HAL
open science

Génotoxicité et impact de nanoparticules de dioxyde de titane sur la réparation de l'ADN dans des cellules alvéolaires pulmonaires

Mathilde Biola-Clier

To cite this version:

Mathilde Biola-Clier. Génotoxicité et impact de nanoparticules de dioxyde de titane sur la réparation de l'ADN dans des cellules alvéolaires pulmonaires. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV004 . tel-01320524

HAL Id: tel-01320524

https://theses.hal.science/tel-01320524

Submitted on 24 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Mathilde BIOLA-CLIER

Thèse dirigée par **Thierry DOUKI** et
Co-dirigée par **Marie CARRIERE**

préparée au sein du **Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du vivant**

Génotoxicité et impact de nanoparticules de dioxyde de titane sur la réparation de l'ADN dans des cellules alvéolaires pulmonaires

Thèse soutenue publiquement le **17 février 2016**,
devant le jury composé de :

Dr. Philippe MARIN
Chercheur CNRS-INSERM à l'Université de Montpellier (Rapporteur)
Dr. Filippo ROSSELLI
Chercheur CNRS à l'Université Paris-Sud (Paris XI) (Rapporteur)
Pr. Anne MAITRE
Chercheur à l'Université Grenoble-Alpes (Présidente)
Dr. Thierry DOUKI
Chercheur CEA à l'Université Grenoble-Alpes (Directeur de thèse)

En mémoire de Sir Terry Pratchett, je dédie cette thèse à Ponder Stibbons.

"*Ponder Stibbons was one of those unfortunate people cursed with the belief that if only he found out enough things about the universe it would all, somehow, make sense. The goal is the Theory of Everything, but Ponder would settle for the Theory of Something and, late at night, […] he despaired of even a Theory of Anything.*" (Terry Pratchett – *The Last Continent*)

Génotoxicité et impact de nanoparticules de dioxyde de titane sur la réparation de l'ADN dans des cellules alvéolaires pulmonaires

Sommaire :

Remerciements : 5

Principales abréviations : 7

Sommaire des figures : 8

Sommaire des tableaux : 10

Introduction générale : 11

Etat de l'art : 13

I. Les nanomatériaux 13

A. Définitions, origine et applications 13

B. Propriétés physico-chimiques des nanoparticules 16

C. Le dioxyde de titane (TiO_2) 17

II. Le tractus respiratoire humain 20

A. Structure générale du tractus respiratoire humain 21

B. Mécanismes de clairance 22

C. L'épithélium alvéolaire 24

III. De l'ADN aux protéines 25

A. Expression des gènes et production des protéines 25

B. Régulation de l'expression génique 27

C. Régulation de l'activité des protéines par phosphorylation 31

D. Dégradation des protéines 31

IV. Dommages à l'ADN et systèmes de réparation 32

A. Des agents génotoxiques aux lésions de l'ADN 32

B. Réponses aux dommages à l'ADN et systèmes de réparation 33

V. Toxicité pulmonaire des nanoparticules de TiO_2 55

A. Modèles et méthodes d'étude de la toxicité pulmonaire 55

B. Dosimétrie 56

C. Etudes épidémiologiques 62

D. Effets toxiques et mécanismes 64
E. Biodistribution et translocation vers d'autres organes 72
F. Conclusion sur les mécanismes de toxicité et lien avec la couronne protéique 74
Objectif, hypothèses et stratégie : 76
Matériels et méthodes : 78
I. Dispersion par sonication et caractérisation des suspensions de nanoparticules par DLS 78
A. Dispersion par sonication 78
B. Mesure du diamètre hydrodynamique par DLS 78
II. Modèles cellulaires, culture et exposition des cellules aux nanoparticules 78
A. Modèles cellulaires 78
B. Culture et exposition des cellules aux nanoparticules 81
III. Etude de l'expression des gènes par RT-qPCR 81
A. Principe de la méthode 81
B. Détails expérimentaux 82
IV. Etude de l'expression des protéines par Western-Blot 85
A. Principe de la méthode 85
B. Détails expérimentaux 85
V. Etude du profil de méthylation des promoteurs des gènes 86
VI. Etude de l'activité du protéasome 86
VII. Etude du phosphoprotéome 87
A. Stratégie expérimentale globale 87
B. Traitement des échantillons pour l'analyse phosphoprotéomique 88
C. Traitement des données de l'analyse phosphoprotéomique 90
D. Etude du niveau de phosphorylation global par des techniques de coloration en gel 91
VIII. Etude du cycle cellulaire 91
IX. Etude de la prolifération cellulaire 92
A. Principe de la méthode 92
B. Détails expérimentaux 92
X. Test de cytotoxicité (MTT) 92
A. Principe de la méthode 92
B. Détails expérimentaux 93
XI. Tests de génotoxicité 93
A. Test des comètes alcalines 93
B. Quantification des lésions 8oxodG par LC-MS/MS 93

XII. Statistiques 94
Résultats : 95
Article 1: TiO_2 nanoparticles globally down-regulate the expression of DNA repair genes and proteins in A549 cells 95
Keywords: 96
Abstract: 96
Introduction: 96
Methods: 97
Results: 99
Discussion: 106
Conclusion: 108
Acknowledgments: 108
Declaration of interest: 108
References: 108
Supplementary materials: 113
Supplementary methods: 114
Supplementary references: 114
Discussion complémentaire à l'article 1 115
Article 2: TiO_2 nanoparticles alter the cellular phosphoproteome in A549 cells 116
Abstract: 118
Introduction: 118
Results: 120
Discussion: 131
Experimental: 133
Conclusions: 136
Acknowledgements: 137
References: 137
Supplementary information: 142
Résultats complémentaires à l'article 2 146
A. Analyse phosphoprotéomique descriptive et comparaison des résultats d'ontologie protéique obtenus avec différents logiciels et plateformes 146
B. Confirmation de l'absence de modification du niveau de phosphorylation global des protéines après exposition aux NP de TiO_2 150
C. La quantité de protéines intracellulaires évolue inversement à leur niveau de phosphorylation 150

