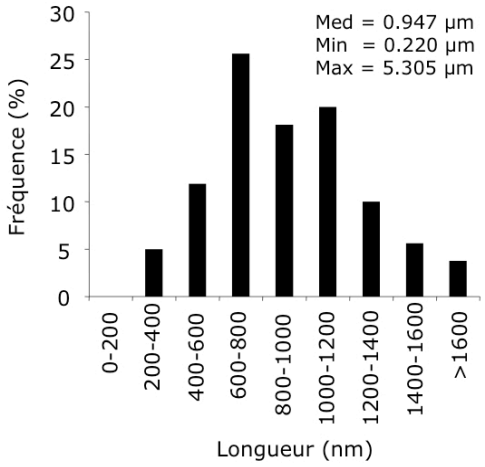


Figure 29. Distribution de la longueur des NTC après dispersion dans le surfactant. L'analyse de la taille des NTC individualisés a été réalisée à partir d'images de MET.

A.III.2. Caractérisation approfondie des dispersions dans le surfactant ou l'albumine

Les dispersions de NTC dans le surfactant ou en présence d'albumine ont ensuite été analysées par **DLS**. La distribution de la taille des particules ainsi obtenue indique la présence de deux populations de particules dans le cas d'une dispersion des NTC dans le surfactant, avec des tailles moyennes de 150 et 500 nm (révélant une hétérogénéité de la taille des particules), alors qu'une seule population de particules, avec une taille moyenne proche du micromètre, est observée en présence d'albumine (**Figure 28 A et B**).

Pour compléter cette évaluation, des observations en **MET** ont été réalisées afin de visualiser l'organisation des NTC dans les dispersions. Ainsi, les images de MET des dispersions dans le surfactant montrent la présence de NTC organisés en agglomérats, ainsi que sous une forme individualisée (**Figure 28 C et D**). Cela pourrait refléter les deux populations de taille de particules détectées par DLS. En comparaison, les NTC dispersés en présence d'albumine forment essentiellement des agglomérats, qui apparaissent plus larges et plus denses (**Figure 28 E et F**). Ces agglomérats semblent entourés d'une « gaine » : il pourrait s'agir de l'albumine présente à plus haute concentration dans ce milieu de dispersion (0,5%) comparée au surfactant (0,014%).

Enfin, afin d'évaluer la préservation de **l'intégrité** des NTC au cours de leur dispersion, la taille des NTC individualisés a été analysée à partir des images de MET des dispersions dans le surfactant. Cette analyse indique que le diamètre extérieur moyen des NTC est de 13 nm (résultats non montrés) et que la distribution de la longueur des NTC va de 0,22 µm à 5,30 µm, avec une valeur médiane de 0,95 µm (**Figure 29**). Ces caractéristiques sont en accord avec les caractéristiques données par le fournisseur (description dans la partie Matériel et Méthodes) et suggèrent une préservation de l'intégrité des NTC au cours du processus de dispersion des NTC dans le surfactant.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que le surfactant pulmonaire synthétique développé constitue un agent de dispersion des NTC satisfaisant en regard des autres agents évalués. Il a donc été utilisé comme véhicule des NTC dans la suite de notre travail.

Partie B – Étude de la biodistribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris

B.I. Introduction

Comme nous l'avons vu en introduction, la toxicité respiratoire des particules dépend fortement de leur devenir dans l'arbre respiratoire. Ainsi, l'étude de la biodistribution des NTC dans les voies aériennes fait partie intégrante de l'évaluation de leur impact toxicologique sur le poumon.

B.II. Objectifs

Le but de cette deuxième partie du travail de thèse a été d'étudier la distribution spatiale des NTC dans le poumon des souris après leur administration par voie respiratoire. Comme nous l'avons vu dans la partie introductive, des NTC marqués par des fluorophores ou des NTC non marqués peuvent être utilisés pour étudier la biodistribution des NTC *in vitro* ou *in vivo.* Dans notre travail, ces deux approches ont été utilisées. **Un premier objectif**, avec les NTC marqués, était de développer une approche innovante en termes, à la fois de marquage des NTC par des fluorophores et d'analyse de leur distribution dans les tissus. Ainsi, l'approche de marquage devait se différencier notablement des travaux menés jusque là dans la littérature, travaux, qui nous l'avons vu, ont généralement fait appel à des NTC fonctionnalisés par des oxydants forts, et donc à des NTC aux propriétés fortement altérées en terme de taille et d'hydrophobie (voir Partie B.II.3.1.2 de l'Introduction). Pour la détection, il s'agissait de réaliser une analyse multi-échelle continue (de l'organe à la cellule) de la distribution des NTC dans le poumon, grâce à des systèmes de macro- et microscopie de fluorescence disponibles au centre d'imagerie de l'IGBMC. **Le deuxième objectif** avec les NTC non marqués était de faire appel à des méthodes déjà largement utilisées pour étudier la biodistribution des NTC *in vivo*.

1) Pour mettre en œuvre notre premier objectif, une série de **NTC ont été marqués à l'aide de fluorophores**. Ce marquage, réalisé par l'équipe de Chimie Organique Appliquée de l'UMR 7199, devait répondre à trois impératifs. Tout d'abord, il devait modifier aussi peu que possible les propriétés intrinsèques des NTC, en particulier leur solubilité et leur taille. Ensuite, il devait faire appel à un marqueur de longueurs d'onde d'excitation et d'émission élevées (proche de 650 nm), afin de minimiser l'interférence entre l'auto-fluorescence du milieu biologique et le marquage. Enfin, le marquage devait permettre d'obtenir un signal de fluorescence d'intensité suffisante pour une observation *in vivo*.

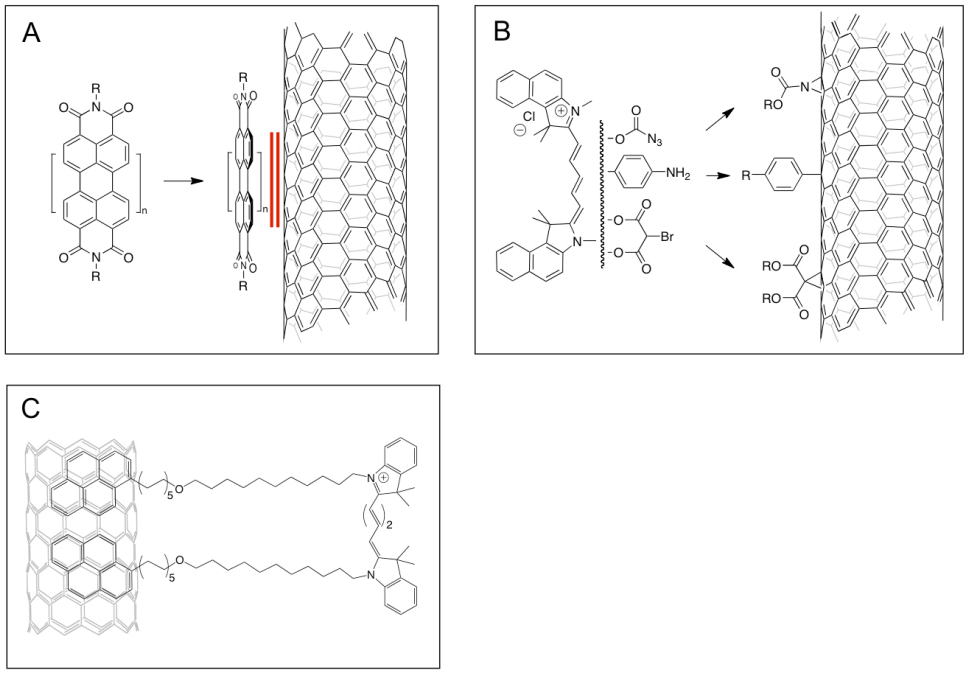


Figure 30. Stratégies de marquage des NTC par des fluorophores. **A** : NTC marqués de façon non covalente par adsorption (π-stacking) de composés polyaromatiques hydrophobes de type terrylène. **B** : NTC marqués de façon covalente par des fluorophores hydrophiles (dérivés des cyanines Cy5) après une modification chimique de la surface des NTC. **C** : NTC marqués de façon non covalente par adsorption des fluorophores hydrophiles de type Cy5 grâce à des motifs polyaromatiques.

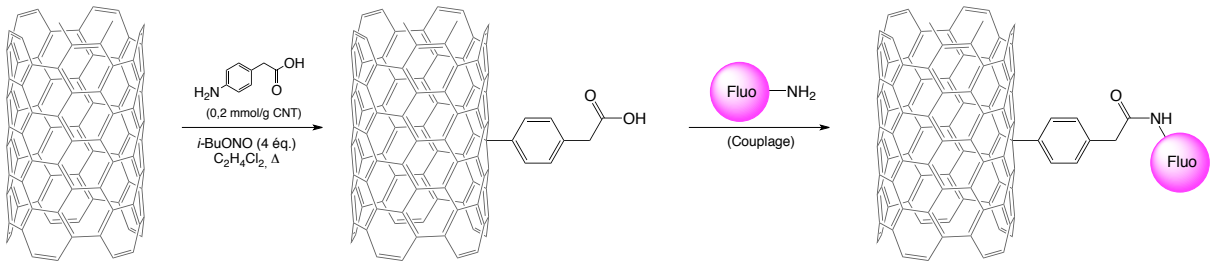


Figure 31. Fonctionnalisation covalente des NTC par réaction avec un sel de diazonium (2ème stratégie de marquage). Le taux de fonctionnalisation obtenu est contrôlé par la quantité d'amine aromatique mise en jeu.

Ainsi, en partant de NTC à l'état brut (i.e. n'ayant subi aucun traitement par des oxydants forts), plusieurs stratégies de marquage, permettant de moduler la nature du fluorophore (hydrophobe ou hydrophile), le mode d'ancrage du fluorophore aux NTC (covalent ou non covalent) et la densité de marquage des NTC, ont été explorées (**Figure 30)**.

• La première stratégie a consisté à adsorber par **π-stacking** (ancrage non covalent) à la surface des NTC des composés polyaromatiques **hydrophobes** de type terrylène (marqueurs au profil photophysique adéquat) (**Figure 30 A**).

• La deuxième stratégie a consisté à **greffer** (ancrage covalent) sur la surface des NTC des fluorophores **hydrophiles** dérivés des cyanines Cy5 (marqueurs qui absorbent à une longueur d'onde proche de 650 nm), *via* un bras d'ancrage de longueur variable, afin d'éviter ou de limiter un éventuel effet de quenching de fluorescence du fluorophore du fait de la proximité du NTC (voir Partie B.II.3.1.2 de l'Introduction). Ce greffage a nécessité une fonctionnalisation chimique préalable des NTC. Cette fonctionnalisation a été réalisée par réaction avec un sel de diazonium (**Figure 31**), permettant de contrôler le taux de fonctionnalisation, et donc de modifier aussi peu que possible les propriétés intrinsèques des NTC (**Figure 30 B**).

• Enfin, une troisième stratégie a consisté à conjuguer le fluorophore Cy5 avec un motif polyaromatique capable de s'adsorber à la surface des NTC, afin d'aboutir à des NTC marqués de façon non covalente par des fluorophores hydrophiles (**Figure 30 C**). Un bras entre le motif polyaromatique et le fluorophore permet d'augmenter la distance entre le marqueur et le NTC.

Notre travail, dans cette première approche, a consisté à étudier par **MCF** les différents conjugués NTC-fluorophore élaborés (sous la forme de poudres sèches, de dispersions dans du surfactant ou encore après incubation *in vitro* sur des cellules HeLa en culture), afin d'identifier les objets susceptibles de présenter un profil photophysique et une intensité de signal de fluorescence adéquats.

2) Le deuxième objectif a été de mener une étude de la distribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris, en utilisant des approches basées sur la détection des **NTC non marqués.**

• La **MO** en lumière blanche et la **MET** ont tout d'abord été utilisées pour rechercher et analyser la présence de NTC à l'échelle tissulaire, cellulaire et subcellulaire sur des coupes de poumon de souris exposées à des NTC non marqués.

• La **microscopie confocale IR** a été exploitée dans un deuxième temps pour tenter de cartographier la distribution des NTC à l'échelle de coupes entières de poumon.

Cette étude de distribution a été menée chez des souris exposées aux NTC seuls (Partie C des Résultats) et chez des souris exposées aux allergènes d'acariens et aux NTC (Partie D des Résultats). Le travail d'imagerie réalisé pour ces études de biodistribution a été mené en collaboration avec la plateforme d'imagerie de l'IGBMC (Dir. : J-L Vonesch).

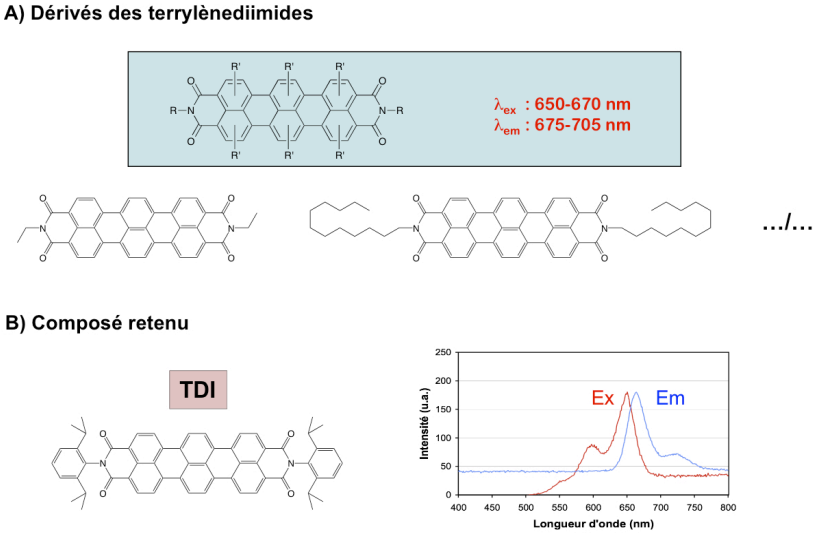


Figure 32. A : Structure des marqueurs synthétisés pour le marquage des NTC par π-stacking et **B** : Structure et spectres d'excitation et d'émission du composé retenu.

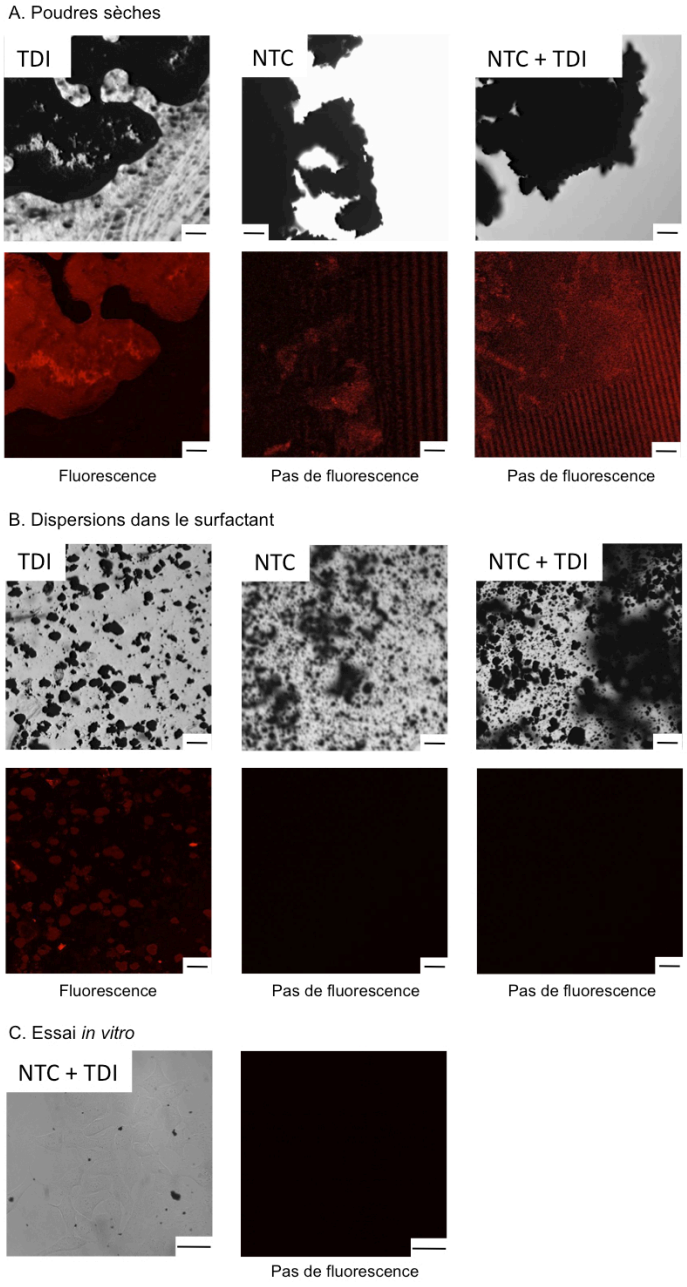


Figure 33. Observations en MO en lumière transmise et MCF du TDI, des NTC bruts et des NTC marqués par π-stacking. A : poudres sèches et **B** : dispersions (0,25 mg/mL) dans le surfactant (conjugué NTC-TDI présentant une charge de 10^{-8} mole/g de NTC) (échelle = 50 µm). **C** : cellules HeLa exposées pendant 24 h au conjugué NTC-TDI (charge de 10^{-4} mole/g, concentration d'exposition : 10 µg/mL) (échelle = 10 µm). Les observations en MCF ont été réalisées après excitation des échantillons à 633 nm.

B.III. Résultats

B.III.1. Données issues des travaux sur les NTC marqués par des fluorophores

Ce sous-chapitre présente les données issues des travaux portant sur les NTC marqués par des fluorophores selon les trois stratégies de marquage décrites ci-dessus.

B.III.1.1. Marquage non covalent des NTC par des fluorophores hydrophobes

La première étape du marquage non covalent (π-stacking) des NTC a consisté à préparer une série de composés polyaromatiques hydrophobes de type terrylène (**Figure 32 A**) et à étudier les propriétés spectrales de ces composés. Cette première étape a permis de sélectionner un composé fluorescent, appelé TDI, possédant des propriétés spectrales adéquates pour notre étude. En effet, comme le montrent les spectres d'excitation et d'émission de ce composé **(Figure 32 B)**, celui-ci absorbe à des longueurs d'onde élevées (autour de 650 nm), ce qui est une condition requise pour des observations *in vivo*.

Une série de conjugués NTC-TDI, présentant des charges de fluorophore variant de 10^{-4} à 10^{-11} mole par gramme de NTC ont ensuite été préparés et observés en MCF. Les résultats obtenus avec les conjugués présentant une charge de fluorophore de 10^{-4} et 10^{-8} mole/g de NTC sont présentés à la **figure 33** à titre d'illustration. Les observations ont tout d'abord été conduites sur les poudres sèches de fluorophore TDI, de NTC et des conjugués NTC-TDI. Les résultats obtenus montrent que, s'il y a bien un signal de fluorescence détecté sur l'échantillon de poudre de TDI, aucun signal n'est décelé sur l'échantillon de poudre des conjugués NTC-TDI (**Figure 33 A**). Dans un second temps, les mêmes observations ont été réalisées sur des dispersions de TDI, de NTC et de conjugués NTC-TDI préparées dans le surfactant pulmonaire. Les résultats montrent ici aussi un signal de fluorescence dans les dispersions de TDI seul et une **extinction totale de fluorescence** lorsque le fluorophore est adsorbé sur les NTC (**Figure 33 B**). Enfin, des observations en MCF ont été réalisées sur des cellules HeLa exposées pendant 24h aux conjugués NTC-TDI dispersés dans le milieu de culture. Là encore, aucun signal de fluorescence n'est constaté, ni à l'intérieur, ni à l'extérieur des cellules (**Figure 30 C**).

Ainsi, l'adsorption du fluorophore hydrophobe TDI à la surface des NTC induirait une extinction quasi totale de sa fluorescence. Ce phénomène pourrait résulter d'un transfert d'énergie d'excitation du fluorophore au NTC. C'est pourquoi l'utilisation d'une sonde hydrosoluble n'interagissant pas directement avec la surface des NTC,

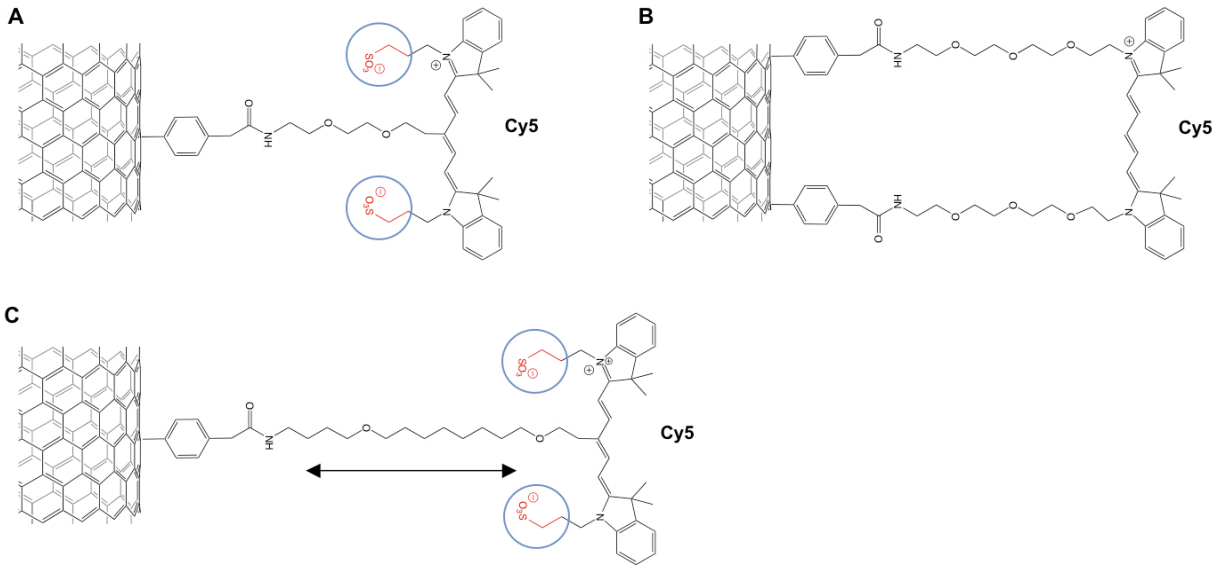


Figure 34. Exemples de constructions NTC-Cy5 élaborées au cours de la 2ème stratégie de marquage. **A et C** : présence de groupements sulfonates permettant d'augmenter l'hydrophilie du marqueur. **B** : modulation du mode de fixation du marqueur. **C** : augmentation de la longueur du bras d'ancrage aux NTC.

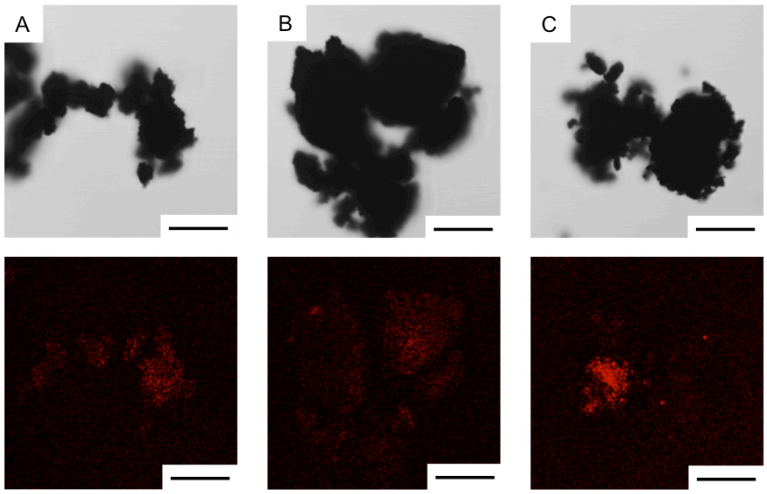


Figure 35. Observations en MO en lumière transmise et MCF des poudres sèches de conjugués NTC-Cy5 A, B et C décrits à la figure précédente. Les observations en MCF ont été réalisées après excitation des échantillons à 633 nm (échelle = 25 µm).

mais fixée de façon covalente *via* un bras d'ancrage, a été envisagée dans la deuxième stratégie de marquage.

B.III.1.2. Marquage covalent des NTC par des fluorophores hydrophiles

Cette deuxième stratégie de marquage a demandé la synthèse d'une série de conjugués NTC-fluorophores de type Cy5, dans laquelle l'hydrophilie du fluorophore (**Figure 34 A**), son mode de fixation (**Figure 34 B**), ainsi que la longueur du bras permettant son ancrage aux NTC (**Figure 34 C**) ont été modulés. En effet, l'état d'hydratation d'un fluorophore hydrophile n'étant pas compatible avec l'hydrophobie de la surface des NTC, il est attendu que les deux entités se repoussent et se maintiennent à distance l'une de l'autre, minimisant ainsi les phénomènes de transfert d'énergie observés précédemment (ces phénomènes étant fonction de la distance qui sépare les deux entités). Les fluorophores Cy5 synthétisés ont été immobilisés de façon covalente sur des NTC préalablement fonctionnalisés par diazotation. Ceci a permis de produire une dizaine de conjugués NTC-Cy5 présentant des charges de fluorophores variant de 0,014 à 0,12 mmole par gramme de NTC (déterminées par analyse thermogravimétrique).

L'observation de ces conjugués en MCF et en MO en lumière transmise a ensuite été réalisée. Les résultats obtenus pour les conjugués décrits à la figure 34 sont présentés à la **figure 35** à titre d'illustration. Un signal de fluorescence a été détecté sur les trois échantillons à l'état de poudre. Nous avons vérifié que ce signal correspondait bien au signal spécifique du fluorophore Cy5, en réalisant un spectre d'émission sur chacun des échantillons après leur excitation à une longueur d'onde de 633 nm (résultats non montrés). Cependant, le signal de florescence observé sur ces échantillons était d'**intensité trop faible** pour pouvoir être exploitable dans le cadre d'une étude de distribution chez la souris. Par ailleurs, des observations en MCF ont également été réalisées sur des cellules HeLa exposées à ces conjugués NTC-Cy5, mais aucun signal de fluorescence n'a été constaté (résultats non montrés).

L'observation en MCF des NTC marqués de façon covalente par des fluorophores hydrophiles n'a pas permis d'obtenir une intensité de signal exploitable pour l'étude de distribution *in vivo* envisagée.

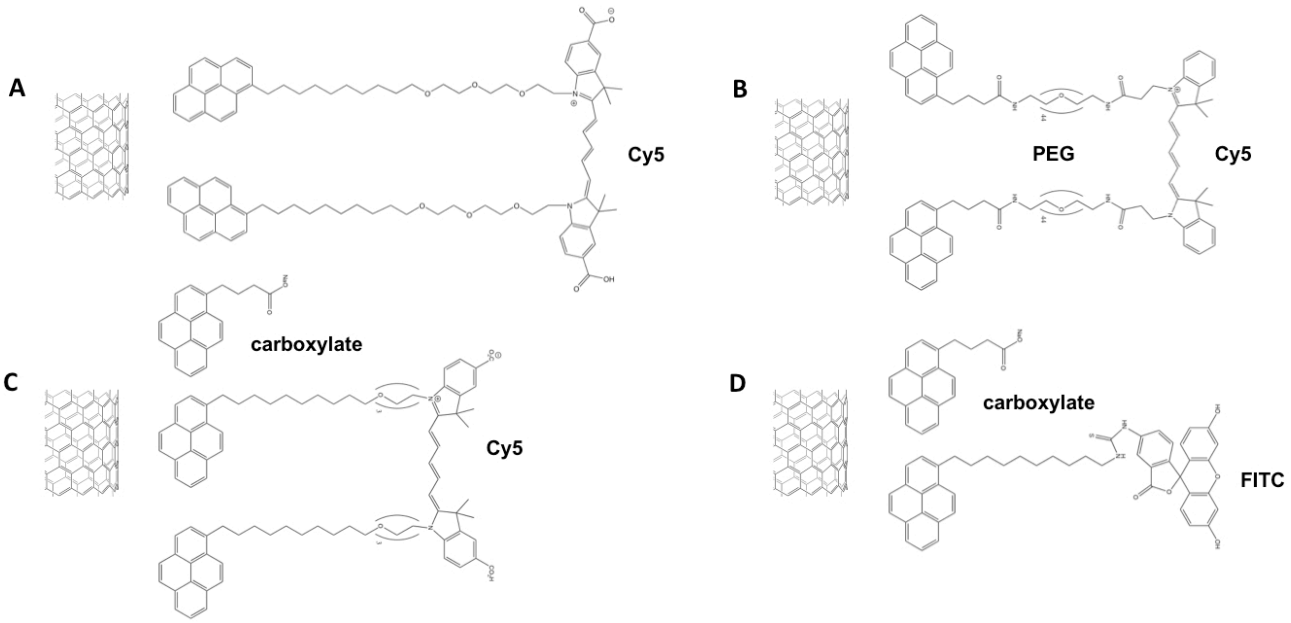


Figure 36. Exemples de constructions NTC-fluorophore élaborées au cours de la 3ème stratégie de marquage. **A et B** : augmentation de la longueur et de l'hydrophilie des bras d'ancrage. **C et D** : implantation de groupements carboxylates sur la surface des NTC. **D** : greffage de la fluorescéine, un autre fluorophore sur les NTC.

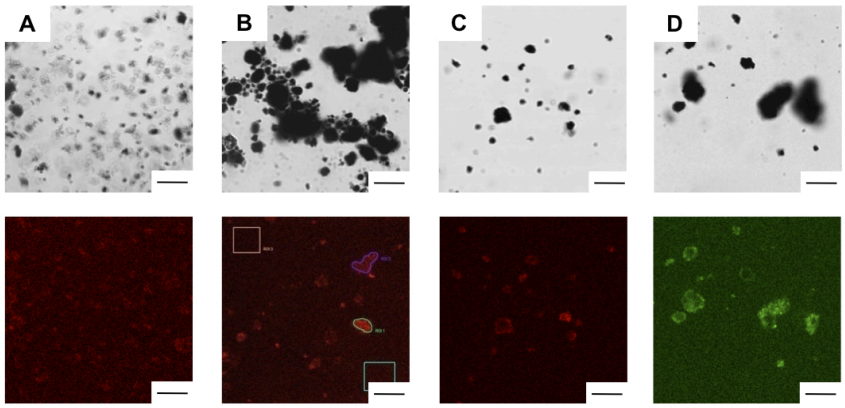


Figure 37. Observation en MO en lumière transmise et MCF des dispersions dans le surfactant des conjugués NTC-fluorophores A, B, C (Cy5) et D (FITC) décrits à la figure précédente. Les observations en MCF ont été réalisées après excitation des échantillons à 633 nm (A, B et C) et à 488 nm (D) (échelle = 10 µm).

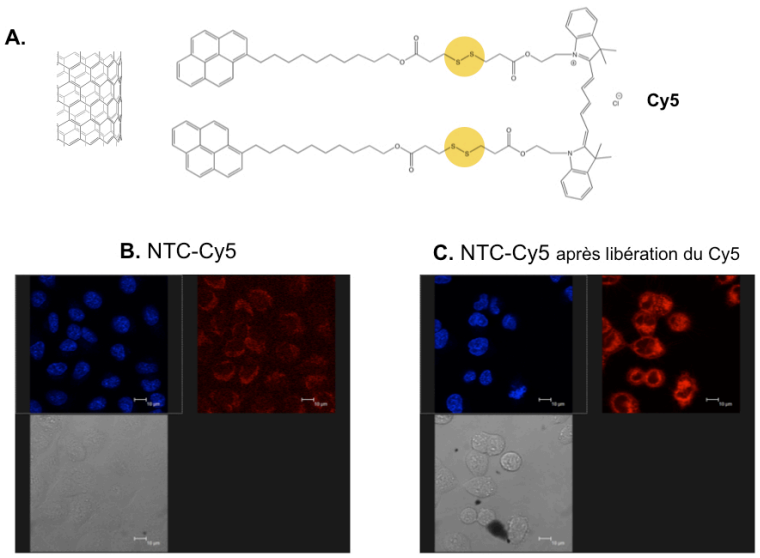


Figure 38. A : Construction d'un conjugué NTC-Cy5 labile comportant des ponts disulfures dans les bras d'ancrage. **B et C** : observation en MO en lumière transmise et en MCF des cellules HeLa exposées à 10 µg/mL de conjugué pendant 1h30, avant (B) et après (C) libération du fluorophore Cy5 par traitement réducteur au β-mercaptoéthanol. Les observations ont été réalisées en MCF après coloration du noyau des cellules au DAPI (bleu), après excitation des cellules à 633 nm (rouge), ou en MO en lumière transmise (échelle = 10 µm).