D. La prolifération cellulaire n'est pas modifiée après exposition aux NP de TiO_2 151
Discussion complémentaire à l'article 2 151
Conclusion sur les résultats complémentaires à l'article 2 154
Article 3: TiO_2 nanoparticles induce genotoxicity and down-regulate DNA repair genes in bronchial BEAS-2B cells 155
Keywords: 156
Abstract: 156
Introduction: 156
Methods: 158
Results: 159
Discussion and conclusion: 161
Acknowledgments: 162
Declaration of interest: 162
References: 163
Résultats et discussion complémentaires à l'article 3 168
Conclusion sur les résultats complémentaires à l'article 3 169
Discussion générale et perspectives : 170
I. Discussion méthodologique 170
II. Discussion générale des résultats et perspectives 171
Conclusion : 176
Références : 177
Annexes : 198
Annexe 1 : Articles collaboratifs 198
Annexe 2 : Protocole d'étude de la couronne protéique des NP dans un contexte cellulaire 243
A. Principe et objectif de l'étude 243
B. Protocole d'obtention des extraits protéiques A549 244
Résumé : 246
Abstract: 246

Remerciements :

De nombreuses personnes ont contribué à l'aboutissement de ce travail de thèse et je tiens à remercier chaleureusement chacune d'entre elles.

Je tiens en premier lieu à remercier Marie CARRIERE et Thierry DOUKI, mes directeurs de thèse, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour. Merci à tous les deux pour votre confiance et vos conseils avisés tout au long de ces trois années.

Merci au CEA de m'avoir accordé une bourse de thèse et au Labex Serenade d'avoir financé une partie des expériences.

Merci également aux membres de mon jury Philippe MARIN, Filippo ROSSELLI et Anne MAITRE d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je vous suis très reconnaissante du temps que vous y avez consacré. J'ai en outre une pensée particulière pour les membres de mon comité de suivi de thèse, Thierry ORSIERE et Sophie LANONE. Merci pour votre écoute, vos remarques enrichissantes et vos conseils, qui furent très bénéfiques au déroulement de ce projet.

Un grand merci à Jean ARMENGAUD et Jean-Charles GAILLARD pour leur aide plus que précieuse sur l'étude phosphoprotéomique. Jean, je te suis très reconnaissante du temps que tu as pris sur ton agenda, que je sais très rempli, pour le consacrer à ce travail. Merci pour tes réponses précises et très rapides (même pendant le week-end !), notamment durant la phase de rédaction de l'article. Et Jean-Charles, merci beaucoup pour la partie expérimentale et pour tout ce que tu m'as appris durant les deux semaines que j'ai passées à Marcoule. J'ai énormément apprécié ce séjour et je remercie vivement toute l'équipe pour son accueil chaleureux.

J'ai également plaisir à remercier toute l'équipe NaTom et en particulier Jean LABARRE et Jean-Christophe AUDE. Merci pour les nombreuses séances de réflexion très enrichissantes et pour vos remarques et conseils avisés sur mon travail.

Je remercie sincèrement toute l'équipe du LAN. Merci à tous pour votre accueil et votre bonne humeur communicative. Merci David pour ton aide à tous points de vue et en particulier pour tes conseils sur le plan expérimental. Merci Sylvie pour ton aide sur la partie réparation de l'ADN. Merci Jean-Luc pour ta bonne humeur, que tu as gardée alors même que je suis souvent venue t'embêter avec des papiers à signer et des logiciels à installer… Merci Zohra pour ta gentillesse, ton aide précieuse et ton efficacité sur le plan administratif. Merci Christine de m'avoir fait découvrir une aussi bonne école de danse. Merci à Camille et Laure, mes deux co-bureau successives. C'était un plaisir de partager le bureau avec vous, merci à toutes les deux pour votre bonne humeur, vos conseils et votre soutien. Merci à toute l'équipe nanos. C'était très agréable de travailler avec vous, même lorsque nous étions toutes serrées dans la petite salle de culture ! Enfin un grand merci particulier à Lucie, avec qui j'ai très souvent eu l'occasion de travailler en binôme. Merci pour tous ces bons moments et fous-rires partagés, notamment en Allemagne.

Je vous souhaite à tous une très bonne continuation et j'espère que nous aurons régulièrement l'occasion de nous revoir.

Pour finir, j'adresse un immense merci à ma famille et à mon entourage pour leur soutien et leur affection. Merci ma chère Alice de m'avoir écoutée, soutenue et coachée quand j'en avais besoin. Ton

amitié m’est très précieuse et je suis ravie de constater que tu ne te lasses pas des trajets Rouen-Grenoble. Je remercie infiniment mes parents pour le soutien inconditionnel et la confiance qu’ils m’accordent depuis mon plus jeune âge. Merci pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi, y compris lorsque cela implique de ne pas suivre les chemins habituels. Enfin mon plus grand merci s’adresse à Johan, mon mari. Merci infiniment mon chéri pour ton amour, ton soutien, ta confiance, ton humour et tout ce qui te caractérise. Ta présence à mes côtés m’est indispensable et je me réjouis immensément de la petite famille que nous formerons bientôt.