B.III.1.3. Marquage non covalent des NTC par des fluorophores hydrophiles

Le but de cette dernière stratégie était de tenter d'augmenter l'intensité du signal de fluorescence des conjugués NTC-Cy5, en augmentant la densité de fluorophore à la surface des NTC grâce à une conjugaison non covalente (association des approches 1 et 2). Pour cela, les fluorophores ont été conjugués avec un motif polyaromatique capable de s'adsorber à la surface des NTC. Ainsi, la densité de fluorophore sur les NTC a été augmentée et des charges en marqueur pouvant aller jusqu'à quelques mmoles de fluorophore par gramme de NTC ont été obtenues. De plus, la longueur et l'hydrophilie des bras d'ancrage ont été modulées (**Figure 36 A et B**) et la surface même du NTC a été rendue hydrophile, par implantation d'une densité variable de groupements carboxylates (**Figure 36 C**). Enfin, un conjugué modèle obtenu par greffage sur les NTC d'un autre fluorophore, la fluorescéine, a également été préparé (**Figure 36 D**).

L'observation des dispersions de ces conjugués, et notamment celle des conjugués présentés à la figure 36, dans le surfactant pulmonaire ont montré que ces constructions sont non fluorescentes ou émettent une intensité de fluorescence insuffisante pour permettre la suite de l'étude (**Figure 37 A et C**). Par ailleurs, si l'on peut observer l'apparition d'un signal sur certains composés (**Figure 37 B et D**), celui-ci ne correspond pas au signal spécifique des fluorophores Cy5 ou de la fluorescéine.

Ces résultats pouvant s'expliquer là encore par un phénomène d'extinction de la fluorescence du marqueur conjugué aux NTC, un conjugué NTC-Cy5 labile, possédant des ponts disulfures qui peuvent être réduits afin de libérer le marqueur Cy5, a été construit (**Figure 38 A).** Des observations en MCF ont été réalisées sur des cellules HeLa exposées à ce conjugué NTC-Cy5 avant (**Figure 38 B)** et après **(Figure 38 C)** libération du fluorophore par traitement réducteur au β-mercaptoéthanol. Nous pouvons remarquer qu'avant traitement réducteur, ce conjugué est totalement non fluorescent (Figure 38 B), mais qu'il génère un signal de fluorescence intense lorsqu'il est mis en présence de β-mercaptoéthanol capable de cliver les bras d'ancrage et donc de libérer le fluorophore Cy5 (Figure 38 C), validant l'hypothèse d'une extinction de fluorescence.

Ainsi, l'observation en MCF des conjugués NTC-fluorophore, élaborés selon les différentes approches de marquage, a toujours révélé un problème d'extinction de fluorescence. Ce phénomène s'est avéré être un verrou technique à la réalisation de l'étude de la distribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris par des techniques d'imagerie de fluorescence.

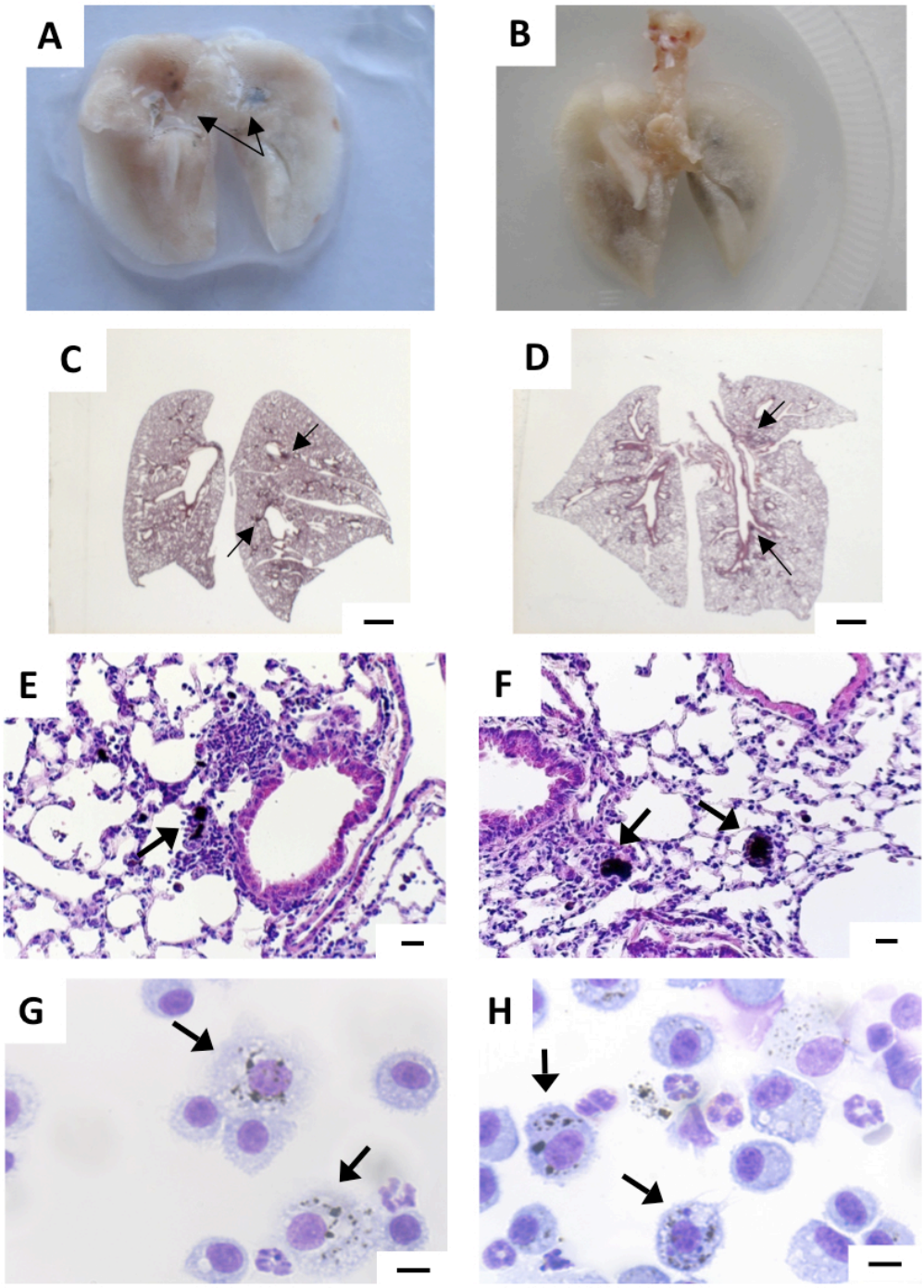


Figure 39. Images représentatives illustrant le dépôt des NTC dans le poumon de souris normale. Les animaux ont reçu une dose unique ou des doses répétées de 6,25 µg de NTC dispersés dans le surfactant. Les LBA et les poumons ont été recueillis 24 heures (administration unique) ou 7 jours (administrations répétées) après l'exposition. **A et B** : vue ventrale des poumons de souris exposées à une administration unique (A) ou à des administrations répétées (B) de NTC. **C et D** : observation en macroscopie optique de coupes longitudinales de poumon de souris exposées à une administration unique (C) ou à des administrations répétées (D) de NTC (coloration à l'hématoxyline/éosine ; échelle = 1 mm). **E et F** : observation en MO de coupes longitudinales de poumons de souris exposées à une administration unique (E) ou à des administrations répétées (F) de NTC (coloration à l'hématoxyline/éosine ; échelle = 20 µm). **G et H** : cellules recueillies dans le LBA de souris exposées à une administration unique (G) ou à des administrations répétées (H) de NTC (échelle = 10 µm).

B.III.2. Données issues des travaux sur les NTC non marqués

Compte tenu des difficultés rencontrées pour détecter les NTC marqués par MCF, des alternatives ont été mises en place pour aborder la question du devenir des NTC dans les voies respiratoires de la souris normale et de la souris exposée à des allergènes d'acariens. Ce travail a été réalisé en parallèle des études de toxicité respiratoire et de l'impact des NTC dans un modèle murin d'asthme allergique. Ainsi, pour la justification des doses de NTC utilisées dans les protocoles d'exposition, le lecteur se réfèrera aux Parties C et D de ce chapitre.

B.III.2.1. Étude de distribution par MO en lumière blanche et MET

Dans un premier temps, la MO en lumière blanche et la MET ont été utilisées pour rechercher et analyser la présence de NTC à l'échelle tissulaire, cellulaire et subcellulaire sur des coupes de poumon de souris exposées à des NTC non marqués. Pour cela, des animaux ont reçu une administration unique (6,25 µg) ou des administrations répétées (3 x 6,25 µg) de NTC selon le protocole décrit à la **figure 43** (page 97). Les LBA et les poumons des animaux ont été recueillis 24 heures (administration unique) ou 7 jours (administrations répétées) après l'exposition.

Les **poumons** photographiés lors du prélèvement montrent que les NTC sont visibles, et ceci bien que les animaux aient subi des LBA avant le prélèvement de l'organe, ce qui suggère que les NTC sont associés aux tissus. Les NTC sont plus remarquables et semblent s'être déposés plus profondément dans l'arbre respiratoire après des expositions répétées (**Figure 39 B**) que lors de l'exposition unique (**Figure 39 A**). L'examen histologique en **macroscopie optique** d'une coupe longitudinale de l'organe, dans sa partie médiane après coloration à l'hématoxyline-éosine, montre des amas de NTC associés aux tissus pulmonaires chez les souris ayant reçu une administration unique (**Figure 39 C**) ou des administrations répétées (**Figure 39 D**) de NTC. **L'analyse par MO** en lumière blanche des tissus pulmonaires montre que les NTC se déposent principalement dans les alvéoles (**Figure 39 E et F**) quel que soit le protocole d'exposition. De plus, l'examen en MO en lumière blanche des cellules collectées dans les LBA montre que les macrophages sont chargés de NTC (**Figure 39 G et H**), avec un pourcentage de macrophages contenant des NTC d'environ 20% chez les souris exposées de façon unique ou répétée (résultats non montrés). Il est à noter qu'aucune obstruction des voies respiratoires n'a été constatée lors des deux protocoles d'exposition. Le même travail réalisé chez des souris exposées aux

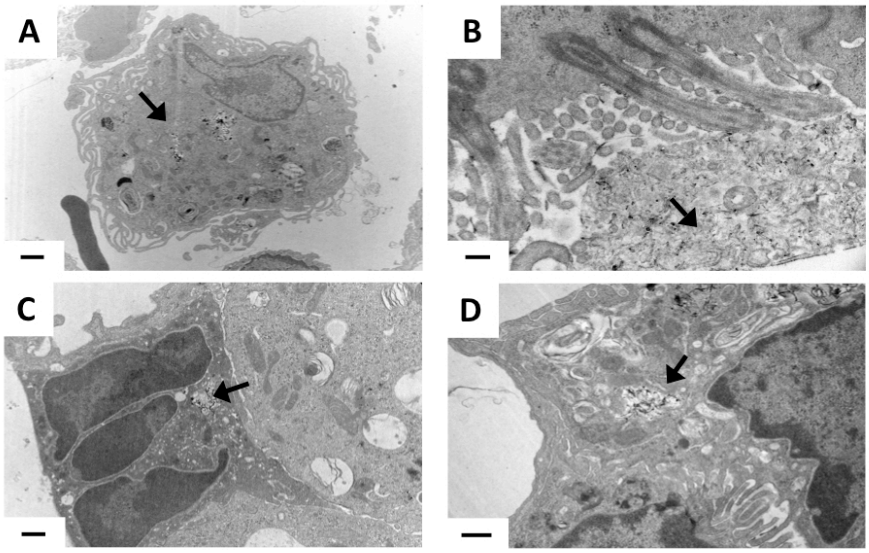


Figure 40. Images représentatives de MET illustrant le dépôt des NTC dans le poumon de souris normale. Les animaux ont reçu une dose unique de NTC dispersés dans le surfactant et les poumons ont été recueillis 24 heures après l'exposition pour l'analyse en MET. Les images de MET montrent que les NTC sont phagocytés par les macrophages (**A**, échelle = 1 µm), qu'ils sont présents dans la couche de mucus recouvrant les cellules épithéliales ciliées (**B**, échelle = 200 nm) et qu'ils peuvent être internalisés dans les neutrophiles infiltrés (**C**, échelle = 0,5 µm) ainsi que dans les pneumocytes de type II (**D**, échelle = 0,5 µm).

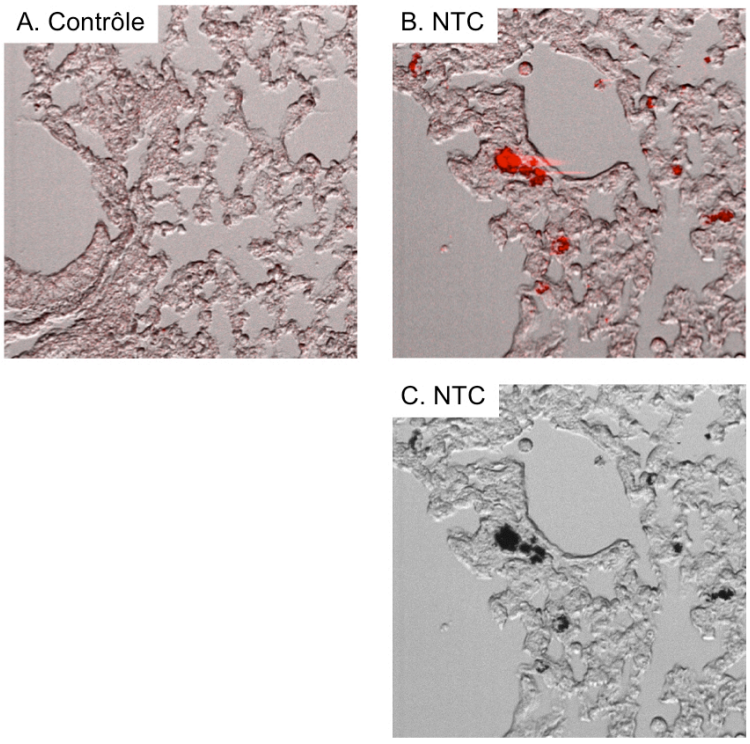


Figure 41. A et B : Observation en microscopie confocale IR (excitation à 800 nm) d'un fragment de coupe de poumon de souris contrôle (A) ou de souris exposées aux NTC (B). **C** : Observation en MO en lumière transmise du fragment de coupe de poumon de souris exposées aux NTC. Longueur du champ = 300 µm.

allergènes d'acariens et aux NTC a révélé une distribution tissulaire identique des NTC en conditions inflammatoires (résultats non montrés).

L'examen en MET des tissus pulmonaires de souris ayant reçu une administration unique de NTC montre que ceux-ci sont phagocytés par les macrophages alvéolaires (**Figure 40 A**), ce qui est en accord avec les observations faites en MO en lumière blanche sur les cellules des LBA. L'examen en MET révèle également la présence de NTC piégés dans la couche de mucus recouvrant les cellules épithéliales ciliées (**Figure 40 B**), ainsi que dans les neutrophiles infiltrés dans la lumière des voies respiratoires (**Figure 40 C**) et dans les pneumocytes de type II (**Figure 40 D**). Les mêmes observations ont été faites chez les souris ayant reçu des administrations répétées de NTC. De plus, le même travail réalisé chez des souris exposées aux allergènes d'acariens et aux NTC a révélé une distribution cellulaire *a priori* identique des NTC en conditions inflammatoires (résultats non montrés).

L'ensemble de ces résultats montre que les NTC se distribuent tout le long des voies respiratoires chez la souris, après leur administration unique ou répétée. Par ailleurs, dans le protocole d'exposition répétée, les NTC sont encore présents 7 jours après la dernière administration, suggérant que les NTC ne sont pas rapidement éliminés. Enfin, la distribution des NTC serait identique chez des souris présentant une inflammation des voies aériennes induite par les allergènes d'acariens.

B.III.2.2. Données obtenues par microscopie confocale IR

L'approche en MET, telle que nous l'avons mise en œuvre, ne permet pas d'analyser un nombre d'échantillons tissulaires qui soit représentatif de ce qui se passe à l'échelle de l'organe entier, ce qui limite l'analyse de biodistribution des NTC à l'échelle cellulaire et subcellulaire. C'est pourquoi la microscopie confocale IR a été exploitée dans un deuxième temps pour tenter de cartographier la distribution des NTC non marqués à l'échelle de coupes entières de poumons. En effet, cette cartographie pourrait servir à repérer des zones d'intérêts qui seraient ensuite explorées en MET.

Dans un premier temps, nous avons examiné la possibilité d'utilisation de cette technique sur **un fragment de coupe de poumon** de souris exposées à trois administrations de 25 µg de NTC (soit une dose totale de 75 µg) selon le protocole décrit à la **figure 43** (page 97). Les poumons ont été recueillis 7 jours après la dernière administration. L'observation en **microscopie confocale IR** des tissus pulmonaires montre la présence d'un signal de photoluminescence après excitation à 800 nm (**Figure 41 B**) qui semble bien corrélé au

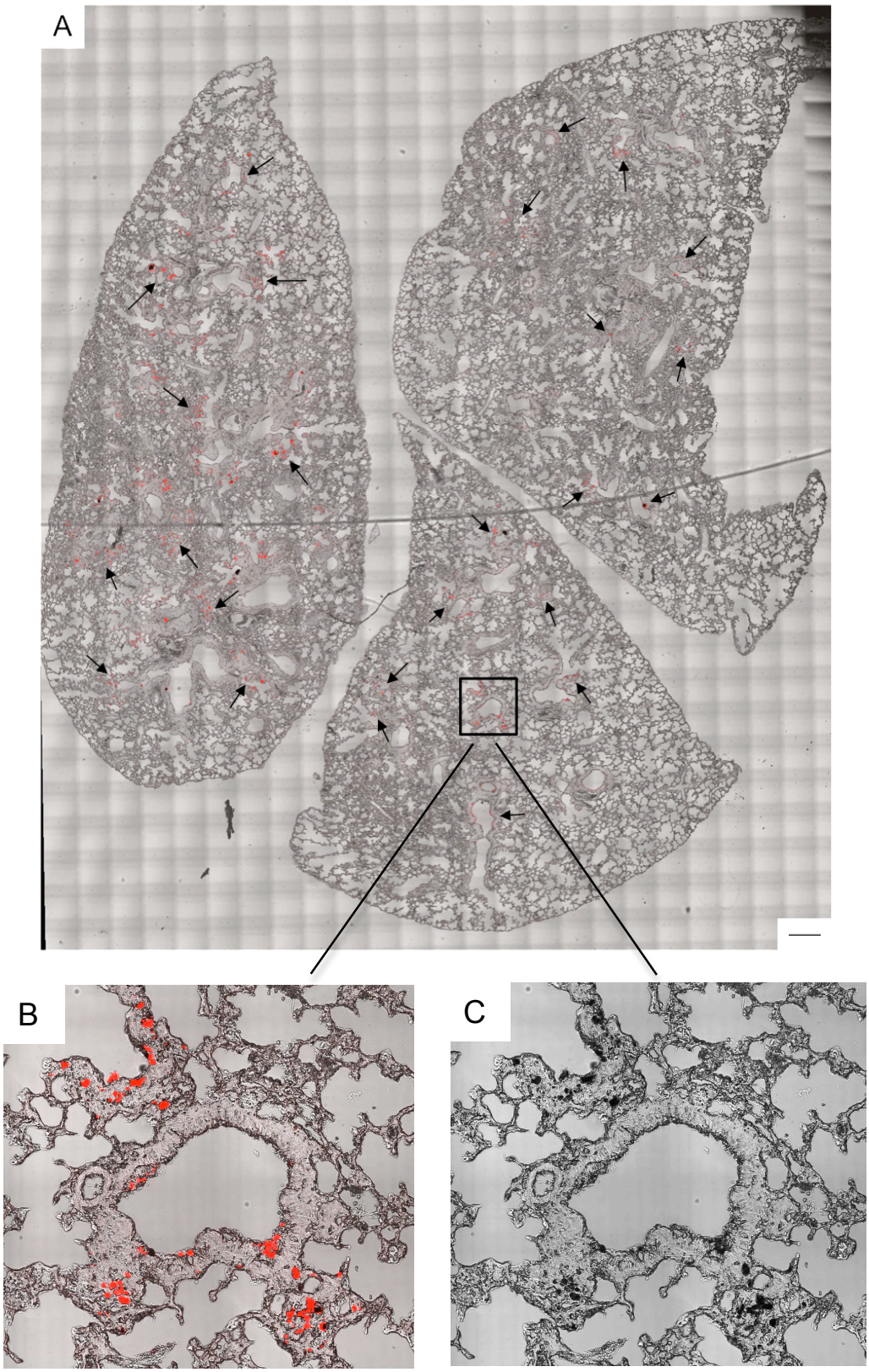


Figure 42. Cartographie de la distribution des NTC à l'échelle d'une coupe entière de poumon de souris exposées aux NTC. A : Cartographie obtenue par la méthode d'«image stitching» à partir d'images en MO en lumière transmise et en microscopie confocale IR (excitation à 800 nm), échelle = 300 µm. **B** : Zoom à partir de la cartographie obtenue en microscopie confocale IR. **C** : Zoom à partir de la cartographie obtenue en MO en lumière transmise

dépôt des NTC visibles en MO en lumière transmise (**Figure 41 C**). À l'inverse, l'observation des tissus pulmonaires des animaux contrôles (**Figure 41 A**) ne révèle aucun signal de photoluminescence aussi fort que celui observé chez les animaux exposés aux NTC. Ainsi, nous avons considéré que le signal détecté chez les animaux exposés aux NTC correspondait bien à un signal lié aux NTC, même si ce signal n'a pas pu être défini par une identité spectrale caractéristique (résultats non montrés).

Dans un second temps, nous avons tenté de **cartographier la distribution des NTC à l'échelle d'une coupe entière de poumon**. Pour effectuer une telle cartographie avec une résolution suffisante, il a été nécessaire d'acquérir plusieurs images contiguës (en déplaçant l'échantillon horizontalement et verticalement entre chaque prise d'image), afin d'obtenir au final une « mosaïque » d'images qui recouvrent l'intégralité de la coupe. Ce type d'acquisition a été répété, dans la profondeur de l'échantillon, afin d'étudier de manière volumique la distribution du signal d'intérêt. Un logiciel a ensuite été utilisé afin de reconstruire l'image de la coupe par la méthode dite d'«image stitching». Typiquement, à l'aide d'un objectif couvrant un champ de 300 µm de côté, il faut réaliser 27x27 images pour cartographier un plan en Z d'une coupe d'organe de 8x8 mm. De plus, le signal provenant des NTC se distribuant sur la profondeur de la coupe (qui est de 5 µm), cinq plans en Z espacés de 1 µm ont été suffisants pour observer la photoluminescence des NTC. Ainsi, au total, plus de 3500 images ont été nécessaires pour cartographier une coupe de poumon.

Une image de cartographie obtenue par microscopie confocale IR d'une coupe entière de poumon de souris exposées aux NTC est présentée à titre d'illustration à la **figure 42 A**. Dans cet essai, les souris ont reçu 9 doses répétées de 25 µg de NTC (soit une dose totale de 225 µg) et les poumons ont été recueillis 5 jours après la dernière administration, selon le protocole décrit à la **figure 55 B** (page 107). Nous pouvons tout d'abord remarquer qu'aucune structure autre que les NTC n'exprime un signal aussi fort que ces derniers, ce qui permet d'observer les NTC sans être perturbés par l'auto-fluorescence du tissu fixé. De plus, cette image nous montre une distribution des NTC tout le long des voies respiratoires. Ce résultat est en adéquation avec les observations faites en MO en lumière blanche. En outre, l'agrandissement des zones d'intérêt à partir de la cartographie obtenue permet ici aussi de constater que le signal de photoluminescence après excitation à 800 nm (**Figure 42 B**) est corrélé au dépôt des NTC visibles en MO en lumière transmise (**Figure 42 C**).

Les différentes approches basées sur la détection des NTC non marqués ont permis de mener une étude de la distribution des NTC dans les voies respiratoires chez la souris, étude qui n'avait pas été possible avec les NTC marqués du fait d'un problème d'extinction de fluorescence. Nous avons ainsi observé en MO en lumière blanche, que les NTC se distribuent tout le long de l'arbre respiratoire et qu'ils se déposent principalement au niveau des alvéoles. De plus, l'examen en MET des tissus pulmonaires a montré que les NTC sont phagocytés par les macrophages alvéolaires et qu'ils peuvent être internalisés dans d'autres types cellulaires comme les pneumocytes de type II. La distribution des NTC serait identique chez des souris présentant une inflammation des voies aériennes induite par les allergènes d'acariens. Enfin, dans un essai exploratoire, nous avons réussi à cartographier, en microscopie confocale IR, la distribution des NTC à l'échelle d'une coupe de poumon, ce qui pourrait permettre la détection de régions d'intérêt dans le poumon, en vue d'une analyse approfondie en MET.

Partie C – Impact des NTC chez la souris normale

C.I. Introduction

Ces dernières années, de nombreuses études ont suggéré une toxicité des NTC sur l'appareil respiratoire. Ces études ont notamment rapporté la survenue d'une inflammation et d'une réponse fibrotique, ainsi que la formation de granulomes dans le poumon de rats ou de souris exposés aux NTC (Lam *et al.*, 2004; Warheit *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2005; Shvedova *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2011). Toutefois, toutes les études réalisées n'ont pas conduit aux mêmes observations, suggérant que la toxicité respiratoire des NTC dépend d'un certain nombre de facteurs, dont les caractéristiques physico-chimiques des NTC eux-mêmes, la dose ou la durée d'exposition.

C.II. Objectifs

Cette troisième étape de la thèse a été d'évaluer la toxicité respiratoire des NTC dispersés dans le surfactant chez la souris normale. Cette évaluation a été centrée sur la capacité des NTC à induire une inflammation et un remodelage des voies aériennes.

1) Le premier objectif a été de décrire les effets respiratoires aigus et répétés des NTC à dose fixe.

2) Le second objectif a été d'évaluer les effets de doses croissantes de NTC après exposition répétée, afin d'établir une relation dose-effet.

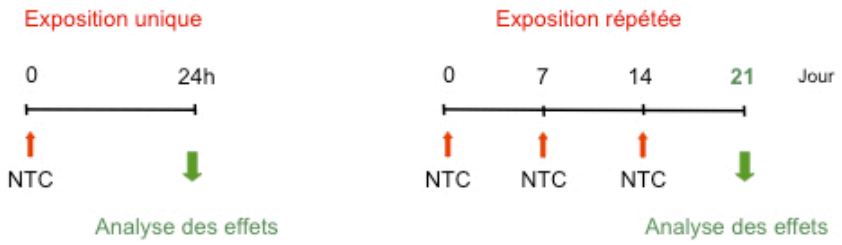


Figure 43. Protocole d'exposition unique ou répétée aux NTC. Les souris ont reçu une administration unique ou des administrations répétées de NaCl, de surfactant ou de 6,25 µg de NTC. Les LBA et le poumon ont été recueillis 24 heures (exposition unique) ou 7 jours (exposition répétée) après la dernière administration.

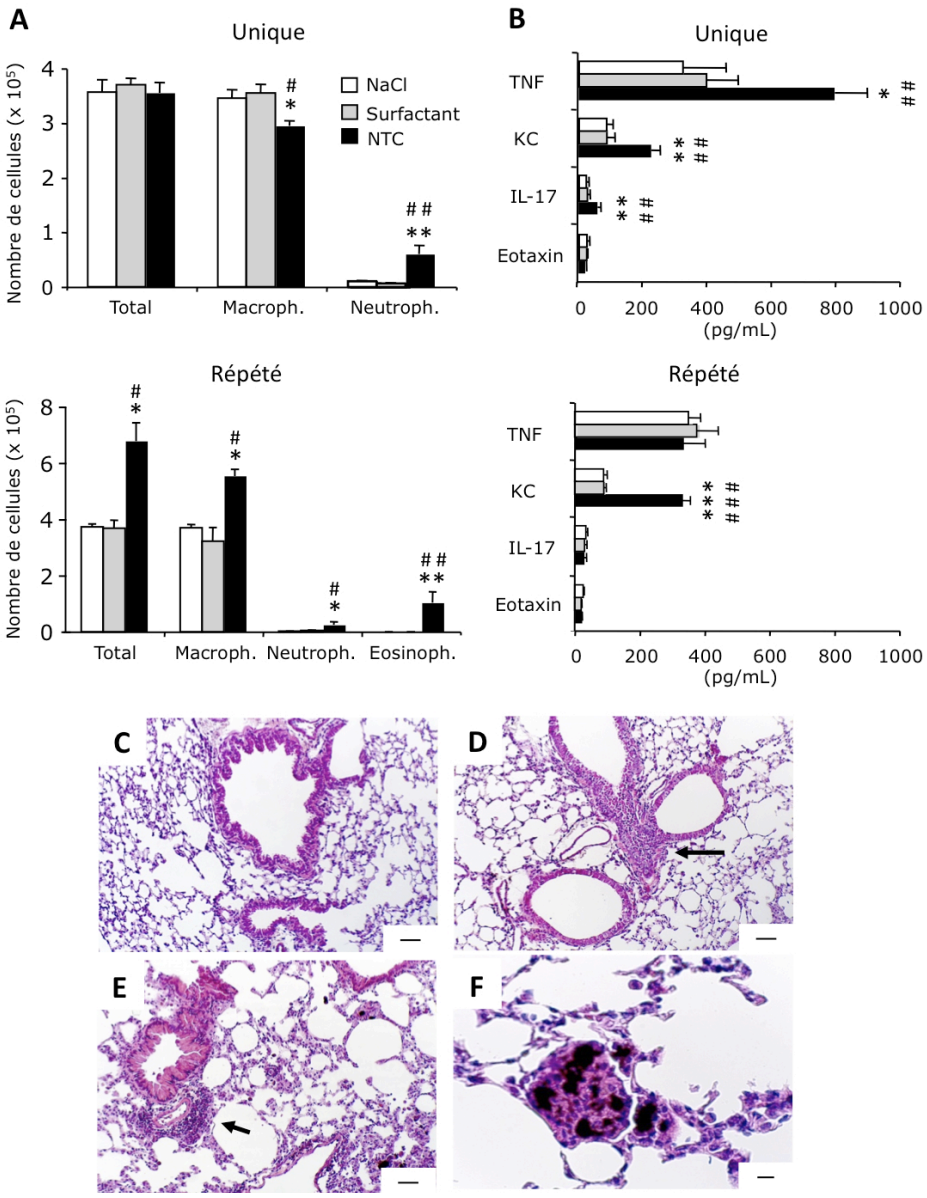


Figure 44. **Inflammation des voies aériennes induite par les NTC. A** : Nombre de cellules et **B** : concentration en cytokines dans les LBA de souris qui ont reçu une administration unique (haut) ou des administrations répétées (bas) de NaCl, de surfactant ou de NTC (6,25 µg). Les données sont les moyennes ± SEM de n=4-6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (un symbole), p<0,01 (deux symboles) et p<0,001 (trois symboles) en comparaison au groupe surfactant (*) ou NaCl (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey. **C** et **D** : Analyse histopathologique du tissu pulmonaire des souris ayant reçu des administrations répétées de surfactant (C, échelle = 50 µm) ou une administration unique (D, échelle = 50 µm) ou répétée (E et F, échelle = 50 µm et 10 µm respectivement) de NTC. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline/éosine.

C.III. Résultats

C.III.1. Effets respiratoires aigus ou répétés des NTC à dose fixe

En premier lieu, nous avons étudié l'impact des NTC selon un protocole d'exposition unique ou un protocole d'exposition répétée. Cette évaluation a ici été centrée sur l'étude de la capacité des NTC à induire une **réponse inflammatoire pulmonaire.** Dans cette première étude, la dose de NTC était de 6,25 µg. Ce choix s'est fait compte tenu d'un volume d'administration fixé à 25 µL, d'un protocole de dispersion établi pour des concentrations de NTC à 1 mg/4mL de dispersant, et des doses de NTC considérées comme représentatives d'une exposition professionnelle, soit 10 à 20 µg/souris (Shvedova *et al.*, 2005; Mercer *et al.*, 2008; Porter *et al.*, 2010). Les animaux ont reçu une administration unique ou à des administrations répétées de NaCl, de surfactant ou de NTC dispersés dans le surfactant selon les protocoles décrits à la **Figure 43**. Les LBA et le poumon ont été recueillis 24 heures (exposition unique) ou 7 jours (exposition répétée) après la dernière administration de NTC. La réponse inflammatoire a été évaluée en dénombrant les cellules et en quantifiant certains médiateurs pro-inflammatoires dans les LBA des animaux, ainsi qu'en réalisant un examen histologique du tissu pulmonaire.