Principales abréviations :

ADN/DNA :	Acide désoxyribonucléique
ARN/RNA :	Acide ribonucléique
BER :	Base Excision Repair
HR :	Homologous Recombination
MMR :	Mismatch Repair
NER :	Nucleotide Excision Repair
NHEJ :	Non-Homologous End-Joining
NP :	Nanoparticule
RT-qPCR :	Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction
8oxodG :	8-oxo-dGuanine

Sommaire des figures :

Figure 1 : Ordres de grandeur du monde vivant. 13
Figure 2 : Proportion de molécules en surface en fonction du diamètre des nanoparticules (Oberdörster et al., 2005). 16
Figure 3 : Structures cristallines des différentes formes de TiO_2 (rutile, anatase et brookite) (Gupta and Tripathi, 2011; Di Paola et al., 2013). 17
Figure 4 : Historique de production mondiale annuelle de TiO_2 (toutes tailles de particules confondues) entre 1916 et 2011 (Jovanović, 2015). Au total plus de 165 millions de tonnes de TiO_2 auraient été produites durant cette période. 19
Figure 5: Structure générale du tractus respiratoire humain (BéruBé et al., 2010, 2009). 22
Figure 6 : Structure des jonctions inter-cellules épithéliales pulmonaires (BéruBé et al., 2010). 22
Figure 7 : Composition détaillée du surfactant alvéolaire (Chroneos et al., 2010). 25
Figure 8: Structure de l'ADN en double-hélice (Krogh, 2011). 26
Figure 9 : Différents facteurs de transcription (Mason et al., 2011). 28
Figure 10: Modifications des histones affectant la structure de la chromatine (Mason et al., 2011). 29
Figure 11 : Schéma récapitulatif des principales voies de réparation de l'ADN chez les mammifères (Fong et al., 2013). 34
Figure 12 : Schéma du mécanisme de la voie BER (Hegde et al., 2008). 37
Figure 13 : Schéma du mécanisme de la voie NER (Fousteri and Mullenders, 2008). 39
Figure 14 : Schéma du mécanisme de la voie HR (Amunugama and Fishel, 2012; Daley et al., 2013; Iyama and Wilson, 2013; Shiloh and Ziv, 2013). 43
Figure 15 : Schéma du mécanisme de la voie NHEJ (Deriano and Roth, 2013). 44
Figure 16 : Schéma du mécanisme de la voie MMR (Bak et al., 2014; Hoeijmakers, 2001; Peña-Diaz and Jiricny, 2012). Ce schéma représente la réparation d'un mésappariement à 1 nucléotide sur le brin du haut, ainsi que d'une boucle d'insertion à 3 nucléotides sur le brin du bas, au niveau d'une fourche de réplication de l'ADN. 46
Figure 17: Schéma du mécanisme de TLS selon les deux hypothèses en vigueur (A/B) (Yang et al., 2013). 47
Figure 18 : Exemples de réversions directes (Yi and He, 2013). « 2KG » : 2-kétoglutarate. 48
Figure 19 : Schéma du mécanisme de la voie Fanconi Anaemia en phase S ou G2 du cycle cellulaire (Kottemann and Smogorzewska, 2013). 49
Figure 20 : Schéma du mécanisme de la voie RER (Williams and Kunkel, 2014). 50
Figure 21 : Schéma des différentes étapes du cycle cellulaire (Mader, 2012; Patil et al., 2013). 51
Figure 22 : Echelles de concentrations en aérosols mesurées en mg/m^3 (A et B) ou en $particules/cm^3$ (C) pour les particules de TiO_2 en général (A et C) et de taille nanométrique (B) en milieu professionnel. Les concentrations maximales recommandées par les différents organismes sont notées en rouge (NIOSH, 2011; Shi et al., 2013), les concentrations usuellement mesurées sont indiquées en bleu (Baan, 2007; Fryzek et al., 2003; Gangwal et al., 2011; Garabrant et al., 1987; Hext et al., 2005; Koivisto et al., 2012; Lee et al., 2011) et les concentrations maximales estimées sont représentées en orange (Boffetta et al., 2001, 2004; Rode et al., 1981). 57
Figure 23 : Distribution de taille (diamètre en nm) d'un aérosol mesuré sur un lieu de production de particules de TiO_2 (Hämeri et al., 2009). Cette distribution est centrée sur 16 nm. 57
Figure 24 : Fractions de particules déposées dans les différentes parties du tractus respiratoire en fonction du diamètre de ces particules (Geiser and Kreyling, 2010). 58
Figure 25 : Mécanismes physiques influençant le transport des particules en milieu liquide en fonction de leur diamètre, d'après le modèle ISDD (Hinderliter et al., 2010). 59
Figure 26 : Fraction de la dose de particules de TiO_2 déposée sur un tapis cellulaire en fonction de la durée d'exposition (pour une hauteur de milieu de culture de 3,1 mm) (A) ou en fonction de la hauteur de milieu de culture (pour une exposition de 24 h) (B), d'après le modèle ISDD (Hinderliter et al., 2010). 60
Figure 27 : Principaux modes d'internalisation des nanomatériaux dans les cellules en fonction de leur taille primaire ou de celle de leurs agrégats/agglomérats (Bruinink et al., 2015). 62

Figure 28 : Nombre d'articles scientifiques publiés chaque année depuis 1996 sur la toxicité des NP de TiO_2, d'après une recherche effectuée le 13 mai 2015 dans la base de données Web of Science™ (Thomson Reuters), selon l'équation « tox AND (tio2 OR "titanium dioxide" OR "titanium oxide" OR "titania") AND nano* ». On en dénombre au total 2 975. _____ 64*
Figure 29 : Biodistribution des NP de TiO_2 dans l'organisme (Shi et al., 2013). Les flèches en pointillés indiquent des relations incertaines, tandis que les flèches pleines représentent les relations démontrées expérimentalement. _____ 73
Figure 30 : Représentation schématique des hypothèses pouvant expliquer la diminution des capacités cellulaires de réparation de l'ADN consécutives à une exposition de cellules pulmonaires à des NP de TiO_2.___ 77
Figure 31 : Morphologie vue de dessus des cellules A549 en culture (cf. fiche ATCC_A549). _____ 80
Figure 32 : Morphologie vue de dessus des cellules BEAS-2B (cf. fiche ATCC_BEAS-2B). _____ 80
Figure 33 : Distribution du point isoélectrique (pI) et de la masse moléculaire (Mw) des protéines détectées. Les tableaux associent le pourcentage de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque catégorie. Plus ce pourcentage est élevé, plus la coloration rouge de la case correspondante est foncée. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées. _____ 146
Figure 34 : Distribution de la localisation cellulaire des protéines détectées. Ces résultats ont été obtenus à partir des plateformes GO term mapper (A) et IPA® (B). Les tableaux associent le pourcentage de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque compartiment cellulaire. Ce pourcentage est également indiqué en comparaison pour le protéome humain total (PHT). Plus il est élevé, plus la coloration rouge de la case correspondante est foncée. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. « GO » : Gene Ontology, « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées, « n/d » : non-documenté. _____ 147
Figure 35 : Description de la fonction et du type de protéines détectées. Ces résultats ont été obtenus à partir des plateformes GO term mapper (A) et IPA® (B). Les tableaux associent le pourcentage de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque catégorie. Ce pourcentage est également indiqué en comparaison pour le protéome humain total (PHT). Plus il est élevé, plus la coloration rouge de la case correspondante est foncée. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. « GO » : Gene Ontology, « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées, « n/d » : non-documenté. _____ 148
Figure 36 : Description des processus cellulaires auxquels appartiennent les protéines détectées. Ces résultats ont été obtenus à partir de la plateforme GO term mapper. Le tableau associe le pourcentage de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque catégorie. Ce pourcentage est également indiqué en comparaison pour le protéome humain total (PHT). Plus il est élevé, plus la coloration rouge de la case correspondante est foncée. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. « GO » : Gene Ontology, « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées. _____ 149
Figure 37 : Niveau de phosphorylation global des protéines cellulaires après exposition des cellules aux NP de TiO_2. Ces résultats ont été obtenus par des techniques de coloration au sein de gels de polycarylamide. Ils sont exprimés en facteur d'induction par rapport aux contrôles non-exposés. _____ 150
Figure 38 : Niveau d'expression global des protéines BAG3, HNRNPUL2 et SRRM1 dans les cellules A549 exposées à 100 µg/mL de NP de TiO_2 pendant 24 h. Ces résultats, obtenus par western-blot, sont exprimés en facteur d'induction par rapport au contrôle. Significativité statistique, par rapport au contrôle (*) : $p < 0,05$. 151
Figure 39 : Prolifération cellulaire après exposition aux NP de TiO_2. Ctrl : contrôle (non-exposé aux NP de TiO_2). _____ 151
Figure 40 : Diamètre hydrodynamique en nombre et PDI dans les surnageants de cellules A549 et BEAS-2B exposées à 0 (T-) ou 100 µg/mL de NP de TiO_2. 100 µg/mL de NP de TiO_2 ont été ajoutés aux surnageants T- préalablement aux mesures. « PDI » : indice de polydispersité. _____ 168
Figure 41 : Représentation schématique des principales conclusions de cette étude et hypothèses demeurant en suspens. _____ 176

Figure 42 : Schéma du protocole d'analyse de la couronne protéique des NP dans un contexte cellulaire. « T°amb. » : température ambiante, « SDS » : dodécylsulfate de sodium. 244

Sommaire des tableaux :

Tableau 1 : Exemples d'applications de nanomatériaux manufacturés (ANSES, 2014). 15
Tableau 2 : Propriétés des différentes formes cristallines de TiO_2 (rutile, anatase et brookite) (Gupta and Tripathi, 2011). 18
Tableau 3 : Site de dépôt dans le tractus respiratoire des corps étrangers inhalés en fonction de la taille des particules (BéruBé et al., 2009). 24
Tableau 4 : Exemples de taux de lésions de l'ADN générées par des agents génotoxiques endogènes ou exogènes (Ciccia and Elledge, 2010).[a] 33
Tableau 5 : Glycosylases intervenant dans le BER (Hegde et al., 2008).[a] 35
Tableau 6 : Propriétés des polymérases TLS chez l'homme (Goodman and Woodgate, 2013; Yang et al., 2013). 47
Tableau 7 : Protéines (hors kinases) impliquées dans le remodelage de la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN chez les mammifères (Gong and Miller, 2013; Polo and Jackson, 2011). 51
Tableau 8 : Influence directe ou indirecte (via des facteurs de transcription dépendant du système UPS) du système UPS sur la régulation transcriptionnelle de la réparation de l'ADN (Vlachostergios et al., 2009). 52
Tableau 9 : Relations de régulations transcriptionnelles probablement non-exhaustives des protéines BRCA1, E2F1, AP-1/c-JUN, NRF2, BCL2 et Aurora-A sur les protéines de réparation de l'ADN (Christmann and Kaina, 2013; Laulier and Lopez, 2012; Niture and Jaiswal, 2012; Piao et al., 2011; Polager et al., 2002; Saha et al., 2010; Wang et al., 2014).[a] 53
Tableau 10 : Effets de la sumoylation sur les protéines de réparation de l'ADN (Sarangi and Zhao, 2015). 54
Tableau 11 : Correspondances entre des concentrations d'aérosols de NP de TiO_2 inhalés et les doses déposées dans les alvéoles pulmonaires selon différents scenarii d'exposition (Gangwal et al., 2011).[a] 61
Tableau 12 : Etudes épidémiologiques (cas, cas-témoins ou cohortes) recensées portant sur l'effet de l'exposition pulmonaire aux particules de TiO_2 sur la santé humaine. 63
Tableau 13 : Etudes in vitro rapportant des résultats de génotoxicité, dommages chromosomiques (micronoyaux - "MN") ou mutagénicité sur des modèles pulmonaires exposés à des NP de TiO_2 pures, non-irradiées (UV, lumière visible, etc.).[a] 70
Tableau 14 : Etudes in vivo rapportant des résultats de génotoxicité, dommages chromosomiques (micronoyaux - "MN") ou mutagénicité sur des animaux exposés par voie pulmonaire à des NP de TiO_2 pures, non-irradiées (UV, lumière visible, etc.).[a] 70
Tableau 15 : Informations détaillées sur chaque couple d'amorces qPCR utilisé.[a] 84
Tableau 16 : Catégories d'ontologie protéique enrichies parmi les protéines détectées selon la plateforme GOrilla.[a] 150
Tableau 17 : Liste des laboratoires et personnes impliquées dans le projet NaTom.[a] 243