Tout d'abord, nous pouvons constater que le surfactant seul, administré de façon unique ou répétée, ne provoque pas de changement dans le nombre de cellules et le contenu en cytokines des LBA, par rapport à l'administration de NaCl, suggérant une biocompatibilité du surfactant (**Figure 44 A et B**). En revanche, un infiltrat de neutrophiles ($p<0,01$) est observé dans les LBA de souris qui ont reçu une administration unique de NTC comparé aux souris ayant reçu le surfactant seul (**Figure 44 A haut**). De même, une augmentation prononcée des macrophages ($p<0,05$), accompagnée d'un infiltrat de neutrophiles ($p<0,05$) et d'éosinophiles ($p<0,01$), est observée chez les souris exposées de façon répétée aux NTC (**Figure 44 A bas**). De plus, les concentrations en TNF-α (cytokine pro-inflammatoire), KC et IL-17 (chémoattractants des neutrophiles) sont respectivement multipliées par 2 ($p<0,05$), 2,6 ($p<0,01$) et 2,4 ($p<0,01$) dans les LBA de souris ayant reçu une administration unique de NTC comparé au surfactant (**Figure 44 B haut**). De même, dans le protocole d'exposition répétée, la concentration en KC est significativement multipliée par 3 ($p<0,001$) chez les souris ayant reçu les NTC par rapport aux souris qui ont reçu le surfactant (**Figure 44 B bas**).

Tableau 7. Nombre de cellules et concentration en KC dans les LBA de souris exposées à des administrations répétées de 1,5 ; 6,25 ou 25 µg de NTC ou au surfactant seul.

	Nombre de cellules (10^4)					Cytokine (pg/mL)
	Cellules totales	Macrophages	Neutrophiles	Eosinophiles	Lymphocytes	KC
Surfactant	17,00 ± 0,87	16,87 ± 0,50	0,06 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,03	151,69 ± 26,92
NTC 1,5 µg	19,97 ± 3,69	18,95 ± 3,73	0,12 ± 0,05	0,81 ± 0,45	0,08 ± 0,02	161,20 ± 15,10
NTC 6,25 µg	28,62 ± 2,93	26,35 ± 2,83	0,40 ± 0,02	1,78 ± 0,36	0,08 ± 0,04	189,22 ± 12,18
NTC 25 µg	46,10 ± 8,72**	35,58 ± 6,83*	1,39 ± 0,61*	8,75 ± 1,72**	0,38 ± 0,13*	230,52 ± 29,05**

Les données sont les moyennes ± SEM de n=4-6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (*), p<0,01 (**) en comparaison au groupe surfactant, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Dunnett.

Par ailleurs, nous pouvons remarquer que l'administration unique ou répétée de surfactant ne cause pas de changements histopathologiques dans les poumons des souris (**Figure 44 C**). En revanche, l'examen histologique des poumons de souris exposées à une administration unique (**Figure 44 D**) ou à des administrations répétées (**Figure 44 E**) de 6,25 µg de NTC, révèle la présence d'infiltrats cellulaires péri-bronchiques et péri-vasculaires, confirmant la réponse inflammatoire observée dans les LBA. Les infiltrats cellulaires sont plus importants après les administrations répétées de NTC qu'après l'administration unique. De plus, l'exposition répétée aux NTC provoque l'apparition de quelques granulomes, organisés autour d'agrégats de NTC (**Figure 44 F**).

Ces résultats chez la souris normale montrent d'une part, que le surfactant synthétique que nous avons élaboré n'a pas d'activité pro-inflammatoire, démontrant ainsi sa biocompatibilité, et d'autre part, que les NTC dispersés dans ce surfactant sont capables d'induire une réponse inflammatoire après administration unique ou répétée.

C.III.2. Effet de doses croissantes de NTC après exposition répétée

En second lieu, nous avons voulu savoir d'une part, si les effets induits par les NTC dispersés dans le surfactant étaient dose-dépendants, et d'autre part, si les NTC étaient capables d'induire un **remodelage des voies aériennes**. Pour cela, des souris ont été exposées à des doses croissantes (1,5 ; 6,25 ou 25 µg) de NTC ou au surfactant selon le protocole d'exposition répétée précédemment décrit (**Figure 43**). Chez ces animaux, l'inflammation des voies aériennes, mais également **la réponse fibrotique** et la **production de mucus** ont été évaluées**.** La réponse fibrotique a été mesurée en quantifiant le collagène total dans les homogénats de poumons et le TGF-β1 total dans les LBA, ainsi que de façon qualitative en analysant le dépôt de collagène sur des coupes histologiques de tissus pulmonaires colorées au Trichrome de Masson. La production de mucus a été mise en évidence sur des coupes histologiques colorées au PAS.

Les résultats obtenus ici confirment que l'exposition répétée aux NTC induit une réponse inflammatoire caractérisée par un infiltrat cellulaire et une augmentation de la concentration en KC dans les LBA des souris, par rapport au surfactant. De plus, ces résultats montrent que cette réponse inflammatoire est dose-dépendante (**Tableau 7).** Les résultats concernant la réponse fibrotique montrent que la quantité de collagène total augmente de façon dose-dépendante chez les animaux exposés aux NTC, avec une hausse significative ($p<0,05$) pour la plus forte dose de NTC testée, c'est-à-dire 25 µg (**Figure 45 A**). De même, la plus

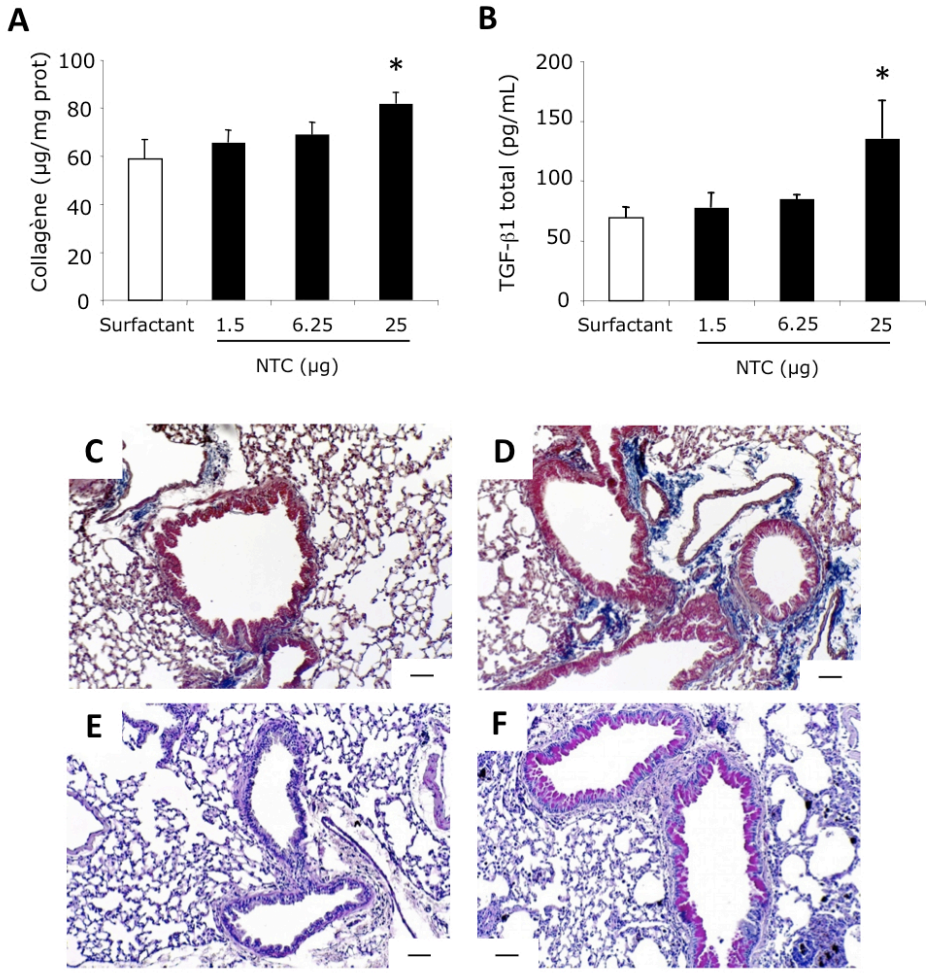


Figure 45. Remodelage des voies aériennes induit par les NTC. A : concentration en collagène total dans les homogénats de poumon et **B** : concentration en TGF-β1 total dans les LBA de souris exposées de façon répétée à 1,5 ; 6,25 ou 25 µg NTC ou au surfactant seul. Les données sont les moyennes ± SEM de n=4-6 animaux. Différences statistiquement significatives à $p<0,05$ (*) en comparaison au groupe surfactant, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Dunnett. **C à F** : Dépôt de collagène (C et D, coloration au Trichrome de Masson, échelle = 50 µm) et production de mucus (E et F, coloration au PAS, échelle = 50 µm) dans les poumons de souris après l'administration répétée de 25 µg de NTC (D et F) ou de surfactant seul (C et E).

forte dose de NTC induit également une augmentation significative de la concentration en TGF-β1 total ($p<0,05$) dans les LBA (**Figure 45 B**). L'analyse des coupes histologiques après coloration au Trichrome de Masson révèle une légère augmentation du dépôt de collagène autour des bronchioles et des vaisseaux chez les animaux exposés à la dose de 25 µg de NTC (**Figure 45 D**) comparé aux animaux contrôles (**Figure 45 C**). On peut remarquer que ces sites de dépôt du collagène rappellent la localisation des infiltrats cellulaires inflammatoires décrits précédemment (Figure 44 D et E). Par contre, aucun dépôt de collagène n'est relevé dans le tissu alvéolaire ou dans les granulomes. En concordance avec les résultats concernant le dépôt de collagène, une hyperproduction du mucus est observée sur les coupes histologiques des souris exposées à 25 µg de NTC (**Figure 45 F**).

L'ensemble de ces résultats montre que les NTC sont capables d'induire une réponse inflammatoire, une réponse fibrotique péri-bronchique et une hyperproduction de mucus chez la souris normale après exposition unique ou répétée. Ces effets sont dose-dépendants et ont été mis en évidence pour des doses de NTC représentatives de l'exposition humaine en milieu professionnel (i.e. 1,5 ; 6,25 ou 25 µg).

Partie D – Impact des NTC dans un modèle murin d'asthme aux acariens

D.I. Introduction

Dans la partie précédente, nous avons montré une toxicité des NTC sur l'appareil respiratoire. En effet, une inflammation, la formation de granulomes, une hyperproduction de mucus et des signes de fibrose péri-bronchique ont été mis en évidence dans le poumon de souris exposées à des doses de NTC représentatives de l'exposition humaine en milieu professionnel. Considérant ces effets propres des NTC, nous nous sommes posé la question d'un possible effet aggravant des NTC dans l'asthme : est-ce que les NTC ont un effet adjuvant sur la réponse immunitaire ? Ont-ils un effet aggravant sur la réponse inflammatoire et le remodelage des voies aériennes induits par un allergène ?

Les allergènes d'acariens sont de plus en plus utilisés expérimentalement pour l'étude de l'asthme. En effet, ces allergènes sont largement mis en cause dans les allergies respiratoires chez l'homme, puisqu'on estime que 50 à 85% des asthmatiques sont allergiques aux acariens selon la situation géographique (Platts-Mills et Woodfolk, 2011). Ces allergènes permettent de recréer chez la souris, sans le recours à un adjuvant, une inflammation chronique et des modifications structurales des voies aériennes, telles qu'une réponse fibrotique et une hypersécrétion de mucus. Par ailleurs, la sensibilisation à ces allergènes fait intervenir l'action coordonnée des systèmes immunitaires inné et adaptatif. En effet, les allergènes d'acariens contiennent à la fois des épitopes allergéniques et des motifs moléculaires associés aux pathogènes (Gregory et Lloyd, 2011). Ainsi, en réponse aux allergènes d'acariens, les cellules épithéliales libèrent des cytokines innées comme le GM-CSF, TSLP, l'IL-25 ou l'IL-33, qui peuvent renforcer la réponse immunitaire Th2, la production d'Ig spécifiques de l'allergène (en particulier la production d'IgG1 spécifiques) et le recrutement d'éosinophiles dans le poumon. En outre, il a récemment été proposé que l'inflammasome NLRP3, qui a été impliqué d'une part dans le développement de l'asthme et d'autre part, dans la réponse innée aux particules, constitue une voie par laquelle les allergènes d'acariens induisent une inflammation allergique (étude sur les kératinocytes, (Dai *et al.*, 2011).

Pour toutes ces raisons, nous nous sommes orientés vers un modèle murin d'asthme aux allergènes d'acariens afin d'étudier l'impact des NTC sur l'asthme allergique.

D.II. Objectifs

Cette dernière étape du travail de thèse a ainsi porté sur l'étude de l'impact des NTC sur la réponse allergique dans un modèle murin d'asthme aux acariens. Ce modèle, mis au point au cours de ce travail sur la base de modèles déjà publiés dans la littérature (Yu et Chen, 2003; Lewkowich *et al.*, 2005; Wakahara *et al.*, 2008), est un modèle entièrement respiratoire qui consiste en 4 administrations à 7 jours d'intervalle d'un extrait complet d'acariens de l'espèce *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Dpt).

L'évaluation de l'effet des NTC dans ce modèle s'est déroulée suivant plusieurs protocoles, qui ont pris en compte un certain nombre de facteurs susceptibles d'influencer l'effet des NTC sur la réponse à l'allergène :

• **la dose de NTC**, car nous avons vu précédemment que les effets induits par les NTC dans les voies respiratoires sont dose-dépendants,

• **le moment de l'exposition aux NTC** par rapport à l'exposition à l'allergène, à savoir pendant la phase de sensibilisation à l'allergène ou après cette phase de sensibilisation.

1) Dans un premier temps, sur la base de nos études chez la souris normale, nous avons choisi d'administrer aux animaux exposés à l'extrait d'acariens trois doses répétées de 25 µg de NTC, soit **une dose totale de NTC de 75 µg**, tout **en faisant varier le moment de l'exposition** à ces doses de NTC par rapport aux administrations de l'extrait d'allergènes.

2) Dans un second temps, compte tenu des résultats obtenus dans ces premiers protocoles et afin de nous rapprocher des doses utilisées dans la littérature portant sur l'impact des NTC dans l'asthme (voir Partie D.II.2 de l'Introduction), nous avons décidé d'augmenter la répétition des doses de NTC à neuf administrations de 25 µg, soit **une dose totale de NTC de 225 µg**, tout **en figeant le moment de l'exposition** à ces doses de NTC.

Dans ces protocoles, nous avons évalué :

• **la réponse immunitaire systémique** à l'allergène en mesurant les concentrations sériques en IgG1 totales et en IgG1 spécifiques des allergènes d'acariens,

• **la réponse inflammatoire** en dénombrant les cellules dans les LBA, ainsi qu'en réalisant un examen histologique du tissu pulmonaire,

• **la réponse fibrotique** en mesurant la quantité de collagène total et les concentrations en TGF-β1 total, en MMP-9 et en TIMP-1 dans les LBA ou dans les homogénats de poumon, ainsi qu'en réalisant un examen histologique du tissu pulmonaire,

• **la production de mucus** en mesurant le contenu en mucines dans les homogénats de poumon et en réalisant un examen histologique du tissu pulmonaire.

Dans le dernier protocole mis en œuvre, nous avons mené de plus une évaluation de :

• la production de cytokines allergiques et pro-inflammatoires,

• la production de cytokines innées dérivées de l'épithélium,

• du stress oxydant en mesurant la production d'ERO,

• de l'inflammasome NLRP3 en mesurant la production de l'IL-1β et l'activité de la caspase-1 dans les homogénats de poumon, ainsi que l'ATP dans les LBA.



Figure 46. Protocoles de traitement des souris exposées à une dose totale de 75 µg de NTC. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule. Les NTC ont été administrés dès la première exposition à l'allergène (A) ou à partir de la dernière exposition à l'allergène (B). Aux jours 0, 7 et 14 du protocole A et au jour 21 du protocole B, l'administration des NTC et de l'extrait d'allergènes s'est faite dans des solutions séparées à 6 heures d'intervalle. Les LBA, le poumon et le sérum ont été recueillis 48 heures après la dernière exposition à l'allergène, soit au jour 23 du protocole (A) ou deux semaines après la dernière exposition à l'allergène, soit au jour 35 du protocole (B).

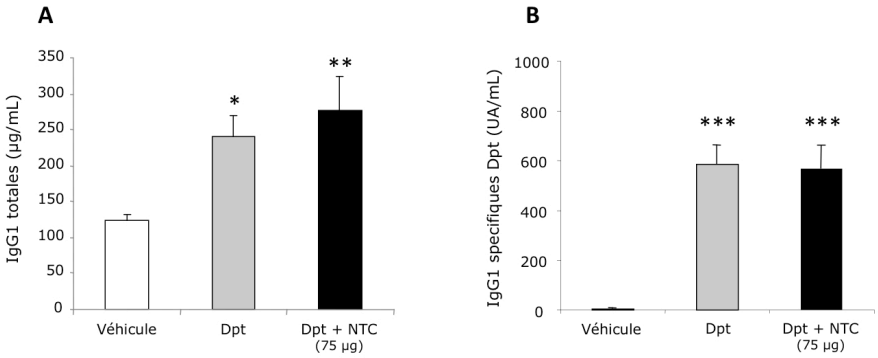


Figure 47. Effet sur la réponse immunitaire systémique d'une dose totale de 75 µg de NTC administrée dès la première exposition à l'allergène. A : Niveaux en IgG1 totales et **B** : niveaux en IgG1 spécifiques de Dpt dans les sérums de souris ayant reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule, selon le protocole décrit à la figure 46A. Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (*), p<0,01 (**) et p<0,001 (***) en comparaison au véhicule, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

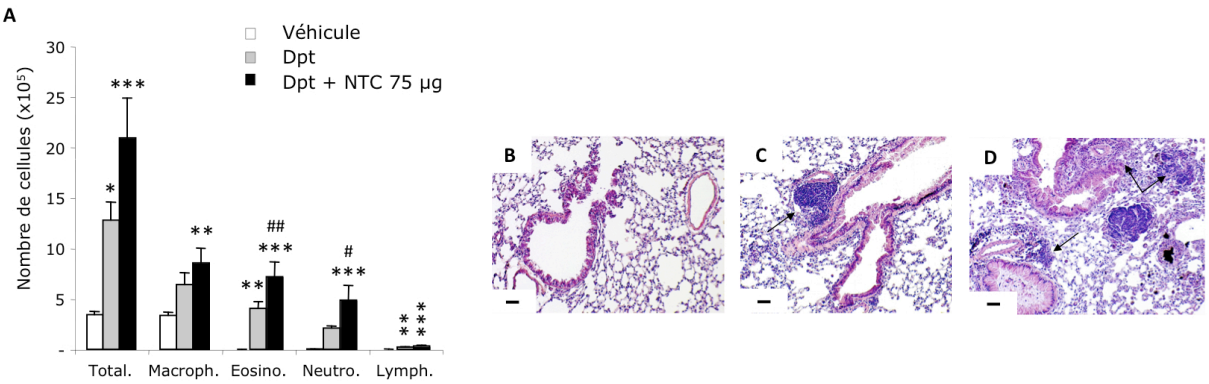


Figure 48. Effet sur l'inflammation induite par l'allergène d'une dose totale de 75 µg de NTC administrée dès la première exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 46A. **A :** Nombre de cellules dans les LBA et **B** à **D** : Analyse histopathologique (coloration à l'hématoxyline/éosine ; échelle = 50 µm) du tissu pulmonaire des animaux des groupes véhicule (B), Dpt (C) et Dpt + NTC (D). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (un symbole), p< 0,01 (deux symboles) et p<0,001 (trois symboles) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

D.III. Résultats

D.III.1. Effet d'une dose totale de 75 µg de NTC

Dans nos travaux sur la dose totale de NTC de 75 µg, nous avons fait varier **le moment de l'exposition** aux NTC par rapport aux administrations de l'extrait d'acariens. Ainsi, l'exposition aux NTC a commencé, soit dès la première exposition à l'extrait d'allergènes (i.e. pendant la sensibilisation), soit à partir de la dernière exposition à l'extrait (i.e. après la sensibilisation) **(Figure 46 A et B).**

D.III.1.1. Effet des NTC administrés dès la première exposition à l'extrait d'allergènes

Dans un premier protocole décrit à la **figure 46 A,** l'administration des doses de NTC a commencé dès la première exposition à l'extrait d'acariens (Dpt). Ainsi, les animaux ont reçu une instillation intranasale de 25 µg de NTC aux jours 0, 7 et 14 du protocole, soit le même jour que les trois premières administrations d'extrait d'acariens. L'administration des NTC et de l'extrait s'est faite dans des solutions séparées à 6 heures d'intervalle. Les groupes contrôles ont reçu l'extrait seul ou le véhicule seul. Les LBA, le poumon et le sérum ont été recueillis 48 heures après la dernière administration d'allergène.

Nous pouvons tout d'abord constater sur la **figure 47** que les souris qui ont été exposées à l'extrait d'acariens (Dpt) sont bien sensibilisées aux allergènes d'acariens, comme le montre l'augmentation des IgG1 totales ($p<0,05$) et des IgG1 spécifiques ($p<0,001$) comparé aux animaux qui ont reçu le véhicule. En revanche, dans ce protocole, l'administration d'une dose totale de 75 µg de NTC ne provoque pas d'augmentation des IgG1 totales, ni des IgG1 spécifiques induites par l'allergène, comparé aux animaux qui ont reçu l'extrait seul.

Les résultats obtenus montrent également que l'exposition à l'extrait d'acariens provoque un recrutement de cellules inflammatoires, caractérisé en particulier par une augmentation des macrophages accompagnée d'un infiltrat d'éosinophiles, de neutrophiles et dans une moindre mesure de lymphocytes, comparé aux souris qui ont reçu le véhicule (**Figure 48 A)**. En outre, nous pouvons remarquer que les NTC aggravent cette réponse inflammatoire induite par les allergènes d'acariens. En effet, l'afflux cellulaire, en particulier d'éosinophiles ($p<0,01$) et de neutrophiles ($p<0,05$), est plus important dans les LBA de souris exposées à la fois à l'extrait allergénique et aux NTC, comparé aux souris qui n'ont reçu que l'extrait. Par ailleurs, l'examen histologique des poumons des souris exposées à l'extrait seul (**Figure 48**

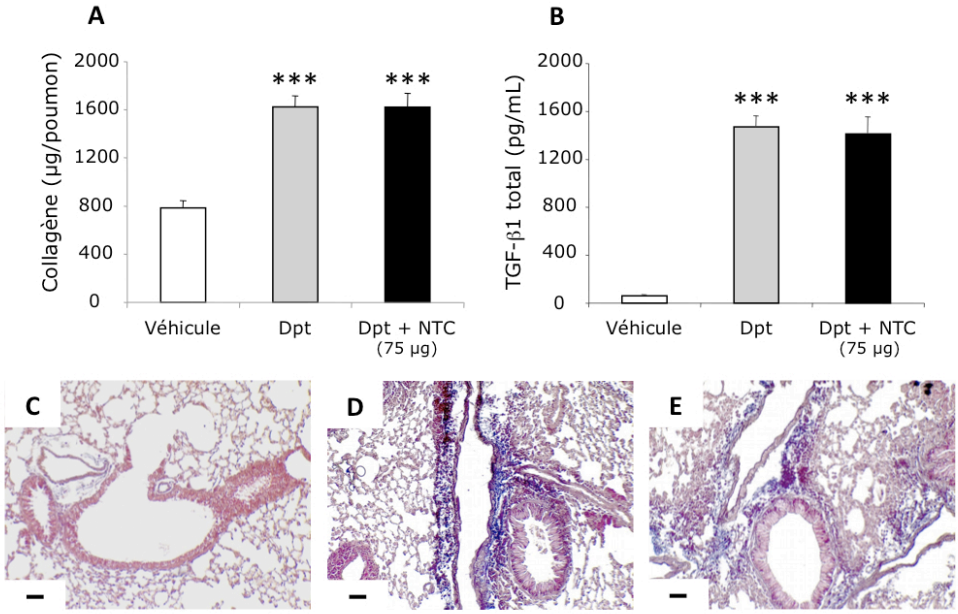


Figure 49. Effet sur la réponse fibrotique induite par l'allergène d'une dose totale de 75 µg de NTC administrée dès la première exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 46A. **A** : concentration en collagène total dans les homogénats de poumon et **B** : concentration en TGF-β1 total dans les LBA. **C** à **E** : Dépôt de collagène (coloration Trichrome de Masson, échelle = 50 µm) dans les poumons de souris du groupe véhicule (C), Dpt (D) et Dpt + NTC (E). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,001 (***) en comparaison au véhicule, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

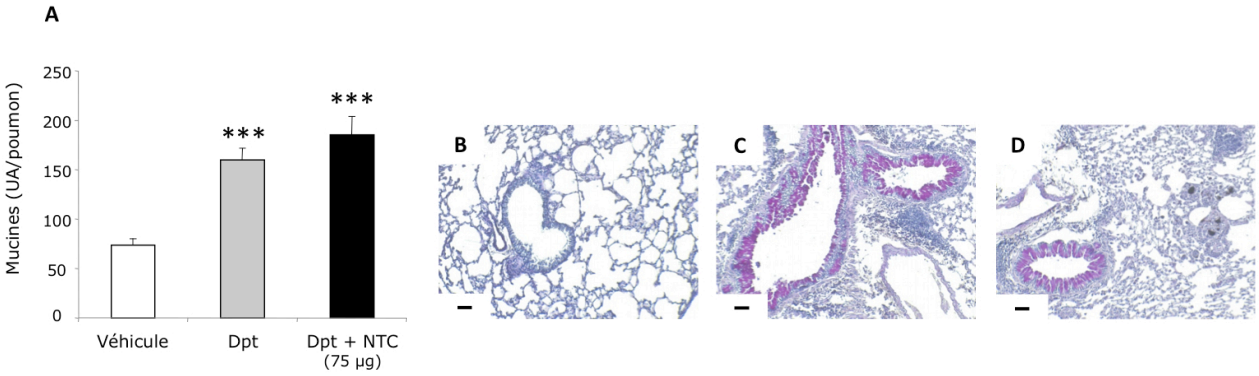


Figure 50. Effet sur la production de mucus induite par l'allergène d'une dose totale de 75 µg de NTC administrée dès la première exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 46A. **A** : Contenu en mucines dans les homogénats de poumon. **B à D** : production de mucus (coloration au PAS, échelle = 50 µm) dans les poumons de souris des groupes véhicule (B), Dpt (C) et Dpt + NTC (D). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,001 (***) en comparaison au véhicule, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

C) ou exposées à la fois à l'extrait et aux NTC (**Figure 48 D)** révèle la présence d'infiltrats cellulaires, confirmant la réponse inflammatoire observée dans les LBA. Ces infiltrats sont plus importants lors de l'exposition à l'extrait allergénique et aux NTC, comparé aux souris qui n'ont reçu que l'extrait.

L'exposition à l'extrait d'acariens induit aussi une réponse fibrotique, caractérisée par une augmentation significative ($p<0,001$) des concentrations en collagène total et en TGF-β1 total, comparé au véhicule (**Figure 49 A et B**). En revanche, l'administration de NTC ne provoque pas d'augmentation de cette réponse. En effet, les concentrations en collagène et en TGF-β1 ne sont pas augmentées chez les animaux exposés à la fois à l'extrait d'acariens et aux NTC, par rapport aux souris qui n'ont reçu que l'extrait. Par ailleurs, l'analyse histologique montre une augmentation du dépôt de collagène chez les animaux exposés à l'extrait d'acariens (**Figure 49 D**) comparé aux animaux qui ont reçu le véhicule (**Figure 49 C**). Ce dépôt ne semble visuellement pas plus important chez les animaux exposés à l'extrait et aux NTC (**Figure 49 E**) comparé aux souris qui n'ont reçu que l'extrait allergénique.

Enfin, l'exposition à l'extrait d'acariens se traduit par une augmentation du contenu en mucines dans les homogénats de poumons des souris (**Figure 50 A**). Cette hyperproduction de mucus est également visible sur les coupes histologiques de poumon des souris exposées à l'extrait (**Figure 50 C**). Toutefois, l'administration de NTC ne provoque pas d'augmentation de cette hyperproduction de mucus induite par l'allergène (**Figure 50 A et D**).

L'ensemble de nos résultats montre que la réponse allergique à l'extrait d'acariens est caractérisée, 48 heures après la dernière administration de l'extrait, par une réponse immunitaire systémique, ainsi qu'une inflammation et un remodelage des voies aériennes. Dans ce premier protocole, l'administration de trois doses de 25 µg de NTC, la première administration intervenant dès la première exposition à l'extrait d'acariens, conduit à une exacerbation de l'inflammation des voies aériennes induite par l'allergène, mais n'a pas d'effet adjuvant sur la réponse immunitaire systémique, ni d'effet aggravant sur le remodelage des voies aériennes induit par l'extrait allergénique.

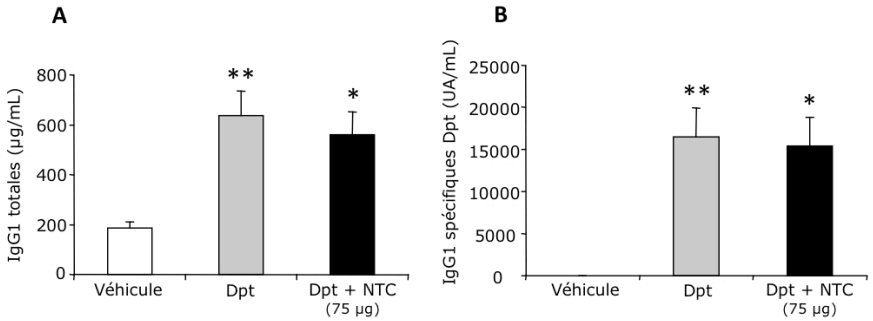


Figure 51. Effet sur la réponse immunitaire systémique d'une dose totale de 75 µg de NTC administrée à partir de la dernière exposition à l'allergène. A : Niveaux en IgG1 totales et **B** : niveaux en IgG1 spécifiques de Dpt dans les sérums de souris ayant reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule, selon le protocole décrit à la figure 46B. Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) en comparaison au véhicule, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

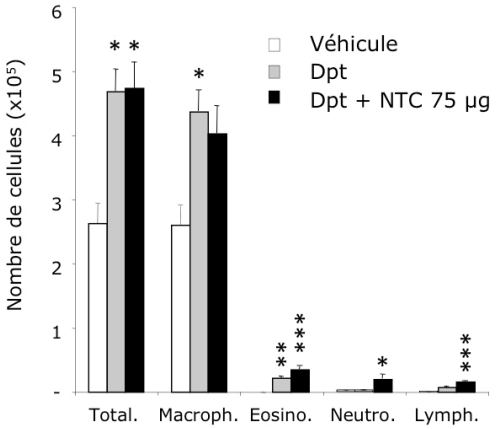


Figure 52. Effet sur l'inflammation induite par l'allergène d'une dose totale de 75 µg de NTC administrée à partir de la dernière exposition à l'allergène. Nombre de cellules dans les LBA de souris ayant reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule, selon le protocole décrit à la figure 46B. Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (*), p<0,01 (**) et p<0,001 (***) en comparaison au véhicule, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

D.III.1.2. Effet des NTC administrés à partir de la dernière exposition à l'extrait d'allergènes

Dans un deuxième protocole décrit à la **figure 46 B**, l'administration des doses de NTC a débuté lors de la dernière exposition à l'extrait d'acariens. Ainsi, les animaux ont reçu une instillation intranasale de 25 µg de NTC aux jours 21, 23 et 25 du protocole. Au jour 21, l'administration des NTC et de l'extrait s'est faite dans des solutions séparées à 6 heures d'intervalle. Les groupes contrôles ont reçu l'extrait ou le véhicule seul. Les LBA, le poumon et le sérum ont été recueillis au jour 35 du protocole, soit deux semaines après la dernière administration de l'extrait d'acariens.

Nous pouvons tout d'abord constater que les souris qui ont été exposées à l'extrait d'acariens présentent, comme précédemment, une augmentation des IgG1 totales et des IgG1 spécifiques ($p<0,01$) comparé aux animaux qui ont reçu le véhicule (**Figure 51 A et B)**. En effet, il est important d'insister sur le fait que les réponses ont été ici mesurées deux semaines après la dernière administration d'extrait d'acariens, et non 48 heures après cette administration. Nous constatons par ailleurs que l'administration de NTC, à partir de la dernière exposition à l'allergène, n'a pas provoqué d'augmentation des IgG1 totales, ni des IgG1 spécifiques, comparé aux animaux qui ont reçu l'extrait seul.

Dans ce nouveau protocole, les souris exposées à l'extrait d'acariens présentent également une inflammation des voies aériennes (**Figure 52**). Toutefois, l'infiltrat cellulaire, composé principalement de macrophages ($p<0,05$) et d'éosinophiles ($p<0,01$), semble moins important que celui mesuré dans le protocole précédent (i.e. 48 heures après la dernière administration d'extrait d'acariens). De plus, nous constatons que l'administration de NTC n'a pas provoqué d'augmentation de cette réponse inflammatoire. En effet, l'afflux cellulaire n'est pas augmenté dans les LBA de souris exposées à la fois à l'extrait et aux NTC, comparé aux souris qui n'ont reçu que l'extrait.

À l'instar de l'inflammation, une réponse fibrotique est présente dans le poumon de souris exposées à l'extrait d'acariens, mais là encore cette réponse est moins importante que celle mesurée dans le protocole précédent. En effet, les concentrations en collagène total et en TGF-β1 total ne sont plus, ou sont beaucoup moins augmentées, dans ce protocole que dans le protocole précédent (**Figure 53 A et B** *vs* **Figure 49 A et B**). De plus, nous constatons là aussi, que l'administration de NTC n'a pas induit d'augmentation de la réponse fibrotique.

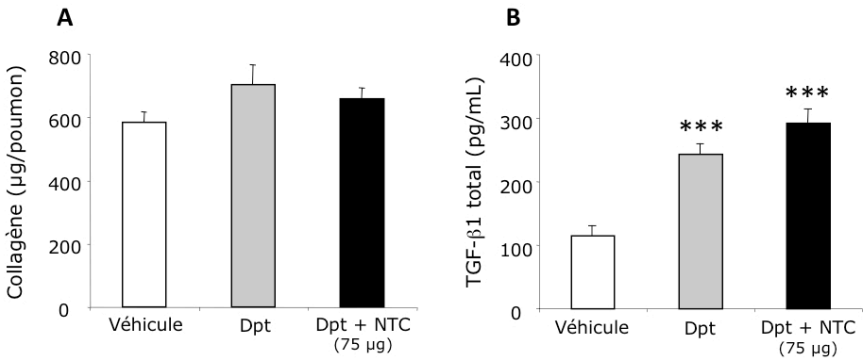


Figure 53. Effet sur la réponse fibrotique induite par l'allergène d'une dose totale de 75 µg de NTC administrée à partir de la dernière exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 46B. **A** : concentration en collagène total dans les homogénats de poumon et **B** : concentration en TGF-β1 total dans les LBA. Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,001 (***) en comparaison au véhicule, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

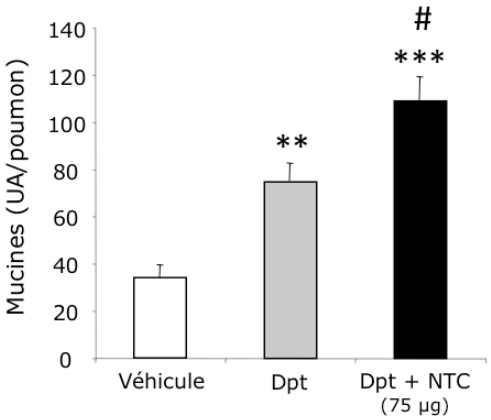


Figure 54. Effet sur la production de mucus induite par l'allergène d'une dose totale de 75 µg de NTC administrée à partir de la dernière exposition à l'allergène. Contenu en mucines dans les homogénats de poumon d'animaux ayant reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 46B. Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,01 (**) et p<0,001 (***) en comparaison au véhicule et p<0,05 (#) en comparaison au groupe Dpt, déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

Enfin, **une hyperproduction de mucus** est présente chez les animaux exposés à l'extrait d'acariens. Cette hyperproduction semble également moins importante que celle mesurée dans le précédent protocole (**Figure 54** *vs* **Figure 50**). Toutefois, elle est significativement augmentée chez les animaux exposés à l'extrait et aux NTC ($p<0,05$), comparé aux animaux qui n'ont reçu que l'extrait d'acariens.

Les données issues de ce deuxième protocole montrent que les différentes réponses induites par l'extrait d'acariens sont toujours présentes deux semaines après l'arrêt de l'exposition à l'allergène (J35 du protocole), mais que ces réponses sont moins importantes que celles mesurées dans les 48 heures qui suivent l'arrêt de cette exposition (J23 du protocole). L'administration de trois doses de 25 µg de NTC à partir de la dernière exposition à l'extrait d'acariens n'exacerbe ni la réponse immunitaire systémique, ni la réponse inflammatoire, ni la réponse fibrotique induites par l'allergène, mais est toutefois capable d'augmenter l'hyperproduction de mucus.

Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus jusqu'ici suggèrent qu'une dose totale de 75 µg de NTC n'est pas capable d'augmenter la réponse immunitaire ou la réponse fibrotique induite par les allergènes d'acariens, ceci quel que soit le moment de l'exposition. Cette même dose semblerait en revanche capable d'augmenter l'inflammation des voies aériennes induites par ces allergènes, du moins à court terme, ainsi que l'hyperproduction de mucus.

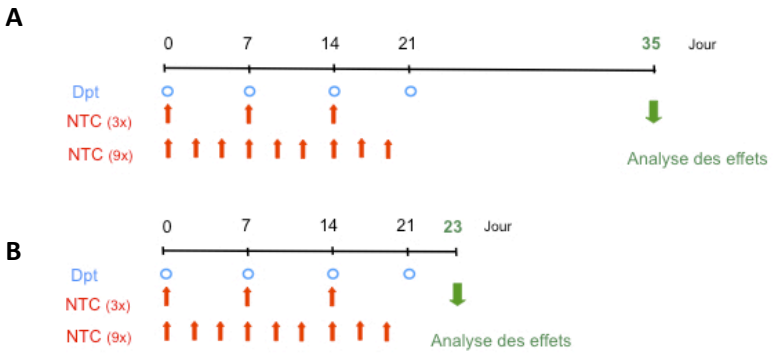


Figure 55. Protocoles de traitement des souris exposées à une dose totale de 225 µg de NTC. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule. L'administration des NTC a commencé dès la première exposition à l'allergène. Aux jours 0, 7 et 14, l'administration des NTC et de l'extrait d'allergènes s'est faite dans des solutions séparées à 6 heures d'intervalle **(A)** ou dans la même solution **(B)**. Les LBA, le poumon et le sérum ont été recueillis deux semaines après la dernière exposition à l'allergène, soit au jour 35 du protocole **(A)** ou 48 heures après la dernière exposition à l'allergène, soit au jour 23 du protocole **(B)**.

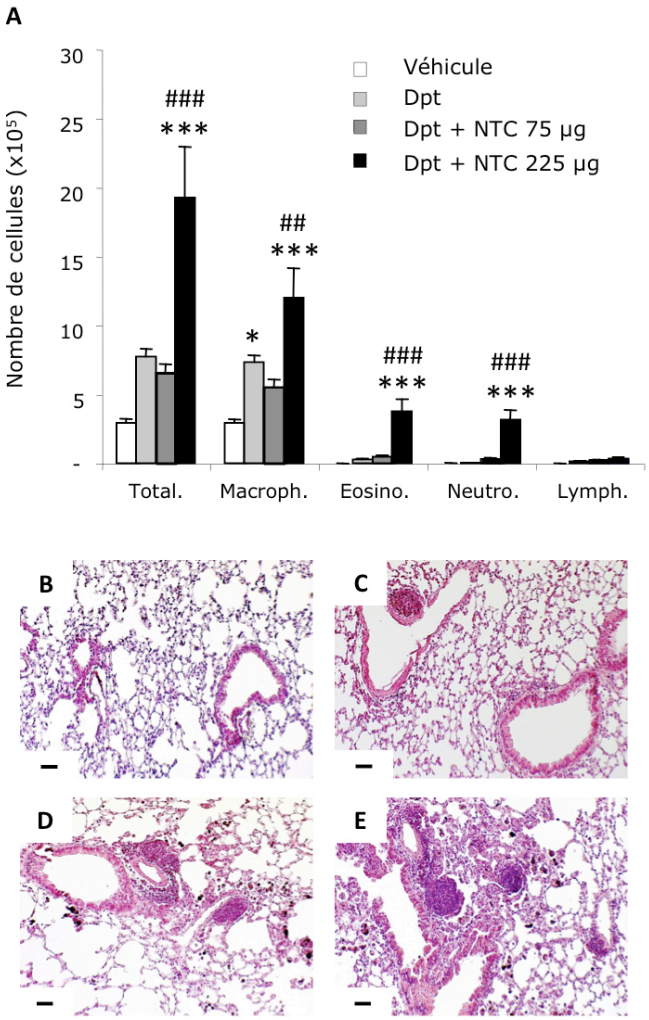


Figure 56. Effet sur l'inflammation induite par l'allergène d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses deux semaines après la dernière exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 55A. **A :** Nombre de cellules dans les LBA et **B** à **E** : Analyse histopathologique (coloration à l'hématoxyline/éosine ; échelle = 50 µm) du tissu pulmonaire des animaux des groupes véhicule (B), Dpt (C), Dpt + 75 µg de NTC (D) et Dpt + 225 µg de NTC (E). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à $p<0,05$ (un symbole), $p< 0,01$ (deux symboles) et $p<0,001$ (trois symboles) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

D.III.2. Effet d'une dose totale de 225 µg de NTC

N'ayant pas vu d'effet, ou peu d'effet, des NTC à la dose de 75 µg, nous avons décidé, dans les protocoles suivants, d'augmenter la répétition des doses de NTC à 9 administrations, correspondant à une **dose totale de 225 µg**. Dans cette partie de notre travail, les administrations de NTC ont commencé dès la première exposition à l'allergène (i.e. pendant la sensibilisation), la dose de 75 µg de NTC a été conservée à titre comparatif, et les réponses induites par l'allergène ont été mesurées **soit 2 semaines, soit 48 heures** après la dernière administration d'extrait d'acariens, pour se placer dans les mêmes conditions que précédemment (**Figure 55 A et B**).

D.III.2.1. Effets mesurés deux semaines après la dernière exposition à l'extrait d'allergènes

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux effets induits 2 semaines après la dernière administration de l'extrait d'acariens, soit à J35. Ainsi, dans un troisième protocole, les animaux ont reçu, en plus des administrations d'extrait, 3 ou 9 instillations intranasales de 25 µg de NTC selon le protocole décrit à la **figure 55 A**. L'administration des NTC et de l'extrait d'allergène s'est faite dans des solutions séparées à 6 heures d'intervalle. Les animaux contrôles ont reçu l'extrait d'acariens ou le véhicule seul. Les LBA et les poumons ont été recueillis au jour 35. Dans ce travail, seules les réponses inflammatoire et fibrotique, ainsi que la production de mucus ont été mesurées.

Nous pouvons tout d'abord constater que dans ce protocole mesurant les réponses à J35, la dose de NTC de 75 µg n'a pas d'effet sur l'inflammation induite par les allergènes d'acariens, alors qu'elle avait un effet aggravant dans le protocole mesurant les effets à J23 (1er protocole) (**Figure 56 A**). Par contre, l'administration des NTC à la dose de 225 µg provoque une **augmentation de l'inflammation** induite par l'extrait. En effet, l'afflux cellulaire, caractérisé par des infiltrats de macrophages ($p<0,01$), d'éosinophiles ($p<0,001$) et de neutrophiles ($p<0,001$), est plus important dans les LBA des animaux exposés à la fois à l'extrait et à 225 µg de NTC, comparé aux animaux qui n'ont reçu que l'extrait. De plus, l'examen histologique des poumons des animaux (**Figure 56 C, D et E**) révèle la présence d'infiltrats cellulaires, en accord avec ceux mesurés dans les LBA. Ces infiltrats sont en effet plus importants lors de l'exposition à l'extrait et à 225 µg de NTC (**Figure 56 E**), comparé aux animaux qui n'ont reçu que l'extrait allergénique.

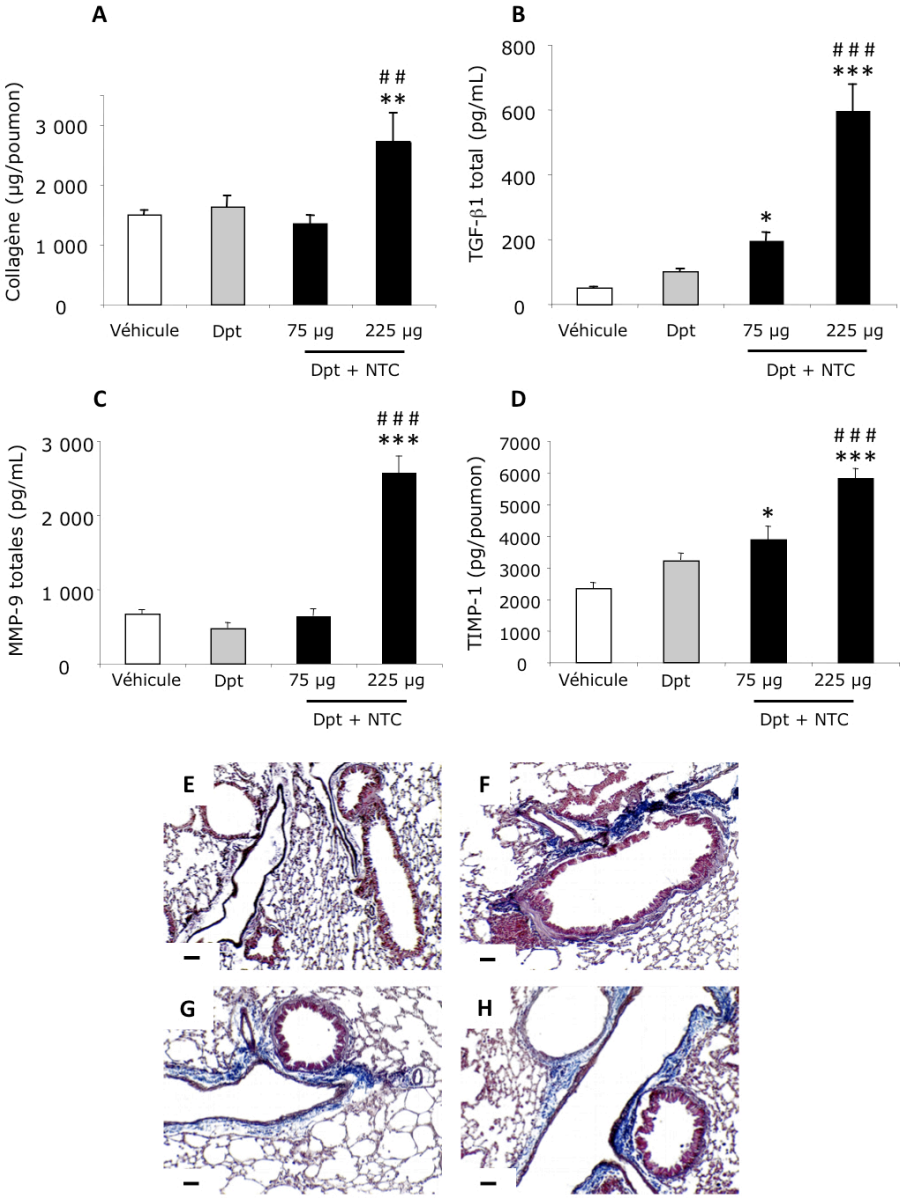


Figure 57. Effet sur la réponse fibrotique induite par l'allergène d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses deux semaines après la dernière exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 55A. **A** : concentration en collagène total dans les homogénats de poumon, **B** : concentration en TGF-β1 total dans les LBA, **C** : concentration en MMP-9 totales dans les LBA et **D** : concentration en TIMP-1 dans les homogénats de poumon. **E** à **H** : Dépôt de collagène (coloration Trichrome de Masson, échelle = 50 µm) dans les poumons de souris du groupe véhicule (E), Dpt (F), Dpt + 75 µg de NTC (G) et Dpt + 225 µg de NTC (H). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (*) ou (#), p< 0,01 (**) et p< 0,001 (***) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

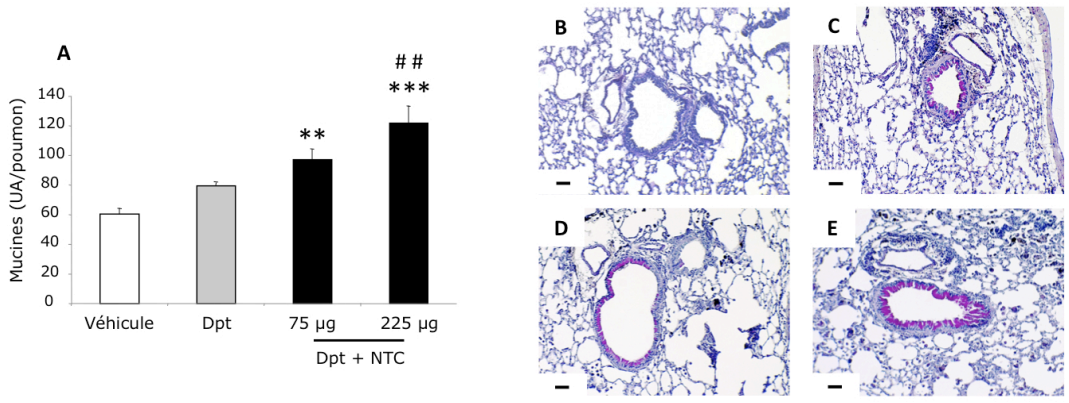


Figure 58. Effet sur la production de mucus induite par l'allergène d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses deux semaines après la dernière exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 55A. **A** : Contenu en mucines dans les homogénats de poumon et **B à D** : production de mucus (coloration au PAS, échelle = 50 µm) dans les poumons de souris des groupes véhicule (B), Dpt (C), Dpt + 75 µg de NTC (D), Dpt + 225 µg de NTC (E). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p< 0,01 (**) ou (##) et p< 0,001 (***) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

Comme dans le 1er protocole, nous pouvons constater, dans ce protocole mesurant les réponses à J35 (et non à J23), que la dose de NTC de 75 µg n'a pas d'effet sur la réponse fibrotique induite par les allergènes d'acariens (**Figure 57 A, B, C et D**). Par contre, l'administration des NTC à la dose de 225 µg provoque une **augmentation de la réponse fibrotique** induite par l'extrait. En effet, les concentrations en collagène total ($p<0,01$), en TGF-β1 total ($p<0,001$), en MMP-9 ($p<0,001$) et en TIMP-1 ($p<0,001$) sont plus importantes chez les animaux exposés à la fois à l'extrait et à 225 µg de NTC, comparé aux animaux qui n'ont reçu que l'extrait. De même, l'analyse histologique montre un dépôt de collagène chez les animaux exposés à l'extrait d'acariens et à 225 µg de NTC (**Figure 57 H**).

Enfin, dans ce protocole mesurant les réponses à J35, nous pouvons constater que la dose de NTC de 75 µg n'a pas induit, comme dans le 1er protocole, d'augmentation de la production de mucus induite par les allergènes d'acariens (**Figure 58 A et D**). En revanche, la dose de 225 µg de NTC a provoqué une **augmentation significative de l'hyperproduction de mucus** ($p<0,01$) induite par l'allergène (**Figure 58 A et E**).

Ce protocole étudiait les effets de deux doses totales de NTC (75 et 225 µg) administrées dès la première exposition à l'allergène sur les réponses induites par un extrait d'allergènes d'acariens, ces réponses étant mesurées 2 semaines après la dernière administration de l'extrait, soit à J35. Les résultats obtenus montrent que les NTC induisent une augmentation dose-dépendante de l'inflammation, de la réponse fibrotique et de l'hyperproduction de mucus induites par l'allergène, la dose de NTC de 225 µg étant la seule capable d'augmenter ces réponses. En outre, les données de ce protocole confirment que les réponses induites par les allergènes d'acariens diminuent en intensité quand la durée qui sépare l'arrêt de l'administration de l'extrait et leur évaluation augmente.

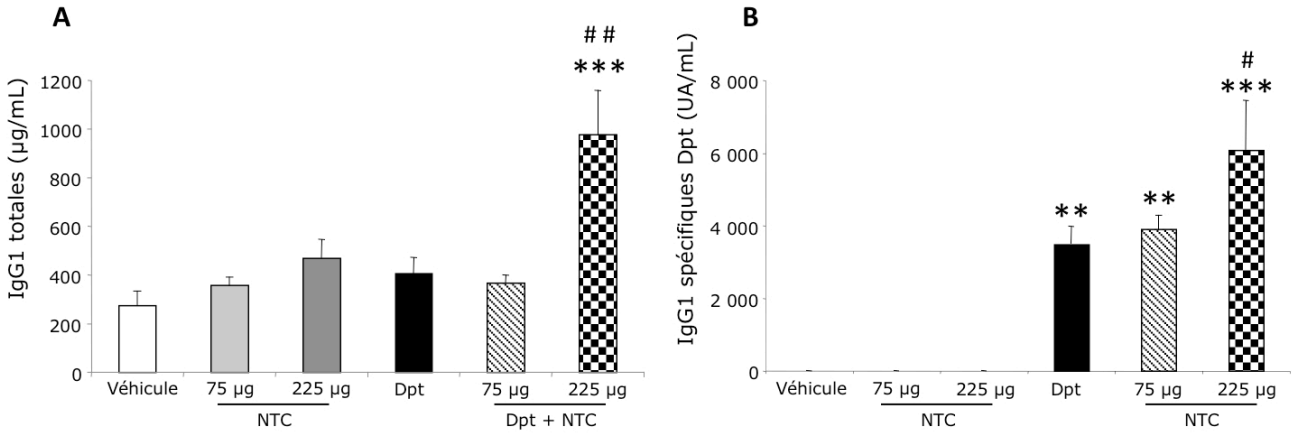


Figure 59. Effet sur la réponse immunitaire systémique d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses 48 heures après la dernière exposition à l'allergène. A : Niveaux en IgG1 totales et **B** : niveaux en IgG1 spécifiques de Dpt dans les sérums de souris ayant reçu les NTC (NTC), l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule, selon le protocole décrit à la figure 55B. Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (un symbole), p< 0,01 (deux symboles) et p<0,001 (troi symboles) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

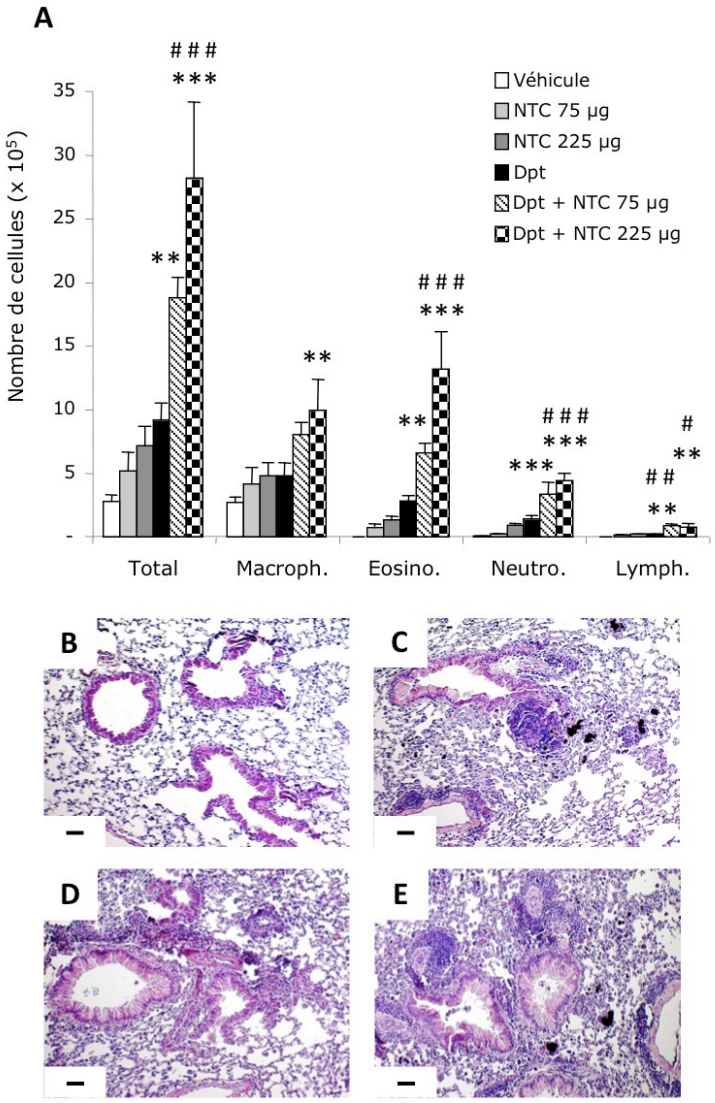


Figure 60. Effet sur l'inflammation induite par l'allergène d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses 48 heures après la dernière exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu les NTC (NTC), l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 55B. **A** : Nombre de cellules dans les LBA et **B à E** : Analyse histopathologique (coloration à l'hématoxyline/éosine ; échelle = 50 µm) du tissu pulmonaire des animaux des groupes véhicule (B), 225 µg de NTC (C), Dpt (D) et Dpt + 225 µg de NTC (E). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (un symbole), p< 0,01 (deux symboles) et p<0,001 (trois symboles) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

D.III.2.2 Effets mesurés 48 heures après la dernière exposition à l'extrait d'allergènes

Considérant l'ensemble des résultats précédents, nous avons décidé d'évaluer au jour 23 du protocole (soit 48 heures après la dernière administration de l'extrait), l'effet sur les réponses à l'allergène de neuf administrations de 25 µg NTC. Dans ce travail, nous avons également mené des études mécanistiques portant sur l'implication des cellules épithéliales, du stress oxydant et de l'inflammasome NLRP3 dans les effets induits par les NTC.

Ainsi, dans un quatrième protocole, les animaux ont été exposés à l'extrait d'acariens et aux NTC suivant un calendrier similaire à celui décrit précédemment, mais les LBA, le poumon et le sérum ont été recueillis 48 heures après la dernière administration de l'allergène (**Figure 55 B**). Par ailleurs, alors que dans les protocoles précédents, l'extrait et les NTC avaient été administrés dans deux solutions séparées, dans ce protocole, l'extrait et les NTC ont été administrés dans la même solution. En effet, même si ce point est encore discuté, des études ont suggéré que l'administration concomitante de l'allergène et de la particule est importante à l'obtention d'un effet adjuvant sur la réponse immunitaire, effet que nous n'avons pas pu jusque là démontrer (Heo *et al.*, 2001; van Zijverden *et al.*, 2001).

Dans ce protocole mesurant les réponses à J23, nous pouvons constater que la dose de NTC de 75 µg n'a pas induit, comme dans le 1er protocole, d'augmentation des IgG1 totales, ni des IgG1 spécifiques, comparé aux animaux qui n'ont reçu que l'extrait d'acarien (**Figure 59 A et B**). En revanche, la dose de 225 µg de NTC a provoqué une **augmentation significative des IgG1 totales** ($p<0,01$) et des **IgG1 spécifiques** ($p<0,05$) comparé aux animaux qui n'ont reçu que l'extrait.

Nous pouvons également constater que la dose de NTC de 75 µg aggrave, comme dans le 1er protocole, la réponse inflammatoire induite par les allergènes d'acariens (**Figure 60 A**). En outre, l'administration des NTC à la **dose de 225 µg** provoque une **augmentation encore plus importante de l'inflammation** induite par l'extrait, confirmant la dose-dépendance des effets des NTC sur l'inflammation observée dans le 3ème protocole. En effet, l'afflux cellulaire, caractérisé par des infiltrats de macrophages, d'éosinophiles ($p<0,001$), de neutrophiles ($p<0,001$) et de lymphocytes ($p<0,05$), est plus important dans les LBA de souris exposées à la fois à l'extrait et à 225 µg de NTC, comparé aux souris qui n'ont reçu que l'extrait. De plus, l'analyse histologique des poumons des souris (**Figure 60 C, D et E**) montre la présence d'infiltrats cellulaires. Ces infiltrats sont visiblement plus importants lors

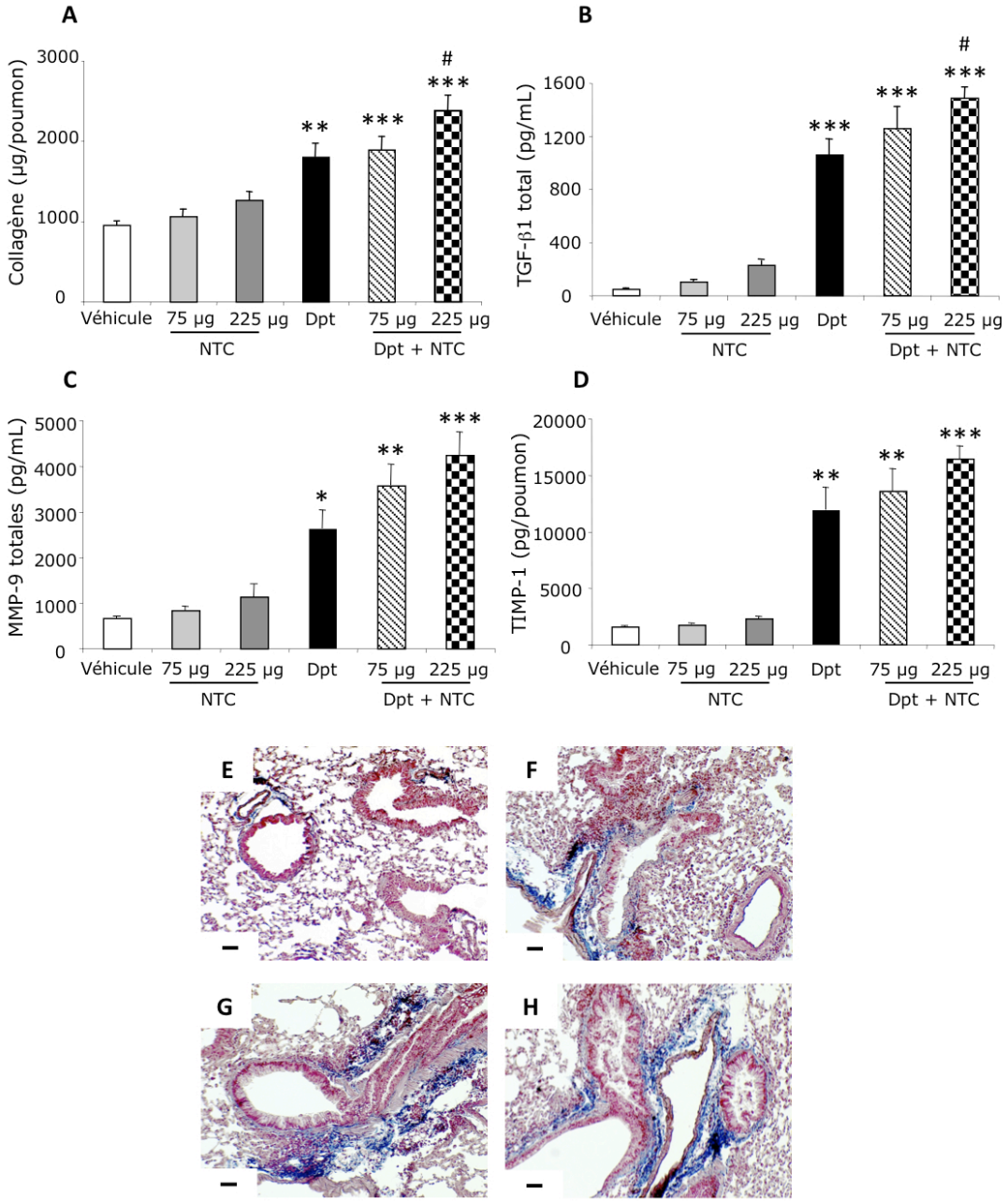


Figure 61. Effet sur la réponse fibrotique induite par l'allergène d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses 48 heures après la dernière exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu les NTC (NTC), l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit sur la figure 55B. **A** : concentration en collagène total dans les homogénats de poumon, **B** : concentration en TGF-β1 total dans les LBA, **C** : concentration en MMP-9 totales dans les LBA et **D** : concentration en TIMP-1 dans les homogénats de poumon. **E** à **H** : Dépôt de collagène (coloration Trichrome de Masson, échelle = 50 µm) dans les poumons de souris du groupe véhicule (E), 225 µg de NTC (F), Dpt (G) et Dpt + 225 µg de NTC (H). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (*) ou (#), p< 0,01 (**) et p< 0,001 (***) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

de l'exposition à l'extrait et à la dose de 225 µg de NTC (**Figure 60 E**), comparé aux souris qui n'ont reçu que l'extrait, confirmant ainsi les différences observées dans les LBA.