Introduction générale :

Les nanosciences font l'objet depuis quelques dizaines d'années un engouement croissant. Les propriétés des nano-objets font en effet miroiter de nombreuses applications possibles, notamment dans le cadre de défis sociétaux comme la lutte contre le cancer. Cependant elles génèrent également des inquiétudes liées à leurs potentiels effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement. En effet l'origine même de l'intérêt industriel des nanomatériaux provient du fait que l'échelle nanométrique (située entre 1 et 100 nm, soit 10^{-9}-10^{-7} m) leur confère des propriétés inexistantes à des échelles plus grandes et celles-ci se traduisent souvent par une réactivité chimique décuplée. Or lorsque la réactivité d'un composé est grande, son potentiel toxique peut l'être d'autant. Par ailleurs les scandales sanitaires des dernières décennies (amiante, distillbène, etc.) incitent à la plus grande prudence quant à l'utilisation massive de produits nouveaux dont on ignore encore largement les effets.

Nous avons ici choisi de nous intéresser aux effets du dioxyde de titane (TiO_2). Cet oxyde métallique se présente sous la forme d'une poudre blanche, qui peut être constituée de particules de tailles diverses (micro- ou nanométriques). Ce composé, couramment utilisé en tant qu'agent de blanchiment dans de nombreux domaines (peintures, agroalimentaire, industrie pharmaceutique, etc.), représente 70% de la production mondiale de pigments (Shi et al., 2013). En outre l'échelle nanométrique lui confère des propriétés de photocatalyse, qui ont contribué à placer les nanoparticules (NP) de TiO_2 parmi les nanomatériaux les plus produits actuellement dans le monde, avec environ 14 000 tonnes produites ou importées chaque année en France (ANSES, 2014). Ces chiffres amènent à s'interroger sur leur impact sur la santé humaine, en particulier dans le cadre professionnel où les travailleurs risquent surtout d'y être exposés par inhalation, notamment en raison de la complexité liée à la mise en place de dispositifs de protection des voies respiratoires.

Des études sur l'animal ont montré l'apparition de tumeurs pulmonaires après inhalation ou instillation intratrachéale de fortes doses de nano- ou microparticules de TiO_2, ce qui a conduit le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) à classer le TiO_2 comme cancérogène possible dans le groupe 2B (Baan, 2007). Par ailleurs la littérature rapporte abondamment l'induction par les NP de TiO_2 de phénomènes inflammatoires, stress oxydant, génotoxicité, mort cellulaire, etc. (Shi et al., 2013).

Notre étude n'a pas été conçue pour répondre à la question des risques pour la santé humaine posés par l'inhalation de NP de TiO_2, mais plutôt pour contribuer à améliorer la compréhension de leurs mécanismes de toxicité. Une précédente étude menée au laboratoire a notamment montré que les dommages à l'ADN engendrés par ces NP dans des modèles pulmonaires étaient entre autres liés à une perturbation des capacités cellulaires de réparation de l'ADN (Jugan et al., 2012). Or les mécanismes d'impact des NP de TiO_2 sur les processus de réparation de l'ADN sont encore largement ignorés. Ce sont précisément ces derniers sur lesquels nous avons choisi de nous focaliser ici. Notre étude nous a notamment amenés à analyser, à la suite d'un stress aux NP de TiO_2, l'expression de gènes et de protéines de réparation de l'ADN, ainsi que la régulation par des facteurs amont de leur expression et de l'activité des protéines correspondantes.

Le présent document est constitué de quatre parties. La première consiste en un état de l'art, apportant des éléments de compréhension sur les nanomatériaux et la structure du tractus respiratoire humain, des notions de biologie cellulaire et notamment les fondamentaux de l'expression des gènes et de la production et la régulation de l'activité des protéines, les mécanismes de réparation

de l'ADN et enfin l'état actuel des connaissances sur la toxicité pulmonaires des NP de TiO_2. Après une définition des objectifs de l'étude, des hypothèses de départ et de la stratégie adoptée pour les vérifier, la seconde partie présente les matériels et méthodes employés. Les résultats obtenus sont ensuite présentés en troisième partie sous la forme de trois articles en cours de publication dans des revues scientifiques. Enfin la quatrième et dernière partie consiste en une discussion et mise en perspective de l'ensemble des résultats, précédant une conclusion sur les éléments apportés par cette étude et des propositions de pistes de recherches futures.

Etat de l'art :

I. Les nanomatériaux

A. Définitions, origine et applications

1. Définitions

Face à l'engouement croissant de l'industrie pour les nanotechnologies, de nombreuses instances européennes et internationales se sont penchées ces dernières années sur la définition de l'échelle nanométrique et des nanomatériaux (ISO, OCDE, Europe (SCENIHR, SCCP, Novel Foods, Cosmetic Products), ACC, Australie (NICNAS), Canada, Danemark, Royaume-Uni, US-EPA, etc.) (Lövestam et al., 2010). D'une manière générale, l'échelle nanométrique est définie comme allant de 1 à 100 nm, soit de 10^{-9} à 10^{-7} m (Figure 1), à l'exception de certaines instances qui ne fixent pas de limite inférieure (Royaume-Uni et Europe (SCENIHR, SCCP, Novel Foods)) ou qui fixent une limite supérieure à 200 nm (Royaume-Uni (DEFRA)).

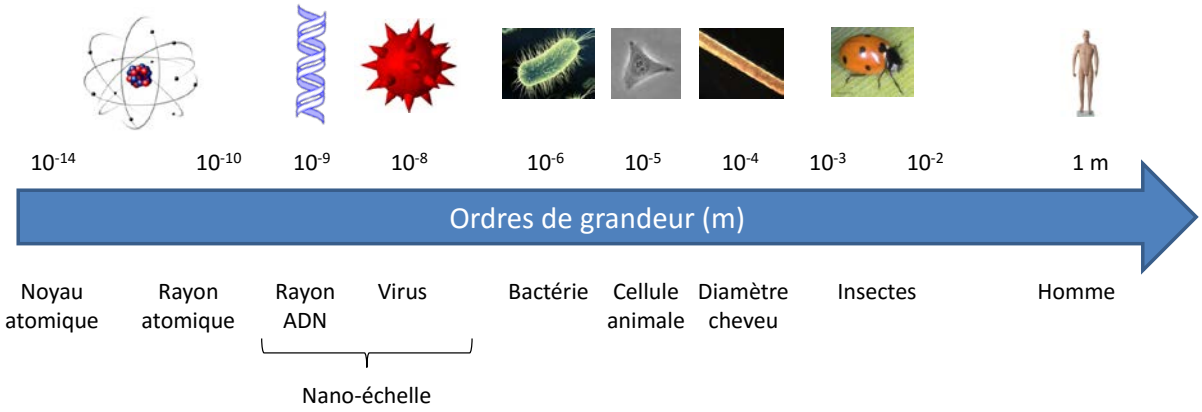


Figure 1 : Ordres de grandeur du monde vivant.[1]

Selon la norme ISO/TS 27687:2008, les nano-objets sont définis comme des matériaux comportant au moins 1 dimension externe nanométrique. De cette définition découlent celles des nanoparticules (3 dimensions externes < 100 nm), nanofibres (2 dimensions externes < 100 nm) et nanofeuillets (1 dimension externe < 100 nm). Parmi les nanofibres, on distingue par ailleurs les nanofils (électriquement (semi)-conducteurs), nanotubes (creux) et nanotiges (pleines). De manière plus générale, les nano-objets rentrent dans la catégorie des matériaux nano-structurés, définis comme

[1] Sources des images (sites web consultés en mai 2015) :
http://lewebpedagogique.com/projeteuro2015/
http://www.informationhospitaliere.com/actualite-23261-vih-sida-adn-serait-solution.html
http://www.philly.com/philly/blogs/public_health/TB-Blues-to-Bacteria-A-musical-medical-history-playbook.html
http://www.lgcstandards-atcc.org/~/media/Attachments/2/6/1/7/1753.ashx
http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-traitement-calvitie-on-peut-etre-cheveu-37661/
http://aramel.free.fr//
http://www.retif.lu/mannequins-et-bustes/mannequins-homme.html

possédant une structure interne (exemple : nanopores) ou de surface à l'échelle nanométrique (norme ISO/TS 80004-4:2011).

Alors que les différentes définitions des nanomatériaux s'accordent plutôt bien sur le critère de taille, on note de subtiles différences dans les éventuels autres critères (Lövestam et al., 2010; Rauscher and Roebben, 2014; Roebben et al., 2014). Certaines instances imposent par exemple que le matériau en question présente à l'échelle nanométrique des propriétés particulières absentes à des échelles plus grandes (Europe (SCCP), Australie (NICNAS), Canada). En outre l'Europe, dans le cadre du règlement relatif aux produits cosmétiques (N°1223/2009), indique que les nanomatériaux sont insolubles ou biopersistant et manufacturés intentionnellement. Ce critère du manufacturage en particulier fait largement débat entre les différentes définitions, de même que l'inclusion des matériaux nanostructuré dans leur structure interne. Par ailleurs la définition du seuil à partir duquel un mélange de particules de tailles diverses est considéré comme nanoparticulaire reste très floue à l'échelle internationale, ce qui pose problème pour la régulation de ces produits.

En 2011 la Commission Européenne a publié une recommandation visant à harmoniser ces définitions dans le cadre réglementaire européen[2]. Selon cette recommandation, un nanomatériau est un « matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ». Cependant le texte précise que des aménagements à cette définition pourront être accordés dans des cas spécifiques justifiés par la protection de l'environnement ou de la santé publique. Ces aménagements pourront notamment concerner le seuil de 50% de particules nanométriques, qui pourra être abaissé jusqu'à 1%. Par ailleurs si un matériau ne correspond pas à la définition ci-dessus mais présente une surface spécifique en volume supérieure à 60 m^2/cm^3, il pourra également dans certains cas être considéré comme un nanomatériau (la réciproque n'excluant cependant pas de la définition les nanomatériaux à surface spécifique inférieure à 60 m^2/cm^3).

La France a été l'une des premières à implémenter cette définition dans son cadre législatif. Le code de l'environnement français (chapitre III, article L523) oblige en effet les fabricants, importateurs et distributeurs de substances nanoparticulaires (ou contenant des nanoparticules ou destinées à en relarguer), à déclarer périodiquement la nature, les quantités, les usages, ainsi que l'identité des utilisateurs professionnels auxquels ils ont cédé ces produits à titre commercial ou gracieux. Le décret n° 2012-232 du 17 février 2012 précise que cette déclaration est à envoyer annuellement depuis le 1er janvier 2013 et concerne toute transaction de plus de 100 g de substance. L'arrêté du 6 août 2012 relatif à l'article R523-12 du code de l'environnement reprend enfin sans aménagement le seuil de 50% en nombre de particules au-dessus duquel une poudre est considérée comme nanoparticulaire.

2. Origine et applications

Notre environnement contient de nombreux nanomatériaux de diverses origines. On distingue les nanomatériaux naturels (issus d'incendies de forêts, d'éruptions volcaniques, virus, etc.), des nanomatériaux anthropogéniques (issus de l'action de l'Homme) (Oberdörster et al., 2005). Ces derniers peuvent être des sous-produits d'activités humaines diverses (incinérateurs, moteurs à combustion, friture, etc.) ou avoir été créés intentionnellement pour leurs propriétés intrinsèques. On

[2] Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux (2011/696/UE)

estime que les concentrations de nano-objets dans l'air ambiant vont de 10 000 particules/mL (en pleine nature ou dans un environnement de bureaux) à 700 000 particules/mL sur le tarmac des aéroports, en passant par quelques dizaines de milliers de particules/mL à proximité des routes, 600 000 particules/mL dans les boulangeries et 400 000 particules/mL au niveau des postes de soudage (Meier et al., 2015; Tardif et al., 2008).