Comme dans tous les protocoles précédents, nous pouvons constater que la dose de 75 µg de NTC n'a pas d'effet significatif sur la réponse fibrotique induite par les allergènes d'acariens (**Figure 61 A, B, C et D**). En revanche, **la dose de 225 µg** de NTC provoque une **augmentation de la réponse fibrotique** induite par l'extrait. Ainsi, les concentrations en collagène total ($p<0,05$), en TGF-β1 total ($p<0,05$), en MMP-9 (non significatif) et en TIMP-1 (non significatif) sont plus importantes chez les souris exposées à la fois à l'extrait et à la dose de 225 µg de NTC, comparé aux souris qui n'ont reçu que l'extrait. De plus, l'analyse histologique montre une augmentation du dépôt de collagène chez les animaux exposés à l'extrait d'acariens et à 225 µg de NTC (**Figure 61 H**) comparé aux souris qui ont reçu le véhicule (**Figure 61 E)**. Ainsi, nous montrons ici qu'il est possible d'obtenir une aggravation de la réponse fibrotique induite par les allergènes d'acariens dès J23 (si l'on augmente la dose de NTC), même si cet effet semble moins important que celui observé dans le 3ème protocole (où les réponses étaient mesurées à J35) (**Figure 61** *vs* **Figure 57**).

Contrairement au 1er protocole, nous observons ici que la dose de NTC de 75 µg a provoqué une augmentation de l'hyperproduction de mucus induite par l'extrait d'acariens (**Figure 62 A**). En outre, la **dose de 225 µg** de NTC a provoqué une **augmentation encore plus importante** ($p<0,001$) **de cette réponse** (**Figure 62 A et E**), confirmant la dose-dépendance des effets des NTC sur l'hyperproduction de mucus observée dans le 3ème protocole.

Afin d'apporter des éléments mécanistiques aux effets des NTC sur la réponse à l'allergène, nous avons mesuré, dans ce protocole, la concentration en **cytokines allergiques** comme l'IL-13, l'éotaxine et TARC (**Figure 63 A**), ainsi que la concentration en **cytokines épithéliales innées** comme TSLP, GM-CSF, l'IL-25 et l'IL-33 dans les homogénats de poumon des animaux (**Figure 63 B**). Ces mesures ont montré que certaines de ces cytokines comme l'éotaxine, TARC, l'IL-25 et l'IL-33 sont significativement augmentées chez les souris exposées à l'extrait d'acariens seul ($p<0,001$, $p<0,01$, $p<0,05$ et $p<0,001$ respectivement) comparé au groupe véhicule. D'autres cytokines comme TSLP et GM-CSF sont aussi augmentées chez les souris exposées à l'extrait seul, mais de façon non significative. De plus, nous pouvons constater que la dose de 75 µg de NTC ne provoque pas d'augmentation de la production de ces cytokines induite par l'extrait. En revanche, **la dose de NTC de 225 µg** induit une **augmentation** de la production induite par l'extrait **de toutes ces cytokines.** En effet, les concentrations en IL-13, éotaxine et TARC sont significativement plus élevées chez les souris exposées à l'extrait et à 225 µg de NTC, par

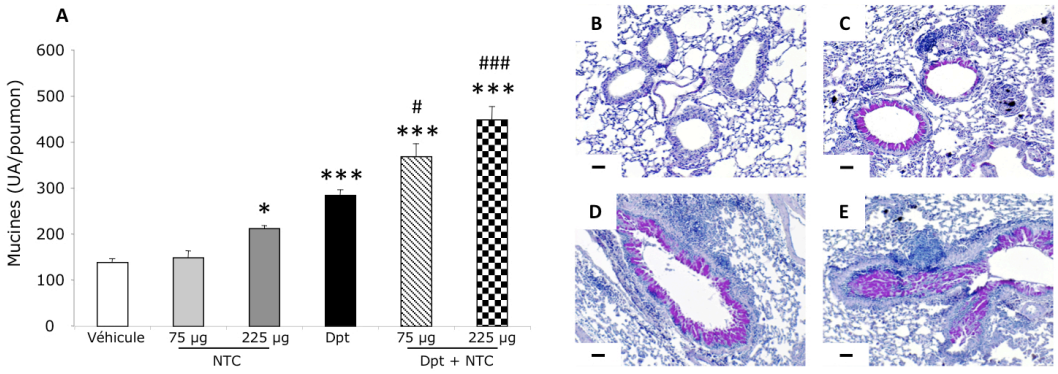


Figure 62. Effet sur la production de mucus induite par l'allergène d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses 48 heures après la dernière exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu les NTC (NTC), l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 55B. **A** : Contenu en mucines dans les homogénats de poumon. **B à E** : production de mucus (coloration au PAS, échelle = 50 µm) dans les poumons de souris des groupes véhicule (B), 225 µg de NTC (C), Dpt (D) et Dpt + 225 µg de NTC (E). Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (*) ou (#), p< 0,01 (**) et p< 0,001 (***) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

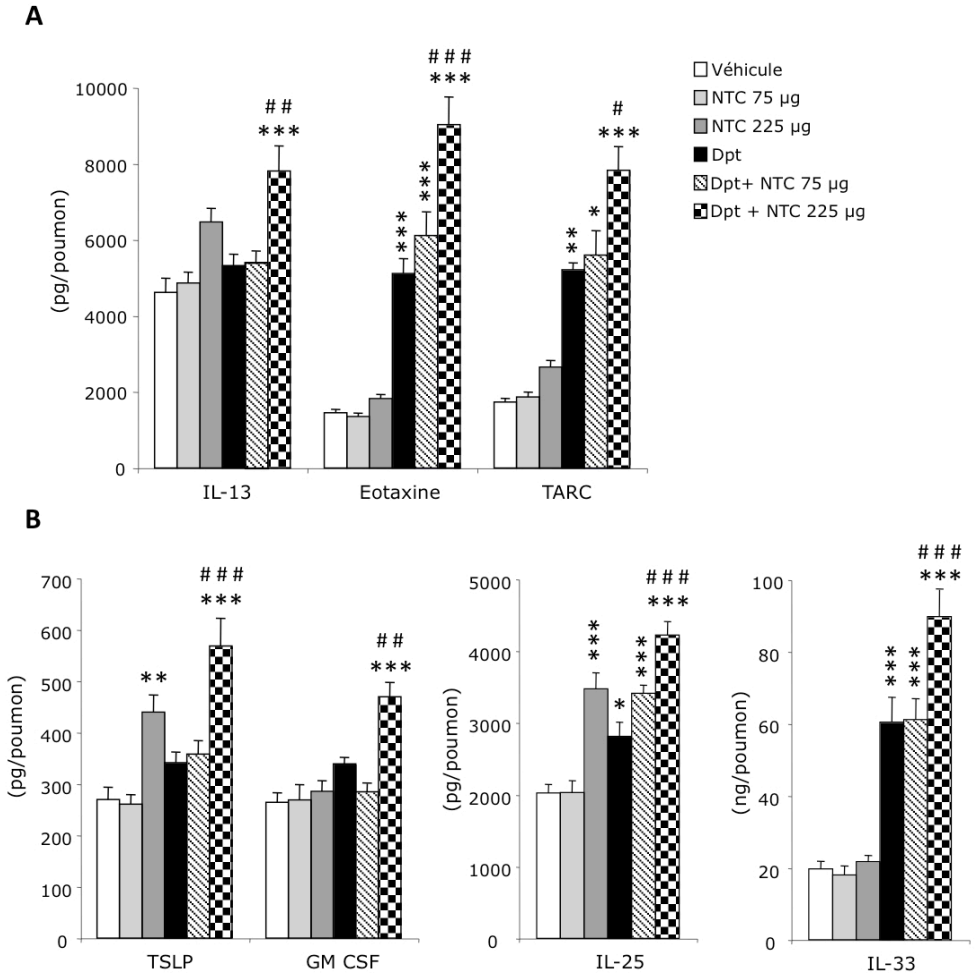


Figure 63. Effet sur la production de cytokines allergiques et de cytokines innées dérivées de l'épithélium induite par l'allergène d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses 48 heures après la dernière exposition à l'allergène. A et B : concentration en cytokines dans les homogénats de poumon de souris ayant reçu les NTC (NTC), l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 55B. Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (un symbole), p< 0,01 (deux symboles) et p<0,001 (trois symboles) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

rapport aux souris exposées à l'extrait seul ($p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,05$ respectivement). De même, les concentrations en TSLP, GM-CSF, IL-25 et IL-33 sont significativement plus hautes chez les souris exposées à l'extrait et à 225 µg de NTC en comparaison à l'extrait seul ($p<0,001$, $p<0,01$, $p<0,001$ et $p<0,001$, respectivement).

Afin d'évaluer l'implication du **stress oxydant** et de l'**inflammasome** NLRP3 dans les effets déclenchés par les NTC, nous avons mesuré la production d'ERO, de l'IL-1β et l'activité de la caspase-1 dans les homogénats de poumon, ainsi que l'ATP dans les LBA. Aucune augmentation du stress oxydant n'est observée dans les poumons de souris exposées à l'extrait d'acariens (**Figure 64 A**). En revanche, l'exposition à l'extrait d'acariens et aux NTC induit une augmentation significative des ERO dans les poumons des souris, en particulier pour la dose de 225 µg de NTC, en comparaison au véhicule ($p<0,001$) et à l'extrait seul ($p<0,01$). L'exposition à l'extrait seul provoque une augmentation significative de la concentration en IL-1β dans les poumons des souris, comparé au groupe véhicule ($p<0,01$). Mais aucune différence n'est constatée entre les animaux exposés à l'extrait et aux NTC, et les animaux exposés à l'extrait seul (**Figure 64 B**). L'activité de la caspase-1 est inchangée quels que soient les groupes (non montré). Enfin, si l'exposition à l'extrait d'acariens ne provoque pas d'augmentation de la production d'ATP dans les LBA des souris, celle-ci est augmentée lors de l'exposition aux NTC seuls ou lors de l'exposition à l'extrait et aux NTC. Toutefois, il n'y a pas de différence entre ces deux cas (**Figure 64 C**).

Ce protocole étudiait les effets de deux doses totales de NTC (75 et 225 µg), administrées dès la première exposition à l'allergène, sur les réponses induites par un extrait d'allergènes d'acariens, ces réponses étant mesurées 48 heures après la dernière administration de l'allergène, soit à J23. Les résultats obtenus montrent comme dans le protocole précédent, que les NTC induisent une augmentation dose-dépendante de l'inflammation, de la réponse fibrotique et de l'hyperproduction de mucus induites par l'allergène. De plus, ils mettent en évidence que les NTC sont également capables d'exercer un effet adjuvant sur la réponse immunitaire, la dose de NTC de 225 µg étant ici la seule à exercer cet effet. Concernant les hypothèses mécanistiques envisagées, nos résultats montrent que les NTC provoquent, en particulier, une augmentation de la production des cytokines épithéliales innées et des ERO induites par l'allergène.

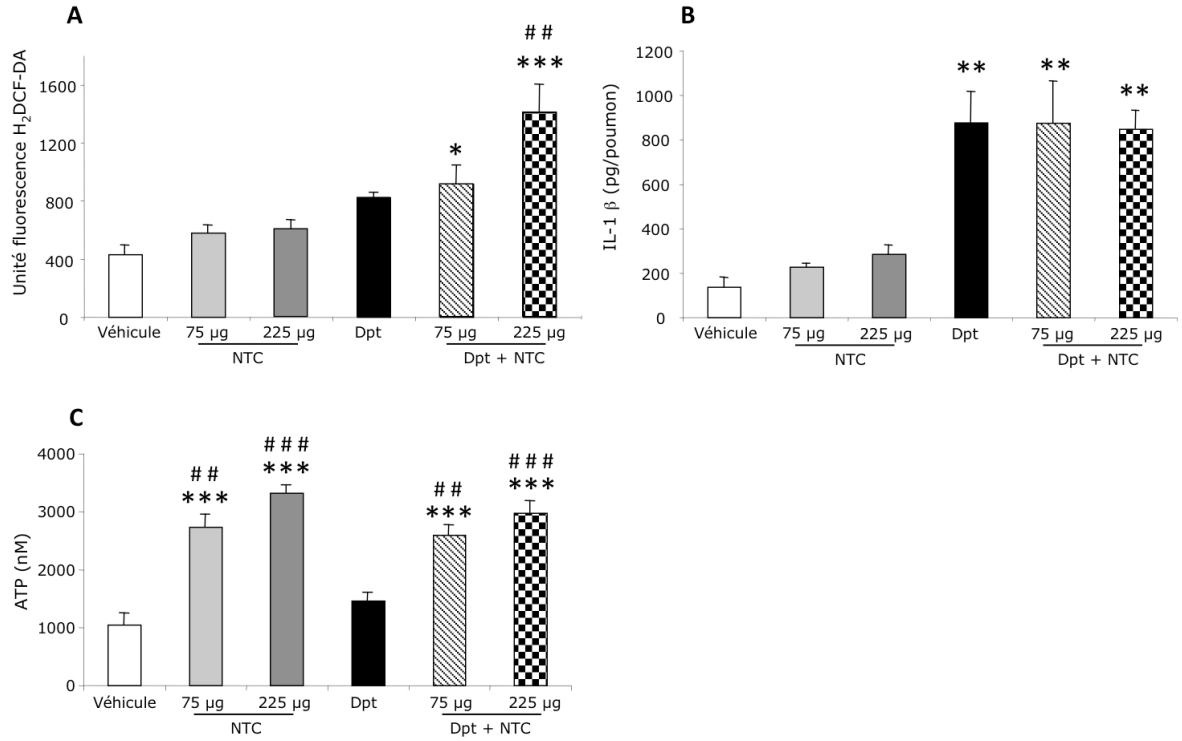


Figure 64. Effet sur la production d'ERO, d'IL-1β et d'ATP, d'une dose totale de 225 µg de NTC dans le cas d'une évaluation des réponses 48 heures après la dernière exposition à l'allergène. Les animaux ont reçu les NTC (NTC), l'extrait d'acariens (Dpt), l'extrait d'acariens et les NTC (Dpt + NTC) ou leur véhicule selon le protocole décrit à la figure 55B. **A :** production d'ERO dans les homogénats de poumon, **B** : concentration en IL-1β dans les homogénats de poumon et **C** : concentration en ATP dans les LBA. Les données sont les moyennes ± SEM de n=6 animaux. Différences statistiquement significatives à p<0,05 (un symbole), p< 0,01 (deux symboles) et p<0,001 (trois symboles) en comparaison au véhicule (*) ou au groupe Dpt (#), déterminées par une ANOVA suivi d'un test de Tuckey.

L'ensemble des données de cette dernière partie de notre travail est résumé au tableau 8. L'analyse synthétique de nos résultats suggère que les effets des NTC sur la réponse à l'allergène dépendent de la dose de NTC administrée et du moment de l'exposition, et qu'ils sont, selon la dose, plus ou moins persistants.

Tableau 8 : Résumé des données concernant les effets des NTC sur la réponse à l'allergène en fonction des conditions expérimentales.

Moment exposition aux NTC [a] **Mesure des réponses** [b]	Pendant sensibilisation 48 heures	Après sensibilisation 2 semaines	Pendant sensibilisation 2 semaines		Pendant sensibilisation [c] 48 heures	
Dose de NTC (µg)	75	75	75	225	75	225
Réponse immunitaire	0	0	ND	ND	0	++
Inflammation	+	0	0	+++	+	+++
Réponse fibrotique	0	0	0	+++	0	+
Production de mucus	0	+	0	++	+	+++

a : exposition aux NTC pendant la phase de sensibilisation à l'allergène (i.e. dès la première exposition à l'extrait d'acariens) ou après cette phase de sensibilisation (i.e. à partir de la dernière exposition à l'extrait d'acariens).

b : mesure des réponses 48 heures ou 2 semaines après la dernière administration de l'extrait d'acariens.

c : co-administration des NTC et de l'extrait d'allergènes dans la même solution.

ND : non déterminé

Chapitre 4 – Discussion

I. Mise au point d'une méthode de dispersion des NTC

La première partie de notre travail a eu pour objectif de mettre au point une méthode de dispersion des NTC en milieu aqueux par sonication en présence d'un agent dispersant. Ce travail a eu plus particulièrement pour but d'identifier un agent dispersant efficace et compatible avec la voie respiratoire. Pour cela, la capacité de dispersion d'agents décrits dans la littérature, à savoir un **phospholipide** (DPPC), deux **détergents** (Pluronic® ou SDS) et une **protéine** (albumine), a été comparée à celle de deux milieux élaborés par nos soins, un **mélange phospholipide-détergent** et un **surfactant pulmonaire synthétique**.

Au cours de ce travail, parmi les agents décrits dans la littérature, **seuls le Pluronic®, le SDS et l'albumine ont permis d'obtenir une dispersion des NTC.** Cette dispersion était stable dans le cas du SDS et du Pluronic®, mais sédimentait dans les 24 heures suivant la préparation dans le cas de l'albumine. Dans la littérature, le Pluronic® (Mutlu *et al.*, 2010), le SDS (Park *et al.*, 2011) et l'albumine (Buford *et al.*, 2007; Elgrabli *et al.*, 2007; Bihari *et al.*, 2008) ont été décrits comme de bons agents dispersants des NTC. Mutlu *et al.* ont de plus montré une stabilité jusqu'à deux ans des dispersions de SWCNT en présence de Pluronic® (Mutlu *et al.*, 2010). En revanche, tout comme nous, Elgrabli *et al.* ont observé que les dispersions de SWCNT et de MWCNT en présence d'albumine n'étaient pas stables, les agglomérats devenant de plus en plus gros en fonction du temps, ce qui nécessitait de réaliser la suspension immédiatement avant l'expérimentation (Elgrabli *et al.*, 2007). Au cours de notre travail, nous n'avons pu obtenir **aucune dispersion des NTC avec la DPPC.** Si la DPCC a été utilisée par certains auteurs pour disperser des SWCNT et des MWCNT en vue d'études *in vitro* (Herzog *et al.*, 2009; Tabet *et al.*, 2009), d'autres auteurs ont émis des réserves quant à ses propriétés dispersantes. En effet, Sager *et al.* ont montré que la DPPC ne dispersait pas de façon satisfaisante des particules ultrafines de noir de carbone (Sager *et al.*, 2007). De même, Tabet *et al.* ont rapporté l'existence d'agrégats de MWCNT avec ce dispersant et ont précisé que ces agrégats étaient de taille très importante (de l'ordre de 500 µm) (Tabet *et al.*, 2009). Ainsi, nos résultats concernant la DPPC ne sont pas en contradiction avec la littérature.

Au cours de notre travail, parmi les alternatives aux agents décrits dans la littérature, **l'utilisation d'un mélange phospholipide-détergent, bien que séduisante, n'a pas donné les résultats escomptés.** En effet, si une dispersion a été obtenue avec le mélange

DDPC-cholate de sodium, l'élimination du détergent par dialyse a provoqué sa déstabilisation, suggérant un rôle primordial du détergent dans l'obtention de la dispersion initiale. En revanche, **l'utilisation d'un surfactant pulmonaire synthétique composé de DPPC, PG, Chol et albumine a permis d'obtenir des dispersions de NTC** qui, de plus, se sont avérées **stables dans le temps**. Aucune étude de la littérature n'a à ce jour utilisé un surfactant synthétique pour disperser des NTC en milieu aqueux. Toutefois, certains groupes ont employé des LBA issus d'animaux donneurs (Sager *et al.*, 2007) ou un surfactant commercial naturel (Wang *et al.*, 2010a), afin de recréer l'interface que les NP sont susceptibles de rencontrer après inhalation. En accord avec nos données, ces travaux ont montré qu'il était possible par cette démarche d'obtenir une dispersion stable de NTC. Dans la littérature, il a été rapporté, que la DPPC ou l'albumine seule ne permet pas de disperser des particules ultrafines de noir de carbone, que le mélange DPPC-albumine permet en revanche d'obtenir une dispersion de ces particules, mais que cette dispersion demeure moins bonne que celle obtenue avec des LBA (Sager *et al.*, 2007). Pris dans leur ensemble, nos données et celles de la littérature suggèrent qu'outre la DPPC et l'albumine, d'autres constituants du surfactant pulmonaire (lipides neutres, PG) jouent un rôle important dans la dispersion des NP.

Afin de comparer l'efficacité des différents agents dispersants évalués, une caractérisation des préparations en MO en lumière blanche a été menée. Ce travail a révélé **la présence d'agglomérats grossiers de NTC quel que soit le milieu de dispersion utilisé**. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, dans une étude comparant une grande variété d'agents dispersants, dont l'albumine, et une grande variété de NP de carbone, parmi lesquelles des SWCNT et des MWCNT, Buford *et al.* ont trouvé que des agglomérats étaient présents, dans une certaine mesure, dans tous les milieux de dispersion et pour toutes les particules (Buford *et al.*, 2007). De même, dans l'étude de Sager *et al.,* l'utilisation de LBA pour disperser les NP n'a pas permis d'éviter la formation d'agglomérats, suggérant que l'obtention de dispersions sans agglomérats de NP est un objectif très difficile à atteindre ou requiert des concentrations en agent dispersant qui sont incompatibles avec des études *in vivo* (Sager *et al.*, 2007). Toutefois, notre travail de comparaison des dispersions en MO en lumière blanche nous a permis de constater que **les agglomérats étaient plus petits dans les dispersions préparées dans le surfactant ou l'albumine par rapport à celles réalisées dans le Pluronic® et le SDS,** suggérant une meilleure efficacité des 2 premiers agents. Comme évoqué plus haut, l'albumine a été décrite comme bon agent dispersant des NTC (Buford *et al.*, 2007; Elgrabli *et al.*, 2007; Bihari *et al.*, 2008), ce qui est en accord avec nos observations. Par contre, à notre connaissance, aucune étude de dispersion de NTC n'a comparé l'efficacité d'un surfactant pulmonaire naturel ou synthétique à celle de l'albumine

ou de détergents. Toutefois, plusieurs auteurs ont rapporté que les détergents n'étaient pas satisfaisants pour disperser les SWCNT ou les MWCNT comparé à l'albumine ou au sérum (Buford *et al.*, 2007; Elgrabli *et al.*, 2007), ce qui va dans le sens de nos observations.

Une caractérisation plus approfondie des préparations de NTC dans l'albumine et le surfactant par DLS et MET a été menée afin de comparer davantage l'efficacité de ces deux agents. Il est important de préciser que les mesures de DLS s'appliquent normalement à des particules sphériques, et ne sont donc pas appropriées pour déterminer la taille des particules sous forme de fibre. Néanmoins, cette technique donne des informations importantes concernant l'état de dispersion de ces particules, et a déjà été utilisée pour comparer différents milieux de dispersion des NP (Bihari *et al.*, 2008). La caractérisation approfondie de nos deux préparations a révélé que la dispersion des NTC était meilleure dans le surfactant qu'en présence d'albumine. Les données de DLS ont en effet indiqué que le diamètre moyen des particules en suspension était plus petit dans le surfactant que dans l'albumine. De plus, les observations en MET ont montré la présence de NTC individualisés dans les préparations à base de surfactant, alors que dans les dispersions en présence d'albumine, les NTC étaient organisés principalement sous forme d'agglomérats larges et denses, ce qui au final montre que le surfactant est un meilleur agent dispersant que l'albumine.

Pris dans leur ensemble, ces résultats nous ont conduits à retenir comme agent dispersant le surfactant synthétique développé par nos soins, car ce dernier a permis l'obtention de dispersions efficaces et stables de nos NTC. Le choix de ce surfactant synthétique développé est de surcroît le plus pertinent pour une administration des NTC par voie respiratoire.

II. Étude de la biodistribution des NTC dans les voies respiratoires

Le deuxième objectif de notre travail de thèse a été d'étudier la distribution spatiale des NTC dans le poumon de souris après administration par voie respiratoire. Pour cela, deux approches ont été explorées, l'une basée sur l'utilisation de NTC marqués à l'aide de fluorophores, et l'autre basée sur l'utilisation de NTC non marqués.

Nos travaux sur les NTC marqués ont révélé un problème d'extinction de la fluorescence des fluorophores suite à leur ancrage sur les NTC. En effet, l'étude en MCF des différents conjugués NTC-fluorophore conçus n'a pas permis d'identifier d'objets présentant un signal de fluorescence (ou un signal suffisamment intense pour des études *in*

vivo), ceci quels que soient le type de fluorophore utilisé (hydrophobe = TDI ou hydrophile = Cy5), le mode d'ancrage du fluorophore à la surface du NTC (covalent ou non covalent), la longueur ou l'hydrophilie du bras d'ancrage du fluorophore, la densité de marquage ou encore la modification de l'état de surface du NTC. Ce phénomène a empêché la mise en œuvre d'une étude de la distribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris par imagerie de fluorescence.

L'extinction partielle de fluorescence d'un fluorophore suite à son ancrage covalent ou non covalent à la surface de NTC est un phénomène qui a déjà été rapporté dans la littérature à plusieurs reprises. En effet, Nakayama *et al.* ont montré que l'émission de fluorescence de la fluorescéine était réduite de 67% lorsque celle-ci était adsorbée à la surface de SWCNT (Nakayama-Ratchford *et al.*, 2007). De même, Zhang *et al.* ont rapporté une extinction partielle de la fluorescence de l'acridine orange adsorbée à la surface de SWCNT (Zhang *et al.*, 2010). De plus, une extinction de la fluorescence de la porphyrine (Jia *et al.*, 2009) ou du pyrylium (Aprile *et al.*, 2009) a été décrite après l'ancrage covalent de ces marqueurs à la surface de MWCNT ou de SWCNT. Plusieurs auteurs ont proposé que la distance séparant le fluorophore du NTC soit un facteur déterminant dans la survenue d'une extinction de fluorescence (Prakash *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2009). Ainsi, des données de la littérature pourraient expliquer l'absence de signal de fluorescence de notre série de NTC marqués de façon non covalente par **adsorption de TDI.** Toutefois, elles n'expliquent pas pourquoi toutes les stratégies, mises en œuvre pour éloigner le marqueur du NTC, se sont avérées infructueuses.

Ainsi, plusieurs hypothèses ont été envisagées pour tenter d'expliquer l'extinction de fluorescence observée au cours de notre travail.

La première de ces hypothèses est que **la nature du fluorophore** soit importante dans la survenue d'un phénomène d'extinction de fluorescence. En effet, bien que les dérivés des cyanines soient largement employés en imagerie de fluorescence dans des systèmes biologiques, ces fluorophores ont été relativement peu utilisés dans la littérature pour le marquage des NTC. Néanmoins, les fluorophores Cy3 (Kam *et al.*, 2005) et Cy5 (Dong *et al.*, 2009) ont été utilisés pour marquer des SWCNT (marquage non covalent), afin d'étudier l'internalisation des NTC dans des cellules en culture, et les auteurs de ces travaux n'ont pas rapporté d'extinction de la fluorescence de ces marqueurs. La fluorescéine a été quant à elle plus largement employée dans la littérature pour le marquage de SWCNT (Cheng *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Heister *et al.*, 2009) ou de MWCNT (Wu *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011). Ainsi, afin de mieux confronter nos résultats à ceux de la littérature, un conjugué

MWCNT-fluorescéine a été conçu. Mais, les objets obtenus se sont également révélés non fluorescents. Toutefois, il est important de préciser que notre conjugué n'a pas été conçu de la même façon que ceux décrits dans la littérature. En effet, dans notre cas, la fluorescéine a été conjuguée avec un motif polyaromatique capable de s'adsorber à la surface des NTC (procédé conduisant à un ancrage non covalent), alors que dans les travaux cités plus haut, la fluorescéine a été conjuguée de façon covalente à des NTC préalablement oxydés par traitement acide. Il est donc difficile de comparer directement nos résultats à ceux de la littérature.

Une deuxième hypothèse est que **la nature du NTC** joue un rôle dans l'extinction de fluorescence. Si le marquage de MWCNT par des fluorophores a été rapporté dans la littérature (Jia *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010b; Cheng *et al.*, 2011), la majorité des études ont été conduites sur des SWCNT (Kam *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2008; Aprile *et al.*, 2009; Backes *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2009; Heister *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009; Ruggiero *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Ainsi, les NTC multi-parois pourraient être moins favorables à l'obtention de conjugués fluorescents. Pour étudier cette hypothèse, nous avons préparé des SWCNT marqués par de la fluorescéine. Mais là encore, les conjugués obtenus se sont révélés non fluorescents (résultats non montrés dans le manuscrit).

Une troisième hypothèse est que le marquage par une sonde hydrophile, quel que soit le mode d'ancrage du fluorophore à la surface du NTC ou la longueur du bras d'ancrage, conduise comme le marquage par adsorption non covalente d'un marqueur hydrophobe, à une extinction de la fluorescence des fluorophores. Pour étudier cette hypothèse, un conjugué NTC-Cy5 labile a été conçu. Non fluorescent à l'état natif, ce conjugué a généré un signal de fluorescence intense après traitement réducteur permettant de libérer le marqueur. Ainsi, nous avons apporté, avec ce conjugué labile, **la preuve** de l'existence d'un phénomène d'extinction de la fluorescence des marqueurs par nos NTC, ceci malgré l'utilisation d'un fluorophore hydrophile et de diverses stratégies d'ancrage visant à éloigner ce marqueur des NTC. Ces derniers résultats nous amènent à penser que la fluorescence rapportée par certains auteurs dans la littérature pourrait résulter d'un **relargage du fluorophore** par les NTC et non d'une fluorescence intrinsèque des conjugués (Wu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). En effet, la présence de fluorophore libre dans les échantillons de NTC marqués, du fait d'un lavage incomplet (en particulier d'un lavage au méthanol qui est inefficace pour éliminer le marqueur en excès qui pourrait être adsorbé sur les NTC au cours d'un protocole de couplage covalent) pourrait induire de faux résultats. Cette hypothèse n'a pas été rejetée par les auteurs que nous avons contactés. Au cours de nos travaux, tous les

lavages ont été réalisés au chloroforme, solvant plus efficace que le méthanol. Par ailleurs, il n'est pas impossible que les fluorophores ancrés sur les NTC de façon covalente ou adsorber *via* des interactions faibles puissent se détacher des NTC lors de leur utilisation *in vitro* ou *in vivo*, et se retrouver sous une forme libre leur permettant de fluorescer. En effet, Chen *et al.*, qui ont étudié le devenir d'un conjugué covalent SWCNT-fluorescéine dans des cellules en culture par microscopie de fluorescence, ont constaté une photoactivation du signal de fluorescence de ce conjugué après entrée dans la cellule, et ont attribué cette photoactivation à une possible hydrolyse du lien NTC-fluorescéine (Chen *et al.*, 2009). Zhang *et al.*, qui ont réalisé le même type d'étude avec des SWCNT marqués de façon non covalente par adsorption d'acridine orange, ont quant à eux remarqué que leur conjugué donnait, après internalisation dans les cellules, un fort signal de fluorescence au niveau des lysosomes (Zhang *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces auteurs ont également montré que d'une part, leur conjugué n'émettait de fluorescence qu'en milieu acide et, d'autre part, qu'en milieu acide l'acridine orange pouvait se détacher des NTC. Ainsi, le signal de fluorescence mis en évidence par ces auteurs dans les lysosomes pourrait résulter d'un relargage de l'acridine orange des NTC du fait d'un pH localement acide.

Du fait de constructions chimiques propres à chaque étude, il est très difficile de comparer totalement nos résultats et ceux de la littérature, et de nous prononcer clairement sur le problème d'extinction de fluorescence survenu au cours de notre projet. Il est important toutefois de souligner que dans notre travail de marquage des NTC, **notre démarche a toujours été de modifier aussi peu que possible les propriétés d'hydrophobie et de longueur de nos NTC**. Ainsi, nous avons toujours travaillé avec des NTC marqués relativement hydrophobes, qui avaient toujours tendance à s'agréger en milieu aqueux. Ceci pourrait conduire à un auto-quenching de fluorescence, comme l'ont suggéré certains auteurs (Jia *et al.*, 2009). *A contrario*, la plupart des études sur NTC marqués par des fluorophores parues à ce jour dans la littérature ont utilisé des NTC préalablement traités par des oxydants forts. Or, ce type de traitement conduit, non seulement à un raccourcissement notable des NTC, mais surtout à des NTC qui peuvent être totalement solubles dans l'eau. Dans ces conditions, le couplage avec le fluorophore peut être réalisé dans l'eau et les lavages sont en général faits à l'aide de méthanol. D'autre part, après couplage, le fluorophore peut mieux se « solvater » et se tenir éloigné de la surface des NTC, et la formation d'agrégats de NTC marqués est restreinte, ce qui limite probablement la survenue d'une extinction de fluorescence ou de phénomènes d'auto-quenching.

Les approches basées sur la détection des NTC non marqués ont permis de mener une étude de la distribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris. L'examen par MO en lumière blanche n'a montré **aucune obstruction** des voies respiratoires induite par des agglomérats de NTC chez les souris exposées à une administration unique ou à des administrations répétées de NTC, ce qui suggère que la dispersion des NTC dans le surfactant a été efficace pour obtenir une distribution des NTC dans le poumon (Lam *et al.*, 2004; Warheit *et al.*, 2004). Cet examen a par ailleurs révélé que les NTC se distribuent jusque dans les alvéoles pulmonaires où **ils sont phagocytés par les macrophages**. Ce motif de distribution rejoint les observations faites par de nombreux auteurs qui ont également rapporté une phagocytose des MWCNT par les macrophages alvéolaires (Muller *et al.*, 2005; Elgrabli *et al.*, 2008b; Kobayashi *et al.*, 2010; Porter *et al.*, 2010). L'analyse en MET des tissus pulmonaires a confirmé la phagocytose des NTC par les macrophages alvéolaires, mais a également révélé la présence de NTC dans le **mucus**, ainsi que dans les **pneumocytes de type II** et les **neutrophiles infiltrés** dans la lumière des voies respiratoires. En accord avec nos observations, Mercer *et al.* ont observé la présence de MWCNT dans la couche de mucus recouvrant les cellules épithéliales, ainsi que dans les cellules épithéliales alvéolaires chez la souris (Mercer *et al.*, 2010). De même, Porter *et al.* ont montré l'incorporation de MWCNT dans les cellules de la paroi alvéolaire chez la souris (Porter *et al.*, 2010). Des travaux récents de Shvedova *et al.* ont également rapporté la présence de SWCNT dans les neutrophiles infiltrés dans les poumons de souris (Shvedova *et al.*, 2012). L'étude en MO en lumière blanche et en MET du devenir des NTC chez des **souris exposées aux allergènes d'acariens** a montré une distribution tissulaire et cellulaire identique à celle observée chez la souris normale. À ce jour, aucune étude n'a cherché à déterminer si la présence d'un état inflammatoire allergique était susceptible de modifier le devenir des NTC dans les voies respiratoires. Dans la littérature, certains auteurs ont suggéré que les MWCNT pourraient pénétrer dans les **cavités subpleurale et pleurale** (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009a; Mercer *et al.*, 2010; Porter *et al.*, 2010) ou être transloqués vers la **circulation générale** (Liu *et al.*, 2008a) après leur administration par voie respiratoire chez l'animal. Chez nos animaux, aucun dépôt de NTC dans la plèvre ou dans le tissu subpleural, ou encore de translocation des NTC du poumon vers la circulation systémique, n'a été observé. Toutefois, l'analyse de ces évènements ne faisant pas partie des objectifs de notre étude, nous ne pouvons pas exclure catégoriquement leur survenue.

Ces données de biodistribution suggèrent que les macrophages, les cellules épithéliales et les neutrophiles pourraient jouer un rôle important dans la toxicité respiratoire des NTC, et en particulier dans **l'initiation et la pérennisation de la réponse inflammatoire** induite par ces NP dans le poumon. En effet, l'internalisation des NTC par ces cellules pourrait induire

leur activation, susceptible de conduire elle-même à une production d'ERO ou de médiateurs pro-inflammatoires et chémottractants pour les neutrophiles et les macrophages. En effet, des études *in vitro* ont montré que les cellules épithéliales respiratoires, ainsi que les macrophages, expriment ou sécrètent d'avantage de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux NTC, dont l'IL-6 ou l'IL-8 dans le cas des cellules épithéliales (Davoren *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2009; Hirano *et al.*, 2010; Tsukahara et Haniu, 2011) et le TNF-α dans le cas des macrophages (Muller *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007). D'autre part, la phagocytose par les macrophages ou l'internalisation par les neutrophiles pourrait contribuer **à la clairance des NTC.** Cette hypothèse a été suggérée pour **les macrophages** par Elgrabli *et al.* qui ont proposé que la phagocytose des MWCNT par les macrophages conduise à l'apoptose de ces derniers et à leur élimination par d'autres macrophages alvéolaires (Elgrabli *et al.*, 2008b). En effet, ces auteurs ont montré qu'il ne restait plus que 37% et 16% des NTC, respectivement 3 et 6 mois après leur administration dans le poumon de rats. De plus, ces auteurs ont observé que les MWCNT présents dans les LBA avaient subi des modifications physiques (longueur diminuée) et chimiques (ajout de fonctions oxygénées et azotées). **Les neutrophiles** pourraient jouer également un rôle dans la biodégradation des NTC et dans leur élimination. Ainsi, tout récemment, Kagan *et al.* ont montré que la **MPO**, qui est une enzyme présente en particulier dans les neutrophiles et qui est impliquée dans les mécanismes de la réponse immunitaire innée, est capable d'induire une dégradation oxydative des SWCNT *in vitro* (Kagan *et al.*, 2010). De même, Shvedova *et al.* ont suggéré une participation de la MPO dans la biodégradation des NTC *in vivo*, ainsi que son implication dans la clairance des SWCNT et dans la résolution de la réponse inflammatoire (Shvedova *et al.*, 2012).

Dans notre étude, nous avons constaté que les NTC étaient encore présents dans le poumon des souris 7 jours après leur administration répétée, ce qui suggère qu'ils ne sont pas rapidement éliminés. En accord avec nos observations, plusieurs auteurs ont rapporté une **persistance de NTC dans les poumons** pouvant aller jusqu'à 6 mois (Muller *et al.*, 2005; Elgrabli *et al.*, 2008b; Mercer *et al.*, 2010). Or, il a été montré que la biopersistance des particules inhalées détermine souvent leur toxicité (Oberdorster, 2002). Ainsi, Porter *et al.* ont rapporté que la biopersistance des MWCNT dans le poumon de souris exposées aux MWCNT était associée à une persistance de l'inflammation (à 56 jours) et au développement d'une fibrose (Porter *et al.*, 2010). Selon les auteurs, la biopersistance des NTC serait liée à **l'échec de leur élimination du fait d'une clairance lymphatique retardée**. En effet, ces auteurs ont observé, d'une part, la présence de nombreux macrophages de forme élargie et irrégulière remplis de NTC et, d'autre part, une dilatation des vaisseaux lymphatiques, suggérant une élimination difficile des macrophages contenant les NTC *via* le système

lymphatique. Ce phénomène de clairance lymphatique retardée a déjà été rapporté après l'exposition à des fibres d'amiante par voie respiratoire chez le rat (Trosic *et al.*, 2000). La biopersistance des NTC dans le poumon pourrait aussi être liée à l'incapacité des macrophages à phagocyter entièrement les NTC du fait de leur forme fibrillaire : c'est ce qu'on appelle **la phagocytose frustrée** (Donaldson *et al.*, 2010). Celle-ci pourrait conduire à la production d'ERO et de cytokines pro-inflammatoires, et participer à l'évolution vers une réponse inflammatoire chronique.

Au cours de notre travail sur les NTC non marqués, des observations exploratoires d'échantillons tissulaires en microscopie confocale IR nous ont permis d'obtenir une cartographie de la distribution de ces particules à l'échelle d'une coupe de poumon. L'imagerie des NTC dans le proche IR a déjà été utilisée pour étudier la biodistribution des NTC chez l'animal. Ainsi, Cherukuri *et al.* ont employé cette technique pour rechercher la présence de SWCNT dans des coupes d'organes de lapins exposés aux SWCNT par voie systémique (Cherukuri *et al.*, 2006). Néanmoins, notre travail reste original, car aucune étude de biodistribution des NTC par voie respiratoire n'a été réalisée à ce jour par microscopie confocale IR et surtout, à notre connaissance, aucune étude n'a utilisé cette technique pour cartographier la distribution de NTC à l'échelle d'une coupe entière d'un organe.

III. Impact des NTC chez la souris normale

La troisième étape du projet de thèse a été de décrire les effets respiratoires de doses croissantes de NTC chez la souris normale après exposition unique et/ou répétée, afin d'établir notamment une relation dose-effet. Dans ce travail, nous avons évalué la capacité des NTC à induire une inflammation et un remodelage (réponse fibrotique et production de mucus) des voies aériennes.

Nos données ont montré que les NTC sont capables d'induire une inflammation des voies aériennes après exposition unique ou répétée chez la souris. Cette réponse inflammatoire présente des caractéristiques différentes selon le type d'exposition. Après exposition unique aux NTC, elle est constituée d'un infiltrat de neutrophiles et d'une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires (TNF-α) et chémoattractantes des neutrophiles (KC, IL-17) dans les LBA. Après exposition répétée, elle se caractérise principalement par un afflux marqué de macrophages et une persistance de l'augmentation de la concentration de KC dans les LBA. Ces effets sont en accord avec de nombreuses études de la littérature qui ont rapporté la survenue d'une réponse

inflammatoire consécutive à l'administration unique (Muller *et al.*, 2005; Shvedova *et al.*, 2005; Erdely *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011) ou répétée de NTC (Shvedova *et al.*, 2008b; Ma-Hock *et al.*, 2009; Ravichandran *et al.*, 2011; Teeguarden *et al.*, 2011). En outre, nos résultats laissent penser que les macrophages pourraient jouer un rôle clé dans l'initiation de l'inflammation induite par les NTC, en sécrétant des cytokines comme le TNF-α, dont l'importance dans les effets pro-inflammatoires des NTC a déjà été montrée (Muller *et al.*, 2005), et KC, qui participe au recrutement des neutrophiles. À noter que l'IL-17 peut également contribuer au recrutement des neutrophiles dans les voies aériennes (Brodlie *et al.*, 2011).

D'autre part, nos résultats ont montré que l'exposition répétée aux NTC est capable d'induire une réponse fibrotique, caractérisée par l'augmentation de la production d'un facteur pro-fibrotique (le TGF-β1) et par un dépôt de collagène. Ces résultats ne sont pas surprenants, car de nombreuses études de la littérature ont rapporté une fibrose après exposition aux NTC chez le rat ou la souris (Muller *et al.*, 2005; Shvedova *et al.*, 2005; Mangum *et al.*, 2006; Porter *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011a). Nous avons observé cette réponse 21 jours après le début d'une exposition répétée aux NTC. Même si ce temps peut paraître court, il est à noter que certaines études ont montré qu'une réponse fibrotique pouvait se développer très rapidement après exposition unique aux NTC. En effet, une augmentation du collagène et des lésions fibrotiques ont été mises en évidence dans les poumons de souris dès 7 jours après l'administration unique de SWCNT (Park *et al.*, 2011) ou de MWCNT (Porter *et al.*, 2010). De même, plusieurs études ont rapporté une augmentation de la concentration en facteurs pro-fibrotiques comme le TGF-β1 ou le PDGF dès un jour après l'administration unique de SWCNT chez le rat (Mangum *et al.*, 2006) ou la souris (Shvedova *et al.*, 2008b; Park *et al.*, 2011). Les cellules épithéliales et les macrophages pourraient jouer un rôle important dans la réponse fibrotique induite par les NTC. En effet, Wang *et al.* ont montré *in vitro* que les cellules épithéliales respiratoires sont capables de sécréter du TGF-β1 en réponse aux MWCNT (Wang *et al.*, 2011a). Or, le TGF-β1 peut conduire à la prolifération et à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, ainsi qu'à l'augmentation du dépôt du collagène et de la fibronectine dans la matrice extracellulaire. Les auteurs ont également montré que des macrophages, exposés *in vitro* aux MWCNT, sécrètent d'avantage d'IL-1β, cytokine qui peut également être impliquée dans la fibrogénèse. En effet, l'IL-1β peut conduire, entre autre, à l'activation des fibroblastes, ce qui entraîne alors un déséquilibre de la balance métalloprotéinase/TIMP-1 en faveur de TIMP-1, ainsi qu'une prolifération des fibroblastes (Gasse *et al.*, 2007). Dans une autre étude, il a de plus été montré que les NTC provoquent *in vitro* la prolifération de fibroblastes (Wang *et al.*, 2010a). Le développement d'une fibrose est une des modifications

des voies respiratoires survenant au cours de l'asthme, la réponse fibrotique induite par les NTC pourrait avoir des conséquences importantes dans cette maladie.

Dans notre étude, nous avons également montré que l'exposition répétée aux NTC induit une hyperproduction du mucus chez la souris. Ces résultats rejoignent les observations de Han *et al.* qui ont montré une hypersécrétion de mucus (mise en évidence par une augmentation de la protéine MUC5AC, une des principales mucines du mucus respiratoire, dans les LBA de souris) 1 et 7 jours après l'administration d'une dose unique de 40 µg de MWCNT (Han *et al.*, 2010). De nombreux facteurs pro-inflammatoires ont été associés à une stimulation de la sécrétion de mucus (Evans et Koo, 2009). Ainsi, dans notre étude, l'inflammation des voies aériennes induite par les NTC, avec notamment la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, peut être responsable de l'hyperproduction de mucus observée. En outre, si le mucus joue un rôle essentiel dans les mécanismes de défense primaire concourant au maintien de la santé respiratoire, son hypersécrétion est impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies pulmonaires. Ainsi, la production de mucus induite par les NTC pourrait constituer un moyen de défense contre ces NP, mais elle pourrait aussi constituer un facteur aggravant dans le cas de pathologies respiratoires.

Les différents effets décrits ici ont été mis en évidence dans le poumon de souris exposées à des doses de NTC de 1,5 ; 6,25 ou 25 µg. Ainsi, même si nos travaux reproduisent un certain nombre de données existantes, il faut souligner qu'ils ont été réalisés avec des doses relativement faibles de NTC par rapport à ce qui a été fait généralement dans la littérature. En effet, les premières études de toxicité respiratoire des NTC chez l'animal utilisaient des doses élevées, de l'ordre du mg, qui s'accompagnaient d'un fort pourcentage de mortalité lié notamment à une obstruction des voies aériennes (Lam *et al.*, 2004; Warheit *et al.*, 2004). Dans les études qui ont suivies, les doses utilisées étaient plus faibles, de l'ordre de la dizaine de µg (Elgrabli *et al.*, 2008b). Dans notre étude, nous avons choisi de travailler à des doses encore un peu plus faibles, décrites comme **représentatives de l'exposition humaine en milieu professionnel** (Mercer *et al.*, 2008; Porter *et al.*, 2010).

Nos résultats ont également montré que les effets induits par les NTC sont dose-dépendants. Dans la littérature, il a également été rapporté que la réponse inflammatoire pulmonaire (Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009; Aiso *et al.*, 2010), ainsi que la réponse fibrotique (Porter *et al.*, 2010) induites par les MWCNT, dépendaient de la dose. Néanmoins, dans notre étude, une relation dose-effet a été établie après exposition répétée aux NTC, ce

qui reste une démarche originale. En effet, à l'heure actuelle les données de toxicité des NTC portent essentiellement sur des expositions uniques.

Enfin, un des principaux problèmes lié à l'utilisation d'un agent dispersant est la survenue d'effets secondaires dans le poumon ou encore la modification ou le masquage de la toxicité des NTC. Nos résultats ont montré que le surfactant synthétique élaboré au cours de ce travail n'a pas de propriété pro-inflammatoire et n'induit pas de remodelage des voies aériennes après son administration unique ou répétée par voie respiratoire chez la souris, démontrant ainsi sa biocompatibilité. De plus, la dose dépendance des réponses observées dans nos travaux suggère que le surfactant n'altère pas ou ne masque pas la toxicité des NTC. En accord avec nos données, Wang *et al.* ont montré que l'utilisation d'un surfactant commercial (le Survanta®) n'influence pas la réponse pro-fibrotique induite par les SWCNT dans le poumon de souris (Wang *et al.*, 2010a). Ainsi, les réponses observées au cours de ce travail peuvent au contraire refléter l'efficacité de la dispersion des NTC dans le surfactant (Lam *et al.*, 2004; Warheit *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2010).

Les résultats de ce troisième volet de notre travail ont montré que les NTC sont capables d'induire de façon dose-dépendante une réponse inflammatoire, une réponse fibrotique et une hyperproduction de mucus chez la souris normale.

IV. Impact des NTC dans un modèle murin d'asthme aux acariens

La dernière partie de nos travaux de thèse a eu pour but d'étudier l'impact des NTC sur la réponse allergique dans un modèle murin d'asthme aux acariens. Dans ce travail, nous avons évalué la capacité des NTC à moduler la réponse immunitaire systémique, ainsi que l'inflammation et le remodelage des voies respiratoires induits pas l'allergène. Des études mécanistiques portant notamment sur l'implication des cellules épithéliales dans les effets induits par les NTC ont également été menées.

Nos résultats ont montré que les NTC peuvent exercer un effet adjuvant sur la réponse immunitaire systémique (augmentation des IgG1 totales et spécifiques des allergènes d'acariens dans le sérum). Nous avons également montré que les NTC sont capables d'augmenter l'inflammation des voies aériennes induite par l'allergène, ceci s'exprimant par un afflux cellulaire augmenté dans les LBA (macrophages, éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes) et une production accrue de cytokines marqueurs de l'allergie dans les tissus pulmonaires (IL-13, éotaxine, TARC), mais également d'aggraver le phénomène de

remodelage des voies aériennes. En effet, les NTC sont capables d'induire une augmentation de la réponse fibrotique (augmentation de la concentration en collagène, de TGF-β1, de la MMP-9 et de TIMP-1 dans le poumon), et de l'hyperproduction de mucus induites par l'allergène.

Si nos résultats rejoignent l'ensemble des effets des NTC sur la réponse à l'allergène décrits dans la littérature (Inoue *et al.*, 2009; Nygaard *et al.*, 2009; Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009b; Inoue *et al.*, 2010), notre étude se démarque de ces travaux par plusieurs aspects. **Tout d'abord**, contrairement à toutes ces études qui ont eu recours à des modèles murins à l'ovalbumine, nous avons fait le choix d'utiliser un **modèle d'asthme** aux allergènes d'**acariens.** Ce point est important, car, contrairement à l'ovalbumine, les allergènes d'acariens sont des allergènes communs de l'environnement. D'autre part, les allergènes d'acariens sont capables d'activer l'épithélium qui, en libérant des cytokines innées comme TSLP, l'IL-25 ou l'IL-33, joue un rôle central dans la réponse allergique (Gregory et Lloyd, 2011). De plus, il a récemment été proposé que l'inflammasome NLRP3 puisse constituer une voie par laquelle les allergènes d'acariens induisent une inflammation allergique (Dai *et al.*, 2011). Ainsi, utiliser un modèle d'asthme aux acariens nous a permis non seulement d'étudier les effets des NTC sur deux des caractéristiques physiopathologiques de l'asthme (inflammation et remodelage des voies respiratoires), mais aussi d'envisager des hypothèses mécanistiques responsables de ces effets.

Ensuite, les études de la littérature réalisées dans des modèles d'asthme à l'ovalbumine se sont intéressées, pour trois d'entre elles, à l'effet de SWCNT et de MWCNT sur la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire allergique (Inoue *et al.*, 2009; Nygaard *et al.*, 2009; Inoue *et al.*, 2010) et pour une autre, à l'effet de MWCNT sur la réponse fibrotique (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009b). Une des particularités de notre travail est d'avoir étudié **l'effet des NTC sur ces différentes réponses au sein d'un même modèle.** Ce point est essentiel car nous avons ainsi pu étudier comment toutes ces réponses étaient modulées en fonction des conditions expérimentales (dose de NTC, moment de l'exposition aux NTC, co-administration de l'allergène et des NTC).

Ainsi, nous avons montré que **les effets** des NTC décrits dans ce travail, ainsi que leur persistance, **sont dépendants de la dose** administrée. En effet, la dose totale de 225 µg de NTC a provoqué une augmentation plus importante de l'inflammation et de l'hyperproduction de mucus induites par l'allergène, et cette augmentation a persisté plus longtemps, que dans le cas de la dose de 75 µg de NTC. De plus, seule la dose de 225 µg de NTC s'est révélée capable d'exercer un effet adjuvant sur la réponse immunitaire et de provoquer une

augmentation de la réponse fibrotique induite par l'allergène. Si cette dose totale de 225 µg de NTC peut paraître élevée, elle est néanmoins très proche des doses pour lesquelles un effet des NTC sur la réponse allergique a été rapporté dans la littérature. En effet, Inoue *et al.* ont rapporté un effet adjuvant et une augmentation de l'inflammation induites par l'ovalbumine chez la souris pour une dose totale de 300 µg de MWCNT (Inoue *et al.*, 2009). De même, Ryman-Rasmussen *et al.* ont montré une augmentation de la réponse fibrotique, chez la souris présentant une inflammation allergique pré-existante, après exposition à une dose de MWCNT d'environ 240 µg (dose calculée à partir des paramètres d'inhalation, i.e. 100 mg/m^3 pendant 6 heures) (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009b). Par ailleurs, Nygaard *et al.* ont suggéré un effet dose-dépendant des SWCNT et des MWCNT sur la réponse immunitaire induite par l'ovalbumine (augmentation des IgE et IgG1 spécifiques) (Nygaard *et al.*, 2009). Néanmoins, le protocole expérimental de cette étude incluant une étape de sédimentation des dispersions visant à éliminer les agrégats de NTC, les différentes doses de NTC administrées n'ont pas été quantifiées et ont été simplement qualifiées par les auteurs de dose « faible, moyenne et élevée ». Ainsi et surtout, à notre connaissance, notre étude est la première à montrer que les effets des NTC sur la réponse à l'allergène (dont la réponse immunitaire, mais également l'inflammation et le remodelage des voies aériennes) suivent une relation dose-réponse.

Nos résultats ont également mis en évidence que les **effets des NTC** sur la réponse allergique **dépendent du moment de l'exposition aux NTC**. En effet, si l'administration d'une dose totale de 75 µg de NTC dès la première exposition à l'allergène a provoqué une augmentation de l'inflammation des voies aériennes, l'administration de cette même dose à partir de la dernière exposition à l'allergène n'a induit quant à elle aucune augmentation de cette réponse. Ainsi, nos résultats suggèrent que des doses de NTC peuvent **faciliter le développement de l'inflammation allergique,** et pourraient **ne pas avoir d'effet aggravant sur la progression de cette inflammation** dans le cas d'un terrain allergique préétabli. L'administration d'une dose de 75 µg de NTC à partir de la dernière exposition à l'allergène n'a pas provoqué non plus d'augmentation de la réponse fibrotique induite par l'allergène. Contrairement à nous, Ryman-Rasmussen *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la fibrose après l'exposition aux NTC chez la souris présentant une inflammation allergique (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009b). Néanmoins, alors que dans l'étude de Ryman-Rasmussen *et al.* les animaux étaient exposés à une dose de NTC d'environ 240 µg, dans notre protocole la dose totale de NTC était de 75 µg. Les doses de NTC pourraient donc expliquer la différence de résultats sur la réponse fibrotique entre notre étude et celle de ces auteurs. Par ailleurs, si aucun effet des NTC à la dose de 75 µg n'a été observé sur l'inflammation et la fibrose, cette dose a provoqué une augmentation de

l'hyperproduction de mucus induite par l'allergène. Ainsi, nos résultats sur la production de mucus et les résultats de Ryman-Rasmussen *et al.* sur la réponse fibrotique, laissent penser que les NTC peuvent **avoir un effet aggravant sur la progression du remodelage des voies aériennes** dans le cas d'un terrain allergique préétabli (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009b).

Les effets des NTC décrits dans ce travail, en particulier l'**effet adjuvant**, pourraient être dépendants de la **co-administration** de l'allergène et des NTC, comme cela a été suggéré pour certaines NP (Heo *et al.*, 2001; van Zijverden *et al.*, 2001). En effet, un effet adjuvant n'a été observé que lorsque les NTC ont été administrés dans la même solution que l'extrait allergénique à une répétition de 9 doses, correspondant à une dose totale de 225 µg de NTC. Toutefois, nous ne sommes pas en mesure de dire si l'effet adjuvant alors observé est lié, à la co-administration des NTC et de l'extrait d'acariens, à l'augmentation de la dose totale de NTC, ou encore à ces deux éléments. D'un côté, l'importance de la co-administration de l'allergène et de la particule pour obtenir un effet adjuvant est un point encore discuté dans la littérature. Ainsi, Granum *et al.* ont montré un effet adjuvant des particules Diesel dans un modèle murin d'asthme à l'ovalbumine, bien que l'administration des particules et de l'allergène se faisait de façon séparée (Granum et Lovik, 2002). À l'inverse, des auteurs ont rapporté qu'une administration concomitante de l'allergène (l'ovalbumine) et de la particule (noir de carbone ou particule Diesel) était importante à l'obtention d'un effet adjuvant dans un modèle murin d'asthme à l'ovalbumine (Heo *et al.*, 2001; van Zijverden *et al.*, 2001). L'hypothèse envisagée par ces auteurs est celle d'un « effet de portage » des particules : retenu sur la particule, l'allergène serait libéré plus lentement, augmentant ainsi la possibilité de présentation et de sensibilisation à l'allergène. D'un autre côté, la dose de 225 µg qui s'est avérée efficace dans notre travail est très proche des doses pour lesquelles un effet adjuvant des NTC a été rapporté dans la littérature dans des modèles d'asthme à l'ovalbumine. En effet, Inoue *et al.* et Nygaard *et al.* ont respectivement montré une augmentation des IgG1 et IgE spécifiques de l'ovalbumine dans le sérum de souris, pour des administrations répétées de MWCNT pendant 6 semaines, correspondant à une dose totale de 300 µg, ou pour 3 administrations de 130 µg de SWCNT ou de MWCNT, correspondant à une dose totale de 390 µg (Inoue *et al.*, 2009; Nygaard *et al.*, 2009). En outre, dans notre étude, la dose de NTC de 75 µg n'a pas eu d'effet adjuvant, que les NTC aient été administrés de façon séparée (1er protocole) ou co-administrée (4ème protocole) avec l'allergène. Ainsi, on peut penser que **la dose de NTC est sans doute importante dans la survenue de l'effet adjuvant.**

Comme **les mécanismes responsables** des effets des NP manufacturées sur l'asthme allergique restent incertains, nous avons mené, au cours de notre travail, des études mécanistiques portant sur l'implication du stress oxydant, de l'inflammasome NLRP3 et des cellules épithéliales dans les effets induits par les NTC.

Nos résultats ont montré que l'exposition à une dose totale de 75 ou de 225 µg de NTC dès la première exposition à l'allergène induit une augmentation des ERO dans le poumon, alors que l'exposition aux NTC seuls ou à l'extrait seul n'induit pas ces effets. Ces résultats rejoignent les observations d'Inoue *et al.* qui ont montré, dans un modèle murin d'asthme à l'ovalbumine, d'une part que les SWCNT exacerbent l'inflammation allergique, et d'autre part, que les SWCNT augmentent le niveau de stress oxydant induit par l'allergène (augmentation des produits de peroxydation des lipides, des oxydes d'azote...) (Inoue *et al.*, 2010). Ainsi, en accord avec cette étude, nos résultats suggèrent **un rôle du stress oxydant dans l'effet aggravant des NTC sur la réponse allergique.**

Dans ce travail, nous n'avons pas mis en évidence d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les NTC seuls. En effet, même si nous avons observé que l'exposition aux NTC provoque une augmentation de la production d'ATP dans les LBA des animaux exposés, nos résultats n'ont pas montré d'augmentation de la production de l'IL-1β ou de l'activation de la caspase-1 consécutive à cette exposition. Ces résultats sont en contradiction avec deux études menées *in vitro* sur des macrophages humains qui ont montré que les NTC sont capables d'activer l'inflammasome NLRP3 (Meunier *et al.*, 2011; Palomaki *et al.*, 2011). Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a pour l'instant montré un tel effet *in vivo.* Par contre, nous avons mis en évidence que l'extrait d'allergènes d'acariens est quant à lui capable d'induire une augmentation de la production de l'IL-1β dans les poumons des animaux. Ce résultat rejoint les observations de Dai *et al.* qui ont suggéré que l'inflammasome NLRP3 constitue une voie par laquelle les allergènes d'acariens induisent une inflammation allergique (Dai *et al.*, 2011). Néanmoins, nous n'avons pas observé d'effet amplificateur des NTC sur cette réponse, ce qui laisse penser que **l'activation de l'inflammasome NLRP3 n'est peut-être pas impliquée dans l'effet aggravant des NTC sur la réponse allergique.**

Enfin, nous avons montré que les effets des NTC sur la réponse allergique sont associés à une augmentation de la production des cytokines innées produites par les cellules épithéliales (TSLP, IL-25 et IL-33). Même si les cellules épithéliales sont une cible potentielle des NP inhalées, très peu d'études se sont intéressées pour l'instant, à leur implication dans les effets des NP manufacturées sur l'asthme allergique. Toutefois, en accord avec nos

résultats, Inoue *et al.* ont rapporté, dans un modèle murin d'asthme à l'ovalbumine, que les SWCNT et les MWCNT sont capables d'exacerber l'inflammation allergique pulmonaire et d'augmenter, entre autres, la production d'IL-33 (Inoue *et al.*, 2009; Inoue *et al.*, 2010). De plus, très récemment, Beamer *et al.* ont montré chez la souris, que les MWCNT sont à eux seuls capables d'induire des dommages de l'épithélium aboutissant à la libération d'IL-33, qui à son tour provoquerait le recrutement de lymphocytes et d'éosinophiles, ainsi que le développement d'une réponse inflammatoire dépendante de l'IL-13 (Beamer *et al.*, 2012). Ainsi, nos résultats suggèrent que **l'épithélium pourrait jouer un rôle important dans l'effet aggravant des NTC sur l'asthme allergique.**

L'ensemble de nos résultats ont montré que les NTC sont capables d'exercer un effet adjuvant sur la réponse immunitaire systémique et d'augmenter l'inflammation allergique ainsi que le remodelage des voies aériennes induits par les allergènes d'acariens chez la souris, ceci de manière dose-dépendante. Nos données permettent par ailleurs de suggérer un rôle du stress oxydant et de l'épithélium dans cet effet aggravant des NTC sur l'asthme allergique.

Chapitre 5 – Conclusion générale et Perspectives

L'objectif du projet de thèse a été d'étudier la toxicité respiratoire de NTC multi-parois d'origine industrielle en lien avec leur biodistribution, chez la souris normale, mais également dans un modèle murin d'asthme.

Les travaux réalisés au cours de ce projet ont permis de mettre au point un milieu de dispersion des NTC adapté à l'administration par voie respiratoire, à savoir un surfactant pulmonaire synthétique, qui s'est avéré être plus efficace que les dispersants plus ou moins biocompatibles décrits dans la littérature. Ce dispersant au point, une étude de la distribution des NTC dans les voies respiratoires de la souris a été menée. Cette étude, qui n'a pas pu être conduite à l'aide de NTC marqués du fait d'un problème d'extinction de fluorescence, a été réalisée en utilisant des approches basées sur la détection des NTC non marqués. Nous avons ainsi observé en MO en lumière blanche, que les NTC se distribuent tout le long de l'arbre respiratoire de la souris saine après administration unique ou répétée, et qu'ils se déposent principalement au niveau des alvéoles. De plus, l'examen en MET des tissus pulmonaires de ces animaux a montré que les NTC sont internalisés par différentes cellules résidantes du poumon (macrophages, pneumocytes de type II) ou infiltrées (neutrophiles). Le même travail réalisé chez des souris exposées aux NTC et aux allergènes d'acariens a révélé une distribution *a priori* identique des NTC en conditions inflammatoires. L'évaluation de la toxicité respiratoire des NTC chez la souris normale a montré que ces NP sont capables d'induire une inflammation, une réponse fibrotique et une hyperproduction de mucus après exposition unique ou répétée. Ces effets sont dose-dépendants et ont été mis en évidence pour des doses de nanomatériaux représentatives de l'exposition humaine en milieu professionnel, ce qui suggère que les NTC pourraient représenter un danger pour les personnels travaillant à leur production ou à leur sous-traitance. Enfin, dans un modèle murin d'asthme aux allergènes d'acariens, nous avons montré que les NTC sont capables d'exercer un effet adjuvant sur la réponse immunitaire systémique et d'augmenter l'inflammation allergique et le remodelage des voies aériennes induits par l'allergène. Ces effets dépendent de la dose de NTC administrée et du moment de l'exposition, et ils sont, selon la dose, plus ou moins persistants. Enfin, nos données ont permis de suggérer un rôle de l'épithélium dans l'effet aggravant des NTC sur l'asthme allergique. Ainsi, l'exposition aux NTC pourrait représenter un risque pour les sujets sains, mais également pour les sujets asthmatiques.