Tableau 1 : Exemples d'applications de nanomatériaux manufacturés (ANSES, 2014).

Nanomatériaux	Applications	Exemples de produits finis
Nano-oxydes	Matériaux composites structuraux – Composants anti-UV – Polissage mécanochimique des substrats dans la microélectronique – Applications photocatalytiques, BTP	Additifs alimentaires, peintures, cosmétiques, encres, pneumatiques
Matériaux nanométalliques	Secteurs antimicrobiens et/ou de la catalyse – Couches conductrices des écrans, les capteurs ou encore les matériaux énergétiques	Pansements, films alimentaires, revêtements (réfrigérateur), plans de travail, vitres ou murs autonettoyant, vêtements, matériaux en contact de denrées alimentaires, emballages alimentaires ingérables
Noirs de carbone	Transports, BTP, imprimerie	Pneumatiques, encres, peintures
Matériaux nanoporeux	Aérogels pour isolation thermique dans les domaines de l'électronique, de l'optique et de la catalyse – Domaine biomédical pour des applications de type vectorisation ou encore implants	Membranes de filtration de l'eau, peintures, colles, fertilisants
Nanotubes de carbone	Nanocomposites conducteurs électriques – Matériaux structuraux – nanoélectronique, biomédical	Raquette de tennis, écran souple, pare-chocs, phares, batteries, pneumatiques
Nanomatériaux massifs	Transports, BTP, équipements sportifs	Revêtements durs – Composants structuraux pour l'industrie aéronautique, l'automobile, les conduites pour les industries pétrolières et gazières, le domaine sportif ou encore le secteur anticorrosion
Dendrimères	Domaines médical et cosmétique	Administration de médicaments, détection rapide
Quantum dots	Applications optoélectroniques (écrans)	Cellules photovoltaïques, encres et peintures pour applications de type marquage anti-contrefaçon
Fullerènes	Sport (nanocomposites) et cosmétiques	Mascaras, crèmes de beauté, balles de golf
Nanofils	Electronique, optoélectronique, photovoltaïque	Applications dans les couches conductrices des écrans ou encore les cellules solaires ainsi que les dispositifs électroniques

Si l'Homme cherche à créer des nanomatériaux, c'est parce-qu'ils présentent des caractéristiques très intéressantes sur le plan industriel et ouvrent les portes à de vastes domaines d'applications (Tableau 1) (ANSES, 2014). En effet l'échelle nanométrique confère à ces matériaux des propriétés parfois absentes à des échelles plus grandes. C'est le cas par exemple pour les nano-catalyseurs dont le pouvoir de catalyse provient en grande partie de l'immense surface d'échange procurée par l'échelle nanométrique (Figure 2), car plus le diamètre d'une nanoparticule est petit, plus la proportion de molécules en surface est élevée (Oberdörster et al., 2005). Cependant cette réactivité accrue ne se limite pas au monde inerte mais s'étend également au monde vivant et il peut aussi bien en découler

une action bénéfique que des effets toxiques. D'où la nécessité de caractériser l'effet des nanomatériaux sur les systèmes biologiques et en particulier sur la santé humaine. Les paragraphes suivants se concentreront plus particulièrement sur le cas des nanoparticules (NP).

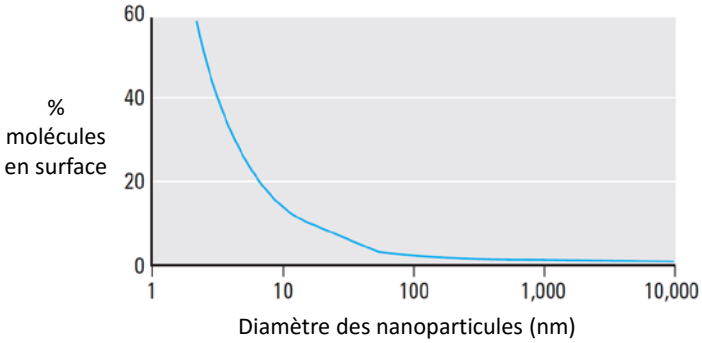


Figure 2 : Proportion de molécules en surface en fonction du diamètre des nanoparticules (Oberdörster et al., 2005).

B. Propriétés physico-chimiques des nanoparticules

Les propriétés des NP découlent de leurs caractéristiques physico-chimiques (Bruinink et al., 2015; Fu et al., 2014; Rauch et al., 2013):

- Composition chimique du cœur de la NP (exemple : TiO_2) et cristallinité (exemple : rutile/anatase)
- Enrobage : fonctionnalité chimique de surface (exemple : -COOH, polyéthylène glycol, etc.), couronne protéique, qui reflète les milieux biologiques traversés par la NP, et/ou nature et densité des éventuels ligands
- Taille, forme et surface spécifique, i.e. surface d'échange responsable de la réactivité, mesurée en m^2/g, qui augmente notamment avec la rugosité et la porosité du matériau
- Charge de surface, qui dépend du pH du solvant dans le cas d'une suspension colloïdale
- Etat d'agrégation/agglomération

On définit un agrégat comme un « ensemble de particules fortement liées ou fusionnées, dont l'aire de la surface externe résultante peut être significativement plus petite que la somme des aires de surface […] de chacun des composants » (norme ISO/TS 27687:2008). Les forces de liaison entre les particules d'un agrégat sont par exemple des liaisons covalentes ou résultant d'un « frittage ou d'un enchevêtrement physique complexe ». Les agrégats sont à distinguer des agglomérats (généralement plus gros, dans la mesure où un agglomérat peut être constitué de plusieurs agrégats). Dans le cadre d'un agglomérat, « l'aire de la surface externe résultante est similaire à la somme des aires de surface de chacun des composants ». Les forces mises en jeu sont également plus faibles que pour un agrégat, puisqu'il s'agit de forces de type Van der Waals ou liées à un enchevêtrement physique simple. Ces définitions découlant de la norme ISO/TS 27687:2008 rejoignent celles établies par la Commission Européenne[3].