Nous souhaitons ici mettre en perspectives de ce travail deux points particuliers de notre projet, au travers desquels nous nous interrogerons sur le **rôle de l'épithélium** dans les effets aggravants des NTC sur la réponse allergique respiratoire.

Le premier point concerne la distribution des NTC dans les voies respiratoires. En effet, nous avons mis en évidence une internalisation des NTC dans les pneumocytes de type II, qui sont des cellules épithéliales alvéolaires, ceci chez la souris normale et chez la souris exposée aux allergènes d'acariens. Néanmoins, nous n'avons pas observé de NTC dans l'épithélium ou dans la sous-muqueuse bronchiques, ceci chez la souris normale ou chez la souris présentant une inflammation des voies aériennes induite par les allergènes d'acariens. Ce point nous interroge car l'asthme est une maladie des bronches. Par ailleurs, une accumulation de particules ultrafines de nature carbonée a été mise en évidence sous l'épithélium bronchique, lors de l'analyse de coupes histologiques de poumon de personnes ayant vécu à Mexico City, ville très fortement polluée en particules, suggérant que les NP pourraient s'accumuler dans la sous-muqueuse bronchique (Churg *et al.*, 2003). Toutefois, l'approche que nous avons utilisée pour étudier en MET la localisation cellulaire et subcellulaire des NTC dans le poumon de nos souris n'a pas permis d'analyser un nombre d'échantillons tissulaires suffisants pour être représentatif de l'organe entier. Ainsi, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que les NTC présentent une distribution plus large que celle que nous avons décrite, et que ces NP puissent s'accumuler dans l'épithélium ou dans la sous-muqueuse bronchiques. Ainsi, en perspectives de nos travaux, nous désirerions étudier plus en profondeur la distribution des NTC dans le poumon de souris exposées aux allergènes d'acariens. Dans ce but, la microscopie confocale IR en champ large des coupes de poumon, telle qu'elle a été réalisée dans notre étude, pourrait être un outil intéressant. En effet, des observations exploratoires en microscopie confocale IR d'échantillons tissulaires de souris exposés à des NTC nous ont permis d'obtenir une cartographie de la distribution des NTC à l'échelle d'une coupe entière de poumon. À l'avenir, la microscopie confocale IR pourrait améliorer l'efficacité de la recherche des NTC dans le poumon, et en particulier au niveau des bronches, en vue d'une analyse approfondie en MET, et ainsi permettre de réaliser une **étude en microscopie corrélative**. En effet, par son pouvoir pénétrant (plusieurs centaines de micromètres de profondeur), la cartographie confocale IR présente un fort potentiel pour l'exploration de tissus et la sélection des régions spécifiques à prélever pour l'analyse ultra-structurale.

Le deuxième point concerne l'augmentation de la production des cytokines épithéliales innées que nous avons mise en évidence en réponse aux NTC, dans le modèle d'asthme aux allergènes d'acariens. Une perspective à ces travaux serait de développer un **modèle *in vitro*** de barrière pulmonaire, afin de mieux comprendre le rôle de l'épithélium dans les effets des NTC sur la réponse allergique. Ce modèle associerait **trois types cellulaires en co-culture**, des cellules épithéliales bronchiques, des macrophages et des cellules dendritiques. Ainsi, bien que le système pulmonaire soit très complexe, ce modèle tridimensionnel présenterait l'avantage de faire appel aux trois effecteurs majeurs de la réponse allergique au niveau bronchique. En effet, l'épithélium bronchique joue un rôle important de barrière contre les allergènes. L'épithélium peut par ailleurs participer au développement et à la pérennisation de l'asthme en produisant de nombreux médiateurs, dont les cytokines innées (TSLP, l'IL-25 ou l'IL-33) impliquées dans l'activation des DC et le renforcement de la réponse Th2. Les macrophages, quant à eux, constituent la première ligne de défense contre les antigènes et les particules inhalés et peuvent initier la réponse inflammatoire. Enfin, les DC, localisées au niveau de l'épithélium ou dans la sous-muqueuse épithéliale, sont impliquées dans la phase de sensibilisation à l'allergène. Ce système complexe associant des cellules épithéliales et des cellules immunitaires, a été proposé par Rothen-Rutishauser *et al.* pour étudier, d'une part, les effets des particules sur ces cellules et, d'autre part, les interactions mises en jeu entre ces trois types cellulaires au cours de l'exposition aux particules (Rothen-Rutishauser *et al.*, 2005). Appliqué à notre problématique, ce modèle tridimensionnel permettrait de mieux comprendre les interactions qui se jouent entre l'allergène, les NTC et ces trois effecteurs de la réponse allergique dans les voies respiratoires.

Bibliographie

Aiso, S., Kubota, H., Umeda, Y., Kasai, T., Takaya, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Sakai, T., Koda, S., et Fukushima, S. (2011). Translocation of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats. *Industrial Health* **49**, 215-220.

Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H., et Fukushima, S. (2010). Pulmonary Toxicity of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes in Male Fischer 344 Rats. *Industrial Health* **48**, 783-795.

Aitken, R. J., Creely, K.S., Tran, C.L. (2004). *Nanoparticles : an occupational hygiene review*. Sudbury, Suffolk, Grande-Bretagne, 100 p.

Al Faraj, A., Bessaad, A., Cieslar, K., Lacroix, G., Canet-Soulas, E., et Cremillieux, Y. (2010). Long-term follow-up of lung biodistribution and effect of instilled SWCNTs using multiscale imaging techniques. *Nanotechnology* **21**.

Al Faraj, A., Cieslar, K., Lacroix, G., Gaillard, S., Canot-Soulas, E., et Cremillieux, Y. (2009). In Vivo Imaging of Carbon Nanotube Biodistribution Using Magnetic Resonance Imaging. *Nano Letters* **9**, 1023-1027.

Al-Muhsen, S., Johnson, J. R., et Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **128**, 451-462.

Ali-Boucetta, H., Al-Jamal, K. T., Muller, K. H., Li, S. P., Porter, A. E., Eddaoudi, A., Prato, M., Bianco, A., et Kostarelos, K. (2011). Cellular Uptake and Cytotoxic Impact of Chemically Functionalized and Polymer-Coated Carbon Nanotubes. *Small* **7**, 3230-3238.

Andrieux, K., Forte, L., Lesieur, S., Paternostre, M., Ollivon, M., et Grabielle-Madelmont, C. (2009). Solubilisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by sodium taurocholate: A model to study the stability of liposomes in the gastrointestinal tract and their mechanism of interaction with a model bile salt. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **71**, 346-355.

Aprile, C., Martin, R., Alvaro, M., Garcia, H., et Scaiano, J. C. (2009). Covalent Functionalization of Short, Single-Wall Carbon Nanotubes: Photophysics of 2,4,6-Triphenylpyrylium Attached to the Nanotube Walls. *Chem Mater* **21**, 884-890.

Aschberger, K., Johnston, H. J., Stone, V., Aitken, R. J., Hankin, S. M., Peters, S. A. K., Tran, C. L., et Christensen, F. M. (2010). Review of carbon nanotubes toxicity and exposure-Appraisal of human health risk assessment based on open literature. *Critical Reviews in Toxicology* **40**, 759-790.

Backes, C., Schmidt, C. D., Hauke, F., Bottcher, C., et Hirsch, A. (2009). High Population of Individualized SWCNTs through the Adsorption of Water-Soluble Perylenes. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 2172-2184.

Barone, P. W., Baik, S., Heller, D. A., et Strano, M. S. (2005). Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes. *Nature Materials* **4**, 86-U16.

Beamer, C. A., Girtsman, T. A., Seaver, B. P., Finsaas, K. J., Migliaccio, C. T., Perry, V. K., Rottman, J. B., Smith, D. E., et Holian, A. (2012). IL-33 mediates multi-walled carbon nanotube (MWCNT)-induced airway hyper-reactivity via the mobilization of innate helper cells in the lung. *Nanotoxicology*.

Belade, E., Armand, L., Martinon, L., Kheuang, L., Fleury-Feith, J., Baeza-Squiban, A., Lanone, S., Billon-Galland, M. A., Pairon, J. C., et Boczkowski, J. (2012). A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicology in Vitro* **26**, 57-66.

Bianco, A., Kostarelos, K., et Prato, M. (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **9**, 674-679.

Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., et Krombach, F. (2008). Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre Toxicol* **5**, 14.

Birrell, M. A., et Eltom, S. (2011). The role of the NLRP3 Inflammasome in the pathogenesis of airway disease. *Pharmacology & Therapeutics* **130**, 364-370.

Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M., et Vignola, A. M. (2000). Asthma - From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **161**, 1720-1745.

Brodlie, M., McKean, M. C., Johnson, G. E., Anderson, A. E., Hilkens, C. M. U., Fisher, A. J., Corris, P. A., Lordan, J. L., et Ward, C. (2011). Raised interleukin-17 is immunolocalised to neutrophils in cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal* **37**, 1378-1385.

Brown, D. M., Kinloch, I. A., Bangert, U., Windle, A. H., Walter, D. M., Walker, G. S., Scotchford, C. A., Donaldson, K., et Stone, V. (2007). An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon* **45**, 1743-1756.

Buford, M. C., Hamilton, R. F., Jr., et Holian, A. (2007). A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* **4**, 6.

Bussy, C., Cambedouzou, J., Lanone, S., Leccia, E., Heresanu, V., Pinault, M., Mayne-l'Hermite, M., Brun, N., Mory, C., Cotte, M., Doucet, J., Boczkowski, J., et Launoist, P. (2008). Carbon nanotubes in macrophages: Imaging and chemical analysis by X-ray fluorescence microscopy. *Nano Letters* **8**, 2659-2663.

Cassel, S. L., Eisenbarth, S. C., Iyer, S. S., Sadler, J. J., Colegio, O. R., Tephly, L. A., Carter, A. B., Rothman, P. B., Flavell, R. A., et Sutterwala, F. S. (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9035-9040.

Cesta, M. F., Ryman-Rasmussen, J. P., Wallace, D. G., Masinde, T., Hurlburt, G., Taylor, A. J., et Bonner, J. C. (2010). Bacterial Lipopolysaccharide Enhances PDGF Signaling and Pulmonary Fibrosis in Rats Exposed to Carbon Nanotubes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **43**, 142-151.

Chen, J. Y., Chen, S. Y., Zhao, X. R., Kuznetsova, L. V., Wong, S. S., et Ojima, I. (2008). Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as Rationally Designed Vehicles for

Tumor-Targeted Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 16778-16785.

Chen, M., et von Mikecz, A. (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO2 nanoparticles. *Exp Cell Res* **305**, 51-62.

Chen, M. T., Gomez, L. M., Ishikawa, F. N., Vernier, P. T., Zhou, C., et Gundersen, M. A. (2009). pH-sensitive intracellular photoluminescence of carbon nanotube-fluorescein conjugates in human ovarian cancer cells. *Nanotechnology* **20**, 295101.

Chen, R. J., Bangsaruntip, S., Drouvalakis, K. A., Kam, N. W. S., Shim, M., Li, Y. M., Kim, W., Utz, P. J., et Dai, H. J. (2003). Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4984-4989.

Cheng, J. P., Fernando, K. A. S., Veca, L. M., Sun, Y. P., Lamond, A. I., Lam, Y. W., et Cheng, S. H. (2008). Reversible Accumulation of PEGylated Single-Walled Carbon Nanotubes in the Mammalian Nucleus. *Acs Nano* **2**, 2085-2094.

Cheng, J. P., Meziani, M. J., Sun, Y. P., et Cheng, S. H. (2011). Poly(ethylene glycol)-conjugated multi-walled carbon nanotubes as an efficient drug carrier for overcoming multidrug resistance. *Toxicology and Applied Pharmacology* **250**, 184-193.

Cherukuri, P., Bachilo, S. M., Litovsky, S. H., et Weisman, R. B. (2004). Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 15638-15639.

Cherukuri, P., Gannon, C. J., Leeuw, T. K., Schmidt, H. K., Smalley, R. E., Curley, S. A., et Weisman, R. B. (2006). Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18882-18886.

Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., et Chan, W. C. W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters* **6**, 662-668.

Chou, C. C., Hsiao, H. Y., Hong, Q. S., Chen, C. H., Peng, Y. W., Chen, H. W., et Yang, P. C. (2008). Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. *Nano Letters* **8**, 437-445.

Churg, A., Brauer, M., del Carmen Avila-Casado, M., Fortoul, T. I., et Wright, J. L. (2003). Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect* **111**, 714-718.

Coccini, T., Roda, E., Sarigiannis, D. A., Mustarelli, P., Quartarone, E., Profumo, A., et Manzo, L. (2010). Effects of water-soluble functionalized multi-walled carbon nanotubes examined by different cytotoxicity methods in human astrocyte D384 and lung A549 cells. *Toxicology* **269**, 41-53.

Corrigan, C. (2008). Mechanisms of asthma. *Medicine* **36**, 177-180.

Crouzier, D., Follot, S., Gentilhomme, E., Flahaut, E., Arnaud, R., Dabouis, V., Castellarin, C., et Debouzy, J. C. (2010). Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology* **272**, 39-45.

Dai, X. J., Sayama, K., Tohyama, M., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Tokumaru, S., Yang, L. J., Hirakawa, S., et Hashimoto, K. (2011). Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**, 806-U486.

Dausend, J., Musyanovych, A., Dass, M., Walther, P., Schrezenmeier, H., Landfester, K., et Mailander, V. (2008). Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells. *Macromolecular Bioscience* **8**, 1135-1143.

Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H. J., et Lyng, F. M. (2007). In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology in Vitro* **21**, 438-448.

de Haar, C., Hassing, I., Bol, M., Bleumink, R., et Pieters, R. (2006). Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clinical and Experimental Allergy* **36**, 1469-1479.

de Haar, C., Kool, M., Hassing, I., Bol, M., Lambrecht, B. N., et Pieters, R. (2008). Lung dendritic cells are stimulated by ultrafine particles and play a key role in particle adjuvant activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, 1246-1254.

de Jonge, J., Schoen, P., ter Veer, W., Stegmann, T., Wilschut, J., et Huckriede, A. (2006). Use of a dialyzable short-chain phospholipid for efficient solubilization and reconstitution of influenza virus envelopes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1758**, 527-536.

De La Zerda, A., Zavaleta, C., Keren, S., Vaithilingam, S., Bodapati, S., Liu, Z., Levi, J., Smith, B. R., Ma, T. J., Oralkan, O., Cheng, Z., Chen, X. Y., Dai, H. J., Khuri-Yakub, B. T., et Gambhir, S. S. (2008). Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice. *Nature Nanotechnology* **3**, 557-562.

Delmas, M. C., Fuhrman, C., et Clinique, G. E. R. (2010). Asthma in France: A review of descriptive epidemiological data. *Revue Des Maladies Respiratoires* **27**, 151-159.

Deng, X., Jia, G., Wang, H., Sun, H., Wang, X., Yang, S., Wang, T., et Liu, Y. (2007). Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon* **45**, 1419-1424.

Di Sotto, A., Chiaretti, M., Carru, G. A., Bellucci, S., et Mazzanti, G. (2009). Multi-walled carbon nanotubes: Lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. *Toxicology Letters* **184**, 192-197.

Dobrovolskaia, M. A., et Mcneil, S. E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology* **2**, 469-478.

Donaldson, K., Murphy, F. A., Duffin, R., et Poland, C. A. (2010). Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol* **7**, 5.

Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A., Tran, L., Aitken, R., et Poland, C. (2008). Re: Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci* **33**, 385; author reply 386-388.

Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., et Borm, P. J. A. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine* **61**, 727-728.

Dong, L. F., Witkowski, C. M., Craig, M. M., Greenwade, M. M., et Joseph, K. L. (2009). Cytotoxicity Effects of Different Surfactant Molecules Conjugated to Carbon Nanotubes on Human Astrocytoma Cells. *Nanoscale Research Letters* **4**, 1517-1523.

Dong, P. X., Wan, B., et Guo, L. H. (2012). In vitro toxicity of acid-functionalized single-walled carbon nanotubes: Effects on murine macrophages and gene expression profiling. *Nanotoxicology* **6**, 288-303.

Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., et Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674-677.

Dozor, A. J. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Oxidative/Nitrosative Stress and Disease* **1203**, 133-137.

Eder, W., Ege, M. J., et von Mutius, E. (2006). Current concepts: The asthma epidemic. *New England Journal of Medicine* **355**, 2226-2235.

Elgrabli, D., Abella-Gallart, S., Aguerre-Chariol, O., Robidel, F., Rogerieux, F., Boczkowski, J., et Lacroix, G. (2007). Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for in vivo and in vitro studies. *Nanotoxicology* **1**, 266-278.

Elgrabli, D., Abella-Gallart, S., Robidel, F., Rogerieux, F., Boczkowski, J., et Lacroix, G. (2008a). Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes. *Toxicology* **253**, 131-136.

Elgrabli, D., Floriani, M., Abella-Gallart, S., Meunier, L., Gamez, C., Delalain, P., Rogerieux, F., Boczkowski, J., et Lacroix, G. (2008b). Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. *Particle and Fibre Toxicology* **5**.

Ellinger-Ziegelbauer, H., et Pauluhn, J. (2009). Pulmonary toxicity of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes (R)) relative to alpha-quartz following a single 6 h inhalation exposure of rats and a 3 months post-exposure period. *Toxicology* **266**, 16-29.

Endo, M., Strano, M. S., et Ajayan, P. M. (2008). Potential applications of carbon nanotubes. *Carbon Nanotubes* **111**, 13-61.

Erdely, A., Hulderman, T., Salmen, R., Liston, A., Zeidler-Erdely, P. C., Schwegler-Berry, D., Castranova, V., Koyama, S., Kim, Y. A., Endo, M., et Simeonova, P. P. (2009). Cross-Talk between Lung and Systemic Circulation during Carbon Nanotube Respiratory Exposure. Potential Biomarkers. *Nano Letters* **9**, 36-43.

Evans, C. M., et Koo, J. S. (2009). Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacol Ther* **121**, 332-348.

Fan, S. S., Chapline, M. G., Franklin, N. R., Tombler, T. W., Cassell, A. M., et Dai, H. J. (1999). Self-oriented regular arrays of carbon nanotubes and their field emission properties. *Science* **283**, 512-514.

Fenoglio, I., Aldieri, E., Gazzano, E., Cesano, F., Colonna, M., Scarano, D., Mazzucco, G., Attanasio, A., Yakoub, Y., Lison, D., et Fubini, B. (2012). Thickness of Multiwalled Carbon Nanotubes Affects Their Lung Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* **25**, 74-82.

Fiorito, S. (2008). *Carbon Nanotubes : Angels Or Demons?*

Galli, S. J., Tsai, M., et Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445-454.

Gasse, P., Mary, C., Guenon, I., Noulin, N., Charron, S., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Akira, S., Quesniaux, V. F., Lagente, V., Ryffel, B., et Couillin, I. (2007). IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* **117**, 3786-3799.

Ge, C., Meng, L., Xu, L., Bai, R., Du, J., Zhang, L., Li, Y., Chang, Y., Zhao, Y., et Chen, C. (2011). Acute pulmonary and moderate cardiovascular responses of spontaneously hypertensive rats after exposure to single-wall carbon nanotubes. *Nanotoxicology*.

Georgin, D., Czarny, B., Botquin, M., Mayne-L'Hermite, M., Pinault, M., Bouchet-Fabre, B., Carriere, M., Poncy, J. L., Chau, Q., Maximilien, R., Dive, V., et Taran, F. (2009). Preparation of C-14-Labeled Multiwalled Carbon Nanotubes for Biodistribution Investigations. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 14658-+.

Gilmour, M., Jaakkola, M. S., London, S. J., Nel, A. E., et Rogers, C. A. (2006). How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma. *Environmental Health Perspectives* **114**, 627-633.

Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1408**, 79-89.

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

Granum, B., et Lovik, M. (2002). The effect of particles on allergic immune responses. *Toxicol Sci* **65**, 7-17.

Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., et DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 11613-11618.

Gregory, L. G., et Lloyd, C. M. (2011). Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol* **32**, 402-411.

Guo, J., Zhang, X., Li, Q., et Li, W. (2007). Biodistribution of functionalized multiwall carbon nanotubes in mice. *Nucl Med Biol* **34**, 579-583.

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

Hameed Hyder, M. A. (2003). Nanotechnology and environment: potential applications and environmental implications of nanotechnology. Master's Thesis, Techniche Universitat Hamburg-Harburg, Allemagne.

Hamilton, R. F., Wu, N., Porter, D., Buford, M., Wolfarth, M., et Holian, A. (2009). Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part Fibre Toxicol* **6**, 35.

Hammad, H., et Lambrecht, B. N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature Reviews Immunology* **8**, 193-204.

Han, J. H., Lee, E. J., Lee, J. H., So, K. P., Lee, Y. H., Bae, G. N., Lee, S. B., Ji, J. H., Cho, M. H., et Yu, I. J. (2008a). Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhalation Toxicology* **20**, 741-749.

Han, S. G., Andrews, R., et Gairola, C. G. (2010). Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes. *Inhalation Toxicology* **22**, 340-347.

Han, S. G., Andrews, R., Gairola, C. G., et Bhalla, D. K. (2008b). Acute pulmonary effects of combined exposure to carbon nanotubes and ozone in mice. *Inhalation Toxicology* **20**, 391-398.

Hao, M. Q., Comier, S., Wang, M. Y., Lee, J. J., et Nel, A. (2003). Diesel exhaust particles exert acute effects on airway inflammation and function in murine allergen provocation models. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **112**, 905-914.

He, X. Q., Young, S. H., Schwegler-Berry, D., Chisholm, W. P., Fernback, J. E., et Ma, Q. (2011). Multiwalled Carbon Nanotubes Induce a Fibrogenic Response by Stimulating Reactive Oxygen Species Production, Activating NF-kappa B Signaling, and Promoting Fibroblast-to-Myofibroblast Transformation. *Chemical Research in Toxicology* **24**, 2237-2248.

Heister, E., Neves, V., Tilmaciu, C., Lipert, K., Beltran, V. S., Coley, H. M., Silva, S. R. P., et McFadden, J. (2009). Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy. *Carbon* **47**, 2152-2160.

Heo, Y., Saxon, A., et Hankinson, O. (2001). Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology* **159**, 143-158.

Herzog, E., Byrne, H. J., Davoren, M., Casey, A., Duschl, A., et Oostingh, G. J. (2009). Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. *Toxicology and Applied Pharmacology* **236**, 276-281.

Hirano, S., Fujitani, Y., Furuyama, A., et Kanno, S. (2010). Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **249**, 8-15.

Holgate, S. T. (2008). Pathogenesis of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* **38**, 872-897.

Holgate, S. T., Davies, D. E., Powell, R. M., Howarth, P. H., Haitchi, H. M., et Holloway, J. (2007). Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *European Respiratory Journal* **29**, 793-803.

Hong, S. Y., Tobias, G., Al-Jamal, K. T., Ballesteros, B., Ali-Boucetta, H., Lozano-Perez, S., Nellist, P. D., Sim, R. B., Finucane, C., Mather, S. J., Green, M. L. H., Kostarelos, K., et Davis, B. G. (2010). Filled and glycosylated carbon nanotubes for in vivo radioemitter localization and imaging. *Nature Materials* **9**, 485-490.

Huang, S., Chueh, P. J., Lin, Y. W., Shih, T. S., et Chuang, S. M. (2009). Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO2 long-term exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* **241**, 182-194.

Huchon, G. (2001). *Pneumologie pour le praticien*. Masson, Paris, France, 383 p.

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

Hussain, S., Thomassen, L. C. J., Ferecatu, I., Borot, M. C., Andreau, K., Martens, J. A., Fleury, J., Baeza-Squiban, A., Marano, F., et Boland, S. (2010). Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology* **7**.

Hussain, S., Vanoirbeek, J. A., et Hoet, P. H. (2012). Interactions of nanomaterials with the immune system. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **4**, 169-183.

Hussain, S., Vanoirbeek, J. A. J., Luyts, K., De Vooght, V., Verbeken, E., Thomassen, L. C. J., Martens, J. A., Dinsdale, D., Boland, S., Marano, F., Nemery, B., et Hoet, P. H. M. (2011). Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *European Respiratory Journal* **37**, 299-309.

Iijima, S. (1991). Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **354**, 56-58.

Inoue, K., Koike, E., Yanagisaw, R., Hirano, S., Nishikawa, M., et Takano, H. (2009). Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model. *Toxicology and Applied Pharmacology* **237**, 306-316.

Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Sakurai, M., Ichinose, T., Sadakane, K., et Yoshikawa, T. (2005). Effects of nano particles on antigen-related airway inflammation in mice. *Respiratory Research* **6**.

Inoue, K., Yanagisawa, R., Koike, E., Nishikawa, M., et Takano, H. (2010). Repeated pulmonary exposure to single-walled carbon nanotubes exacerbates allergic inflammation of the airway: Possible role of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 924-934.

INRS (2007). Production et utilisation industrielles des particules nanostructurées. *Hygiène et sécurité au travail - Cahier de notes documentaires*.

INRS (2008). Les nanotubes de carbone : quels risques, quelle prévention? *Hygiène et sécurité au travail - Cahier de notes documentaires*.

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

Jacobsen, N. R., Pojana, G., White, P., Moller, P., Cohn, C. A., Korsholm, K. S., Vogel, U., Marcomini, A., Loft, S., et Wallin, H. (2008). Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C-60 fullerenes in the FE1-Muta (TM) mouse lung epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **49**, 476-487.

Jia, F. M., Wu, L., Meng, J., Yang, M., Kong, H., Liu, T. J., et Xu, H. Y. (2009). Preparation, characterization and fluorescent imaging of multi-walled carbon nanotube-porphyrin conjugate. *Journal of Materials Chemistry* **19**, 8950-8957.

Jia, G., Wang, H. F., Yan, L., Wang, X., Pei, R. J., Yan, T., Zhao, Y. L., et Guo, X. B. (2005). Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environmental Science & Technology* **39**, 1378-1383.

Jin, H., Heller, D. A., et Strano, M. S. (2008). Single-particle tracking of endocytosis and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in NIH-3T3 cells. *Nano Letters* **8**, 1577-1585.

Johnson, D. R., Methner, M. M., Kennedy, A. J., et Steevens, J. A. (2010). Potential for Occupational Exposure to Engineered Carbon-Based Nanomaterials in Environmental Laboratory Studies. *Environmental Health Perspectives* **118**, 49-54.

Journet, C., et Bernier, P. (1998). Production of carbon nanotubes. *Applied Physics a-Materials Science & Processing* **67**, 1-9.

Kagan, V. E., Konduru, N. V., Feng, W., Allen, B. L., Conroy, J., Volkov, Y., Vlasova, II, Belikova, N. A., Yanamala, N., Kapralov, A., Tyurina, Y. Y., Shi, J., Kisin, E. R., Murray, A. R., Franks, J., Stolz, D., Gou, P., Klein-Seetharaman, J., Fadeel, B., Star, A., et Shvedova, A. A. (2010). Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nanotechnol* **5**, 354-359.

Kagan, V. E., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Konduru, N. V., Potapovich, A. I., Osipov, A. N., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Mercer, R., Castranova, V., et Shvedova, A. A. (2006). Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicology Letters* **165**, 88-100.

Kam, N. W. S., O'Connell, M., Wisdom, J. A., et Dai, H. J. (2005). 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**, 11600-11605.

Kang, B., Yu, D. C., Dai, Y. D., Chang, S. Q., Chen, D., et Ding, Y. T. (2009). Biodistribution and accumulation of intravenously administered carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy and fluorescent labeling. *Carbon* **47**, 1189-1192.

Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., et Moller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology* **21**, 1726-1732.

Kateb, B., Van Handel, M., Zhang, L. Y., Bronikowski, M. J., Manohara, H., et Badie, B. (2007). Internalization of MWCNTs by microglia: Possible application in immunotherapy of brain tumors. *Neuroimage* **37**, S9-S17.

Kelly, F. J., et Fussell, J. C. (2011). Air pollution and airway disease. *Clinical and Experimental Allergy* **41**, 1059-1071.

Kim, J. E., Lim, H. T., Minai-Tehrani, A., Kwon, J. T., Shin, J. Y., Woo, C. G., Choi, M., Baek, J., Jeong, D. H., Ha, Y. C., Chae, C. H., Song, K. S., Ahn, K. H., Lee, J. H., Sung, H. J., Yu, I. J., Beck, G. R., et Cho, M. H. (2010). Toxicity and Clearance of Intratracheally Administered Multiwalled Carbon Nanotubes from Murine Lung.

Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues **73**, 1530-1543.

Kim, J. S., Yoon, T. J., Yu, K. N., Noh, M. S., Woo, M., Kim, B. G., Lee, K. H., Sohn, B. H., Park, S. B., Lee, J. K., et Cho, M. H. (2006). Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *Journal of Veterinary Science* **7**, 321-326.

Kisin, E. R., Murray, A. R., Keane, M. J., Shi, X. C., Schwegler-Berry, D., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Wallace, W. E., Kagan, V. E., et Shvedova, A. A. (2007). Single-walled carbon nanotubes: Geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* **70**, 2071-2079.

Kobayashi, N., Naya, M., Ema, M., Endoh, S., Maru, J., Mizuno, K., et Nakanishi, J. (2010). Biological response and morphological assessment of individually dispersed multi-wall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats. *Toxicology* **276**, 143-153.

Koike, E., Takano, H., Inoue, K., Yanagisawa, R., et Kobayashi, T. (2008). Carbon black nanoparticles promote the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Chemosphere* **73**, 371-376.

Lacerda, L., Bianco, A., Prato, M., et Kostarelos, K. (2006). Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 1460-1470.

Lam, C. W., James, J. T., McCluskey, R., et Hunter, R. L. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences* **77**, 126-134.

Leeuw, T. K., Reith, R. M., Simonette, R. A., Harden, M. E., Cherukuri, P., Tsyboulski, D. A., Beckingham, K. M., et Weisman, R. B. (2007). Single-walled carbon nanotubes in the intact organism: Near-IR imaging and biocompatibility studies in Drosophila. *Nano Letters* **7**, 2650-2654.

Legramante, J. M., Valentini, F., Magrini, A., Palleschi, G., Sacco, S., Iavicoli, I., Pallante, M., Moscone, D., Galante, A., Bergamaschi, E., Bergamaschi, A., et Pietroiusti, A. (2009). Cardiac autonomic regulation after lung exposure to carbon nanotubes. *Human & Experimental Toxicology* **28**, 369-375.

Lei, J. P., et Ju, H. X. (2010). Nanotubes in biosensing. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2**, 496-509.

Lewkowich, I. P., Herman, N. S., Schleifer, K. W., Dance, M. P., Chen, B. L., Dienger, K. M., Sproles, A. A., Shah, J. S., Kohl, J., Belkaid, Y., et Wills-Karp, M. (2005). CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* **202**, 1549-1561.

Li, N., Xia, T., et Nel, A. E. (2008). The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med* **44**, 1689-1699.

Li, Y. S., Li, Y. F., Li, Q. N., Li, J. G., Li, J., Huang, Q., et Li, W. X. (2010). The Acute Pulmonary Toxicity in Mice Induced by Multiwall Carbon Nanotubes, Benzene, and Their Combination. *Environmental Toxicology* **25**, 409-417.

Li, Z., Hulderman, T., Salmen, R., Chapman, R., Leonard, S. S., Young, S. H., Shvedova, A., Luster, M. I., et Simeonova, P. P. (2007). Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environmental Health Perspectives* **115**, 377-382.

Lindberg, H. K., Falck, G. C. M., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalan, J., Savolainen, K., et Norppa, H. (2009). Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters* **186**, 166-173.

Liu, A. H., Sun, K. N., Yang, J. F., et Zhao, D. M. (2008a). Toxicological effects of multi-wall carbon nanotubes in rats. *Journal of Nanoparticle Research* **10**, 1303-1307.

Liu, Z., Cai, W. B., He, L. N., Nakayama, N., Chen, K., Sun, X. M., Chen, X. Y., et Dai, H. J. (2007). In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nature Nanotechnology* **2**, 47-52.

Liu, Z., Chen, K., Davis, C., Sherlock, S., Cao, Q. Z., Chen, X. Y., et Dai, H. J. (2008b). Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Research* **68**, 6652-6660.

Liu, Z., Davis, C., Cai, W. B., He, L., Chen, X. Y., et Dai, H. J. (2008c). Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 1410-1415.

Liu, Z., Tabakman, S., Welsher, K., et Dai, H. (2009). Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery. *Nano Res* **2**, 85-120.

Ma-Hock, L., Treumann, S., Strauss, V., Brill, S., Luizi, F., Mertler, M., Wiench, K., Gamer, A. O., van Ravenzwaay, B., et Landsiedel, R. (2009). Inhalation Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes in Rats Exposed for 3 Months. *Toxicological Sciences* **112**, 468-481.

Mailander, V., et Landfester, K. (2009). Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules* **10**, 2379-2400.

Mangum, J. B., Turpin, E. A., Antao-Menezes, A., Cesta, M. F., Bermudez, E., et Bonner, J. C. (2006). Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages in situ. *Part Fibre Toxicol* **3**, 15.

Marano, F., Hussain, S., Rodrigues-Lima, F., Baeza-Squiban, A., et Boland, S. (2011). Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Archives of Toxicology* **85**, 733-741.

Matsumoto, A., Hiramatsu, K., Li, Y. J., Azuma, A., Kudoh, S., Takizawa, H., et Sugawara, I. (2006). Repeated exposure to low-dose diesel exhaust after allergen challenge exaggerates asthmatic responses in mice. *Clinical Immunology* **121**, 227-235.

Maynard, A. D., Baron, P. A., Foley, M., Shvedova, A. A., Kisin, E. R., et Castranova, V. (2004). Exposure to carbon nanotube material: Aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* **67**, 87-107.

Mazzuckelli, L. F., Methner, M. M., Birch, M. E., Evans, D. E., Ku, B. K., Crouch, K., et Hoover, M. D. (2007). Identification and characterization of potential sources of worker exposure to carbon nanofibers during polymer composite laboratory operations. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* **4**, D125-D130.

McCreanor, J., Cullinan, P., Nieuwenhuijsen, M. J., Stewart-Evans, J., Malliarou, E., Jarup, L., Harrington, R., Svartengren, M., Han, I., Ohman-Strickland, P., Chung, K. F., et Zhang, J. F. (2007). Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *New England Journal of Medicine* **357**, 2348-2358.

McDevitt, M. R., Chattopadhyay, D., Jaggi, J. S., Finn, R. D., Zanzonico, P. B., Villa, C., Rey, D., Mendenhall, J., Batt, C. A., Njardarson, J. T., et Scheinberg, D. A. (2007a). PET Imaging of Soluble Yttrium-86-Labeled Carbon Nanotubes in Mice. *Plos One* **2**.

McDevitt, M. R., Chattopadhyay, D., Kappel, B. J., Jaggi, J. S., Schiffman, S. R., Antczak, C., Njardarson, J. T., Brentjens, R., et Scheinberg, D. A. (2007b). Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes. *J Nucl Med* **48**, 1180-1189.

Mercer, R. R., Hubbs, A. F., Scabilloni, J. F., Wang, L. Y., Battelli, L. A., Friend, S., Castranova, V., et Porter, D. W. (2011). Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. *Particle and Fibre Toxicology* **8**.

Mercer, R. R., Hubbs, A. F., Scabilloni, J. F., Wang, L. Y., Battelli, L. A., Schwegler-Berry, D., Castranova, V., et Porter, D. W. (2010). Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes. *Particle and Fibre Toxicology* **7**.

Mercer, R. R., Scabilloni, J., Wang, L., Kisin, E., Murray, A. R., Schwegler-Berry, D., Shvedova, A. A., et Castranova, V. (2008). Alteration of deposition pattern and pulmonary response as a result of improved dispersion of aspirated single-walled carbon nanotubes in a mouse model. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **294**, L87-L97.

Meunier, E., Coste, A., Olagnier, D., Lefevre, L., Authier, H., Dardenne, C., Beraud, M., Flahaut, E., et Pipy, B. (2011). Double Walled Carbon Nanotubes Induce Il-1b Secretion in Human Monocytes through the Nlrp3 Inflammasome Activation. *Inflammation Research* **60**, 176-177.

Mitchell, L. A., Gao, J., Wal, R. V., Gigliotti, A., Burchiel, S. W., et McDonald, J. D. (2007). Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicological Sciences* **100**, 203-214.

Morgenstern, V., Zutavern, A., Cyrys, J., Brockow, I., Koletzko, S., Kramer, U., Behrendt, H., Herbarth, O., von Berg, A., Bauer, C. P., Wichmann, H. E., et Heinrich, J. (2008). Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 1331-1337.

Morimoto, Y., Hirohashi, M., Ogami, A., Oyabu, T., Myojo, T., Hashiba, M., Mizuguchi, Y., Kambara, T., Lee, B. W., Kuroda, E., et Tanaka, I. (2011). Pulmonary Toxicity Following an Intratracheal Instillation of Nickel Oxide Nanoparticle Agglomerates. *Journal of Occupational Health* **53**, 293-295.

Mueller, N. C., et Nowack, B. (2008). Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology* **42**, 4447-4453.

Muhlfeld, C., Gehr, P., et Rothen-Rutishauser, B. (2008). Translocation and cellular entering mechanisms of nanoparticles in the respiratory tract. *Swiss Med Wkly* **138**, 387-391.

Muller, J., Decordier, I., Hoet, P. H., Lombaert, N., Thomassen, L., Huaux, F., Lison, D., et Kirsch-Volders, M. (2008a). Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* **29**, 427-433.

Muller, J., Delos, M., Panin, N., Rabolli, V., Huaux, F., et Lison, D. (2009). Absence of Carcinogenic Response to Multiwall Carbon Nanotubes in a 2-Year Bioassay in the Peritoneal Cavity of the Rat. *Toxicological Sciences* **110**, 442-448.

Muller, J., Huaux, F., Fonseca, A., Nagy, J. B., Moreau, N., Delos, M., Raymundo-Pinero, E., Beguin, F., Kirsch-Volders, M., Fenoglio, I., Fubini, B., et Lison, D. (2008b). Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: toxicological aspects. *Chemical Research in Toxicology* **21**, 1698-1705.

Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J. F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J. B., et Lison, D. (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**, 221-231.

Murdoch, J. R., et Lloyd, C. M. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **690**, 24-39.

Murphy, F. A., Poland, C. A., Duffin, R., Al-Jamal, K. T., Ali-Boucetta, H., Nunes, A., Byrne, F., Prina-Mello, A., Volkov, Y., Li, S. P., Mather, S. J., Bianco, A., Prato, M., MacNee, W., Wallace, W. A., Kostarelos, K., et Donaldson, K. (2011). Length-Dependent Retention of Carbon Nanotubes in the Pleural Space of Mice Initiates Sustained Inflammation and Progressive Fibrosis on the Parietal Pleura. *American Journal of Pathology* **178**, 2587-2600.

Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S., Green, A. A., Urich, D., Soberanes, S., Chiarella, S. E., Alheid, G. F., McCrimmon, D. R., Szleifer, I., et Hersam, M. C. (2010). Biocompatible Nanoscale Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes Minimizes in vivo Pulmonary Toxicity. *Nano Letters* **10**, 1664-1670.

Nakayama-Ratchford, N., Bangsaruntip, S., Sun, X. M., Welsher, K., et Dai, H. J. (2007). Noncovalent functionalization of carbon nanotubes by fluorescein-polyethylene glycol: Supramolecular conjugates with pH-dependent absorbance and fluorescence. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 2448-+.

Narita, N., Kobayashi, Y., Nakamura, H., Maeda, K., Ishihara, A., Mizoguchi, T., Usui, Y., Aoki, K., Simizu, M., Kato, H., Ozawa, H., Udagawa, N., Endo, M., Takahashi, N., et Saito, N. (2009). Multiwalled Carbon Nanotubes Specifically Inhibit Osteoclast Differentiation and Function. *Nano Letters* **9**, 1406-1413.

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

NIOSH (2010). Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers.

Nygaard, U. C., Hansen, J. S., Samuelsen, M., Alberg, T., Marioara, C. D., et Lovik, M. (2009). Single-Walled and Multi-Walled Carbon Nanotubes Promote Allergic Immune Responses in Mice. *Toxicological Sciences* **109**, 113-123.

Oberdorster, G. (2002). Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhal Toxicol* **14**, 29-56.

Oberdorster, G., Ferin, J., Finkelstein, G., Wade, P., et Corson, N. (1990). Increased Pulmonary Toxicity of Ultrafine Particles .2. Lung Lavage Studies. *Journal of Aerosol Science* **21**, 384-387.

Oberdorster, G., Ferin, J., Gelein, R., Soderholm, S. C., et Finkelstein, J. (1992). Role of the Alveolar Macrophage in Lung Injury - Studies with Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* **97**, 193-199.

Oberdorster, G., Finkelstein, J. N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., et Elder, A. C. (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*, 5-74; disc 75-86.

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

Oberdorster, G., Oberdorster, E., et Oberdorster, J. (2005b). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* **113**, 823-839.

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

Ollivon, M., Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C., et Paternostre, M. (2000). Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1508**, 34-50.

Pacurari, M., Yin, X. J., Zhao, J. S., Ding, M., Leonard, S. S., Schwegier-Berry, D., Ducatman, B. S., Sbarra, D., Hoover, M. D., Castranova, V., et Vallyathan, V. (2008). Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappa B, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environmental Health Perspectives* **116**, 1211-1217.

Palomaki, J., Karisola, P., Pylkkanen, L., Savolainen, K., et Alenius, H. (2010). Engineered nanornaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology* **267**, 125-131.

Palomaki, J., Valimaki, E., Sund, J., Vippola, M., Clausen, P. A., Jensen, K. A., Savolainen, K., Matikainen, S., et Alenius, H. (2011). Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar Mechanism. *Acs Nano* **5**, 6861-6870.

Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., et Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Small* **5**, 2067-2076.

Pantarotto, D., Partidos, C. D., Hoebeke, J., Brown, F., Kramer, E., Briand, J. P., Muller, S., Prato, M., et Bianco, A. (2003). Immunization with peptide-functionalized carbon

nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry & Biology* **10**, 961-966.

Park, E. J., Roh, J., Kim, S. N., Kang, M. S., Han, Y. A., Kim, Y., Hong, J. T., et Choi, K. (2011). A single intratracheal instillation of single-walled carbon nanotubes induced early lung fibrosis and subchronic tissue damage in mice. *Archives of Toxicology* **85**, 1121-1131.

Park, E. J., Yi, J., Chung, Y. H., Ryu, D. Y., Choi, J., et Park, K. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters* **180**, 222-229.

Pautrat, J. L. (2003). *Demain le nanomonde : Voyage au coeur du minuscule*. Fayard, Paris, France, 250 p.

Peters, K., Unger, R. E., Kirkpatrick, C. J., Gatti, A. M., et Monari, E. (2004). Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J Mater Sci Mater Med* **15**, 321-325.

Platts-Mills, T. A. E., et Woodfolk, J. A. (2011). Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunol Rev* **242**, 51-68.

Podesta, J. E., Al-Jamal, K. T., Herrero, M. A., Tian, B. W., Ali-Boucetta, H., Hegde, V., Bianco, A., Prato, M., et Kostarelos, K. (2009). Antitumor Activity and Prolonged Survival by Carbon-Nanotube-Mediated Therapeutic siRNA Silencing in a Human Lung Xenograft Model. *Small* **5**, 1176-1185.

Poland, C. A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W. A. H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., et Donaldson, K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology* **3**, 423-428.

Porter, A. E., Muller, K., Skepper, J., Midgley, P., et Welland, M. (2006). Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomater* **2**, 409-419.

Porter, D. W., Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Wu, N. Q., Wolfarth, M. G., Sriram, K., Leonard, S., Battelli, L., Schwegler-Berry, D., Friend, S., Andrew, M., Chen, B. T., Tsuruoka, S., Endo, M., et Castranova, V. (2010). Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology* **269**, 136-147.

Prakash, R., Washburn, S., Superfine, R., Cheney, R. E., et Falvo, M. R. (2003). Visualization of individual carbon nanotubes with fluorescence microscopy using conventional fluorophores. *Applied Physics Letters* **83**, 1219-1221.

Pulskamp, K., Diabate, S., et Krug, H. F. (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters* **168**, 58-74.

Ratner, M., Ratner, D. (2003). *Nanotechnologies : La révolution de demain*. Campus Press, Paris, France, 191 p.

Ravichandran, P., Baluchamy, S., Gopikrishnan, R., Biradar, S., Ramesh, V., Goornavar, V., Thomas, R., Wilson, B. L., Jeffers, R., Hall, J. C., et Ramesh, G. T. (2011).

Pulmonary Biocompatibility Assessment of Inhaled Single-wall and Multiwall Carbon Nanotubes in BALB/c Mice. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 29725-29733.

Ravichandran, P., Baluchamy, S., Sadanandan, B., Gopikrishnan, R., Biradar, S., Ramesh, V., Hall, J. C., et Ramesh, G. T. (2010). Multiwalled carbon nanotubes activate NF-kappa B and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells. *Apoptosis* **15**, 1507-1516.

Reisetter, A., Stebounova, L., Grassian, V., et Monick, M. M. (2011). Induction of Inflammasome-dependent Pyroptosis by Carbon Black Nanoparticles. *Journal of Biological Chemistry* **286**, Le18-Le18.

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., et Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* **377**, 159-169.

Roda, E., Coccini, T., Acerbi, D., Barni, S., Vaccarone, R., et Manzo, L. (2011). Comparative pulmonary toxicity assessment of pristine and functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes intratracheally instilled in rats: morphohistochemical evaluations. *Histology and Histopathology* **26**, 357-367.

Roller, J., Laschke, M. W., Tschernig, T., Schramm, R., Veith, N. T., Thorlacius, H., et Menger, M. D. (2011). How to detect a dwarf: in vivo imaging of nanoparticles in the lung. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **7**, 753-762.

Rothen-Rutishauser, B., Muhlfeld, C., Blank, F., Musso, C., et Gehr, P. (2007). Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Part Fibre Toxicol* **4**, 9.

Rothen-Rutishauser, B. M., Kiama, S. G., et Gehr, P. (2005). A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**, 281-289.

Rothen-Rutishauser, B. M., Schurch, S., Haenni, B., Kapp, N., et Gehr, P. (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environmental Science & Technology* **40**, 4353-4359.

Ruggiero, A., Villa, C. H., Bander, E., Rey, D. A., Bergkvist, M., Batt, C. A., Manova-Todorova, K., Deen, W. M., Scheinberg, D. A., et McDevitt, M. R. (2010). Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 12369-12374.

Ryman-Rasmussen, J. P., Cesta, M. F., Brody, A. R., Shipley-Phillips, J. K., Everitt, J. I., Tewksbury, E. W., Moss, O. R., Wong, B. A., Dodd, D. E., Andersen, M. E., et Bonner, J. C. (2009a). Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nature Nanotechnology* **4**, 747-751.

Ryman-Rasmussen, J. P., Tewksbury, E. W., Moss, O. R., Cesta, M. F., Wong, B. A., et Bonner, J. C. (2009b). Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes Potentiate Airway Fibrosis in Murine Allergic Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **40**, 349-358.

Sager, T. M., Porter, D. W., Robinson, V. A., Lindsley, W. G., Schwegler-Berry, D. E., et Castranova, V. (2007). Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology* **1**, 118-129.

Sakamoto, Y., Nakae, D., Fukumori, N., Tayama, K., Maekawa, A., Imai, K., Hirose, A., Nishimura, T., Ohashi, N., et Ogata, A. (2009). Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *Journal of Toxicological Sciences* **34**, 65-76.

Sargent, L. M., Shvedova, A. A., Hubbs, A. F., Salisbury, J. L., Benkovic, S. A., Kashon, M. L., Lowry, D. T., Murray, A. R., Kisin, E. R., Friend, S., McKinstry, K. T., Battelli, L., et Reynolds, S. H. (2009). Induction of Aneuploidy by Single-Walled Carbon Nanotubes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **50**, 708-717.

Sato, Y., Yokoyama, A., Shibata, K., Akimoto, Y., Ogino, S., Nodasaka, Y., Kohgo, T., Tamura, K., Akasaka, T., Uo, M., Motomiya, K., Jeyadevan, B., Ishiguro, M., Hatakeyama, R., Watari, F., et Tohji, K. (2005). Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-I in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Molecular Biosystems* **1**, 176-182.

Saxena, R. K., Williams, W., McGee, J. K., Daniels, M. J., Boykin, E., et Gilmour, M. I. (2007). Enhanced in vitro and in vivo toxicity of poly-dispersed acid-functionalized single-wall carbon nanotubes. *Nanotoxicology* **1**, 291-300.

Sayes, C. M., Liang, F., Hudson, J. L., Mendez, J., Guo, W. H., Beach, J. M., Moore, V. C., Doyle, C. D., West, J. L., Billups, W. E., Ausman, K. D., et Colvin, V. L. (2006). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology Letters* **161**, 135-142.

Sharma, C. S., Sarkar, S., Periyakaruppan, A., Barr, J., Wise, K., Thomas, R., Wilson, B. L., et Ramesh, G. T. (2007). Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Nanosci Nanotechnol* **7**, 2466-2472.

Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., et Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir* **21**, 10644-10654.

Shvedova, A. A., Castranova, V., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Murray, A. R., Gandelsman, V. Z., Maynard, A., et Baron, P. (2003). Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* **66**, 1909-1926.

Shvedova, A. A., Fabisiak, J. P., Kisin, E. R., Murray, A. R., Roberts, J. R., Tyurina, Y. Y., Antonini, J. M., Feng, W. H., Kommineni, C., Reynolds, J., Barchowsky, A., Castranova, V., et Kagan, V. E. (2008a). Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **38**, 579-590.

Shvedova, A. A., Kapralov, A. A., Feng, W. H., Kisin, E. R., Murray, A. R., Mercer, R. R., St Croix, C. M., Lang, M. A., Watkins, S. C., Konduru, N. V., Allen, B. L., Conroy, J., Kotchey, G. P., Mohamed, B. M., Meade, A. D., Volkov, Y., Star, A., Fadeel, B., et Kagan, V. E. (2012). Impaired clearance and enhanced pulmonary inflammatory/fibrotic response to carbon nanotubes in myeloperoxidase-deficient mice. *Plos One* **7**, e30923.

Shvedova, A. A., Kisin, E., Murray, A. R., Johnson, V. J., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B. T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, V., Baron, P. A., et Kagan, V. E. (2008b).

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**, L552-L565.

Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Mercer, R., Murray, A. R., Johnson, V. J., Potapovich, A. I., Tyurina, Y. Y., Gorelik, O., Arepalli, S., Schwegler-Berry, D., Hubbs, A. F., Antonini, J., Evans, D. E., Ku, B. K., Ramsey, D., Maynard, A., Kagan, V. E., Castranova, V., et Baron, P. (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **289**, L698-L708.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffeis, T. G., Wright, C. J., et Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* **30**, 3891-3914.

Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., et Kostarelos, K. (2006). Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3357-3362.

Singh, S., Shi, T. M., Duffin, R., Albrecht, C., van Berlo, D., Hoehr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I., Borm, P. J. A., et Schins, R. P. F. (2007). Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* **222**, 141-151.

Sydlik, U., Bierhals, K., Soufi, M., Abel, J., Schins, R. P. F., et Unfried, K. (2006). Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **291**, L725-L733.

Tabet, L., Bussy, C., Amara, N., Setyan, A., Grodet, A., Rossi, M., Pairon, J. C., Boczkowski, J., et Lanone, S. (2009). Adverse Effects of Industrial Multiwalled Carbon Nanotubes on Human Pulmonary Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* **72**, 60-73.

Tabet, L., Bussy, C., Setyan, A., Simon-Deckers, A., Rossi, M. J., Boczkowski, J., et Lanone, S. (2011). Coating carbon nanotubes with a polystyrene-based polymer protects against pulmonary toxicity. *Particle and Fibre Toxicology* **8**.

Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S., et Kanno, J. (2008). Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *Journal of Toxicological Sciences* **33**, 105-116.

Takahashi, G., Tanaka, H., Wakahara, K., Nasu, R., Hashimoto, M., Miyoshi, K., Takano, H., Yamashita, H., Inagaki, N., et Nagai, H. (2010). Effect of Diesel Exhaust Particles on House Dust Mite-Induced Airway Eosinophilic Inflammation and Remodeling in Mice. *Journal of Pharmacological Sciences* **112**, 192-202.

Takano, H., Yoshikawa, T., Ichinose, T., Miyabara, Y., Imaoka, K., et Sagai, M. (1997). Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **156**, 36-42.

Takeda, S., Ozaki, H., Hattori, S., Ishii, A., Kida, H., et Mukasa, K. (2007). Detection of influenza virus hemagglutinin with randomly immobilized anti-hemagglutinin antibody on a carbon nanotube sensor. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **7**, 752-756.

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

Tamaoki, J., Isono, K., Takeyama, K., Tagaya, E., Nakata, J., et Nagai, A. (2004). Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, L1127-L1133.

Teeguarden, J. G., Webb-Robertson, B. J., Waters, K. M., Murray, A. R., Kisin, E. R., Varnum, S. M., Jacobs, J. M., Pounds, J. G., Zanger, R. C., et Shvedova, A. A. (2011). Comparative Proteomics and Pulmonary Toxicity of Instilled Single-Walled Carbon Nanotubes, Crocidolite Asbestos, and Ultrafine Carbon Black in Mice. *Toxicological Sciences* **120**, 123-135.

Thibodeau, M. S., Giardina, C., Knecht, D. A., Helble, J., et Hubbard, A. K. (2004). Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicological Sciences* **80**, 34-48.

Thurnherr, T., Brandenberger, C., Fischer, K., Diener, L., Manser, P., Maeder-Althaus, X., Kaiser, J. P., Krug, H. F., Rothen-Rutishauser, B., et Wick, P. (2011). A comparison of acute and long-term effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human lung and immune cells in vitro. *Toxicology Letters* **200**, 176-186.

Tong, H. Y., McGee, J. K., Saxena, R. K., Kodavanti, U. P., Devlin, R. B., et Gilmour, M. I. (2009). Influence of acid functionalization on the cardiopulmonary toxicity of carbon nanotubes and carbon black particles in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **239**, 224-232.

Trosic, I., Matausic-Pisl, M., et Hors, N. (2000). Pathways and quantification of insoluble particles in the lung compartments of the rat. *Int J Hyg Environ Health* **203**, 39-43.

Tsukahara, T., et Haniu, H. (2011). Cellular cytotoxic response induced by highly purified multi-wall carbon nanotube in human lung cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **352**, 57-63.

Ursini, C. L., Cavallo, D., Fresegna, A. M., Ciervo, A., Maiello, R., Buresti, G., Casciardi, S., Tombolini, F., Bellucci, S., et Iavicoli, S. (2012). Comparative cyto-genotoxicity assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. *Toxicol In Vitro*.

van Zijverden, M., de Haar, C., van Beelen, A., van Loveren, H., Penninks, A., et Pieters, R. (2001). Coadministration of antigen and particles optimally stimulates the immune response in an intranasal administration model in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **177**, 174-178.

Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S., et Possmayer, F. (1998). The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1408**, 90-108.

Venkatesan, J., et Kim, S. K. (2010). Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering-An Overview. *Marine Drugs* **8**, 2252-2266.

Wakahara, K., Tanaka, H., Takahashi, G., Tarnari, M., Nasu, R., Toyohara, T., Takano, H., Salto, S., Inagaki, N., Shimokata, K., et Nagai, H. (2008). Repeated instillations of Dermatophagoides farinae into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice - Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate. *Eur J Pharmacol* **578**, 87-96.

Wako, K., Kotani, Y., Hirose, A., Doi, T., et Hamada, S. (2010). Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity. *Journal of Toxicological Sciences* **35**, 437-446.

Wang, H. F., Wang, J., Deng, X. Y., Sun, H. F., Shi, Z. J., Gu, Z. N., Liu, Y. F., et Zhao, Y. L. (2004). Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **4**, 1019-1024.

Wang, L. Y., Castranova, V., Mishra, A., Chen, B., Mercer, R. R., Schwegler-Berry, D., et Rojanasakul, Y. (2010a). Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactant for pulmonary in vitro and in vivo toxicity studies. *Particle and Fibre Toxicology* **7**.

Wang, M. Y., Yu, S. N., Wang, C. A., et Kong, J. L. (2010b). Tracking the Endocytic Pathway of Recombinant Protein Toxin Delivered by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Acs Nano* **4**, 6483-6490.

Wang, X., Jia, G., Wang, H., Nie, H., Yan, L., Deng, X. Y., et Wang, S. (2009). Diameter Effects on Cytotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **9**, 3025-3033.

Wang, X., Xia, T., Ntim, S. A., Ji, Z. X., Lin, S. J., Meng, H., Chung, C. H., George, S., Zhang, H. Y., Wang, M. Y., Li, N., Yang, Y., Castranova, V., Mitra, S., Bonner, J. C., et Nel, A. E. (2011a). Dispersal State of Multiwalled Carbon Nanotubes Elicits Profibrogenic Cellular Responses That Correlate with Fibrogenesis Biomarkers and Fibrosis in the Murine Lung. *Acs Nano* **5**, 9772-9787.

Wang, X. J., Katwa, P., Podila, R., Chen, P. Y., Ke, P. C., Rao, A. M., Walters, D. M., Wingard, C. J., et Brown, J. M. (2011b). Multi-walled carbon nanotube instillation impairs pulmonary function in C57BL/6 mice. *Particle and Fibre Toxicology* **8**.

Wang, Z., Li, N., Zhao, J., White, J. C., Qu, P., et Xing, B. (2012). CuO Nanoparticle Interaction with Human Epithelial Cells: Cellular Uptake, Location, Export, and Genotoxicity. *Chem Res Toxicol*.

Warheit, D. B., Laurence, B. R., Reed, K. L., Roach, D. H., Reynolds, G. A. M., et Webb, T. R. (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological Sciences* **77**, 117-125.

Welsher, K., Sherlock, S. P., et Dai, H. J. (2011). Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8943-8948.

Wick, P., Manser, P., Limbach, L. K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Stark, W. J., et Bruinink, A. (2007). The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett* **168**, 121-131.

Winter, M., Beer, H. D., Hornung, V., Kramer, U., Schins, R. P. F., et Forster, I. (2011). Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO2 nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology* **5**, 326-340.

Wirnitzer, U., Herbold, B., Voetz, M., et Ragot, J. (2009). Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes (R), agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicology Letters* **186**, 160-165.

Wu, M. X., Gordon, R. E., Herbert, R., Padilla, M., Moline, J., Mendelson, D., Litle, V., Travis, W. D., et Gil, J. (2010). Case Report: Lung Disease in World Trade Center Responders Exposed to Dust and Smoke: Carbon Nanotubes Found in the Lungs of World Trade Center Patients and Dust Samples. *Environmental Health Perspectives* **118**, 499-504.

Wu, W., Li, R. T., Bian, X. C., Zhu, Z. S., Ding, D., Li, X. L., Jia, Z. J., Jiang, X. Q., et Hu, Y. Q. (2009). Covalently Combining Carbon Nanotubes with Anticancer Agent: Preparation and Antitumor Activity. *Acs Nano* **3**, 2740-2750.

Wu, W., Wieckowski, S., Pastorin, G., Benincasa, M., Klumpp, C., Briand, J. P., Gennaro, R., Prato, M., et Bianco, A. (2005). Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**, 6358-6362.

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

Yang, H., Liu, C., Yang, D. F., Zhang, H. S., et Xi, Z. G. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology* **29**, 69-78.

Yang, S. T., Wang, X., Jia, G., Gu, Y. Q., Wang, T. C., Nie, H. Y., Ge, C. C., Wang, H. F., et Liu, Y. F. (2008). Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicology Letters* **181**, 182-189.

Yaron, P. N., Holt, B. D., Short, P. A., Losche, M., Islam, M. F., et Dahl, K. N. (2011). Single wall carbon nanotubes enter cells by endocytosis and not membrane penetration. *Journal of Nanobiotechnology* **9**.

Yazdi, A. S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S. K., Tardivel, A., Couillin, I., et Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 alpha and IL-1 beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 19449-19454.

Ye, S. F., Wu, Y. H., Hou, Z. Q., et Zhang, Q. Q. (2009). ROS and NF-kappa B are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **379**, 643-648.

Yu, C. K., et Chen, C. L. (2003). Activation of mast cells is essential for development of house dust mite Dermatophagoides farinae-induced allergic airway inflammation in mice. *J Immunol* **171**, 3808-3815.

Zhang, T., Tang, M., Kong, L., Li, H., Zhang, S., Xue, Y., et Pu, Y. (2012). Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages. *J Hazard Mater* **219-220**, 203-212.

Zhang, X. K., Meng, L. J., Lu, Q. H., Fei, Z. F., et Dyson, P. J. (2009). Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes. *Biomaterials* **30**, 6041-6047.

Zhang, X. K., Meng, L. J., Wang, X. F., et Lu, Q. H. (2010). Preparation and Cellular Uptake of pH-Dependent Fluorescent Single-Wall Carbon Nanotubes. *Chemistry-a European Journal* **16**, 556-561.

Zhang, Z., Kleinstreuer, C., Donohue, J. F., et Kim, C. S. (2005). Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *Journal of Aerosol Science* **36**, 211-233.

Annexes

Publication

"Lung deposition and toxicological responses evoked by multi-walled carbon nanotubes dispersed in a synthetic lung surfactant in the mouse "

Ronzani C., Spiegelhalter C., Vonesch J.L., Lebeau L., Pons F.

Archives of Toxicology **86** (2012) : 137-149

Carole RONZANI

BIODISTRIBUTION ET TOXICITÉ RESPIRATOIRES DES NANOTUBES DE CARBONE CHEZ LA SOURIS NORMALE ET DANS UN MODÈLE MURIN D'ASTHME ALLERGIQUE

Résumé :

Avec l'essor des nanotechnologies, se pose la question de la toxicité respiratoire et de l'impact des nanoparticules manufacturées sur des pathologies respiratoires telles que l'asthme allergique. Cette thèse a eu pour but d'étudier la toxicité respiratoire des nanotubes de carbone (NTC), figure emblématique des nanotechnologies, en lien avec leur biodistribution, chez la souris normale et dans un modèle murin d'asthme. Ce travail a porté sur des NTC à parois multiples, qui représentent plus de 95% de la production industrielle de NTC. Nos travaux ont montré que ces NTC se distribuent de façon uniforme dans les voies respiratoires de la souris, qu'ils sont internalisés par différentes cellules résidantes ou infiltrées (macrophages, pneumocytes de type II, neutrophiles), et qu'ils sont capables, en fonction de la dose et de la durée d'exposition, d'induire une inflammation et un remodelage des voies aériennes. Nos données ont également montré que ces NTC peuvent promouvoir la réponse à un allergène, les cellules épithéliales jouant un rôle dans cet effet. Ainsi, l'exposition aux NTC pourrait représenter un risque pour la santé respiratoire des sujets sains, mais également des sujets asthmatiques.

Mots clés : Nanotechnologies, nanotubes de carbone, biodistribution, toxicité respiratoire, asthme.

Abstract :

With the development of nanotechnologies, the question arises about the respiratory toxicity and the impact of the manufactured nanoparticles on the respiratory diseases such as allergic asthma. The aim of this thesis was to study the respiratory toxicity and biodistribution of carbon nanotubes (CNT), which are emblematic figures of nanotechnologies, in normal mice and in a murine asthma model. This work was conducted on multi-walled CNT, which represent more than 95% of the industrial production of CNT. Our data showed that CNT distribute uniformly in the mouse airways, that they are internalized by different resident and infiltrated cells (macrophages, type II pneumocytes, neutrophils), and that they are able, according to the dose and duration of exposure, to induce an inflammatory response and a tissue remodeling. Our data also showed that CNT can promote the response to an allergen, and suggested that epithelial cells play a role in this effect. Thus, exposure to CNT could represent a risk for the respiratory health of healthy subjects and asthmatics.

Keywords : Nanotechnology, carbon nanotubes, biodistribution, respiratory toxicity, asthma.

Adresse du Laboratoire : UMR 7199 – UdS/CNRS, Faculté de Pharmacie – Université de Strasbourg, 74 route du Rhin – CS60024, 67 401 Illkirch Cedex