Ces propriétés pourraient être résumées en deux caractéristiques : état de surface et état tridimensionnel. L'état de surface est le principal déterminant de la nature des réactions chimiques et biologiques pouvant être mises en jeu à cette interface. L'état tridimensionnel quant à lui conditionne

[3] Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux (2011/696/UE)

le mécanisme d'internalisation des NP dans les cellules (Bruinink et al., 2015), ainsi que la surface d'échange disponible pouvant donner lieu à une réactivité chimique ou biologique et donc le cas échéant le rendement catalytique des réactions catalysées. La réactivité biologique des NP dépend donc autant de leur état de surface que de leur état tridimensionnel et il est bien souvent difficile de distinguer la part respective de ces deux facteurs interdépendants (Magdolenova et al., 2012).

C. Le dioxyde de titane (TiO_2)

1. Propriétés physico-chimiques

Le dioxyde de titane (TiO_2 – CAS : 13463-67-7), aussi appelé oxyde de titane (IV), acide titanique anhydride, anhydride titanique ou blanc de titane, correspond à l'état d'oxydation le plus courant du Ti (Shi et al., 2013). Il s'agit d'un oxyde métallique de transition, se présentant sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau (il s'agit d'une des substances naturelles les moins hydrosolubles sur Terre (Jovanović, 2015)), non-combustible et non-odorante, de poids moléculaire 79,9 g/mol, point d'ébullition de 2972°C, point de fusion de 1843°C et densité de 4,26 g/cm^3 à 25°C. Son exploitation commerciale remonte au début du XXème siècle (Chen and Mao, 2007).

Le TiO_2 existe sous trois formes cristallines différentes (Figure 3 et Tableau 2) : anatase (tétragonale - la plus réactive), rutile (tétragonale - la plus stable jusqu'à 60 kbar) et brookite (orthorombique – non-produite industriellement à l'heure actuelle (Jovanović, 2015)) (Gupta and Tripathi, 2011; Di Paola et al., 2013; Skocaj et al., 2011). D'autres formes existent également mais sont beaucoup moins courantes, comme par exemple le TiO_2 (B) monoclinique (destiné à un marché de niche constitué principalement par la production de nanofils de TiO_2 (Jovanović, 2015)), ou encore des formes stables uniquement à très haute pression comme le TiO_2 (II) de structure PbO_2 ou le TiO_2 (H) hollanditique (Gupta and Tripathi, 2011). Quelle que soit la forme cristalline (anatase, rutile ou brookite), les mailles sont de forme octaédrique plus ou moins déformée.

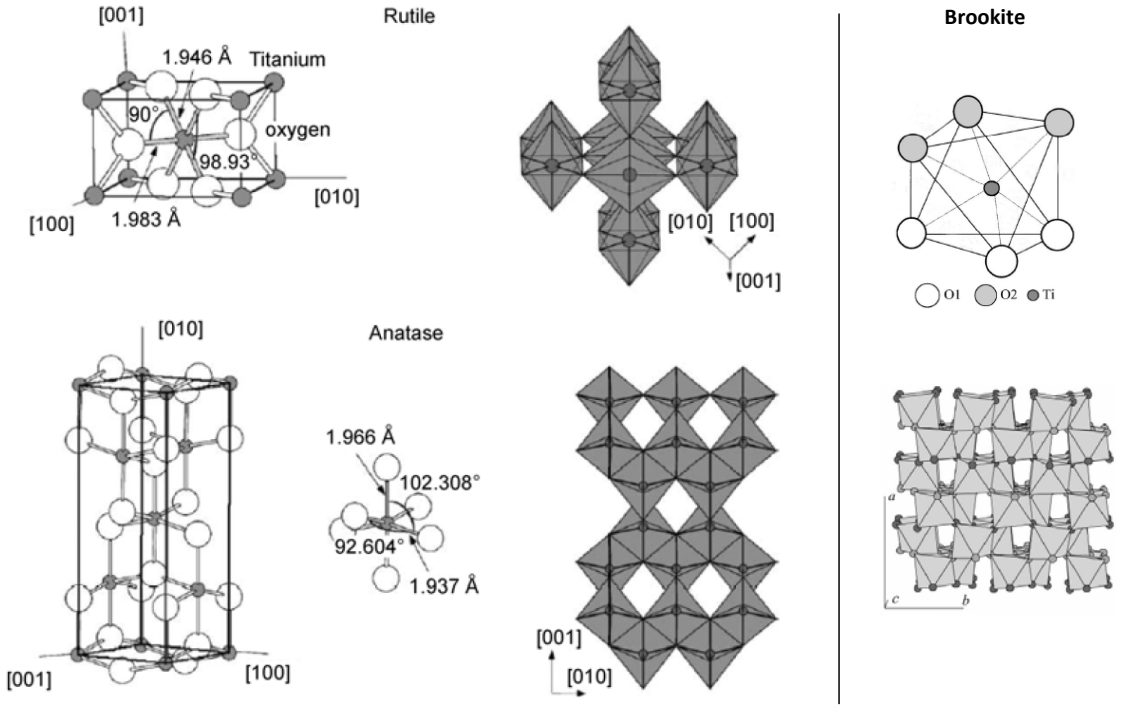


Figure 3 : Structures cristallines des différentes formes de TiO_2 (rutile, anatase et brookite) (Gupta and Tripathi, 2011; Di Paola et al., 2013).

Tableau 2 : Propriétés des différentes formes cristallines de TiO_2 (rutile, anatase et brookite) (Gupta and Tripathi, 2011).

Propriétés	Rutile	Anatase	Brookite
Structure cristalline	Tétragonale	Tétragonale	Orthorombique
Paramètres de maille (Å)	a = 4,5936 c = 2,9587	a = 3,784 c = 9,515	a = 9,184 b = 5,447 c = 5,154
Groupe d'espace	$P4_2/mnm$	$I4_1/amd$	Pbca
Nombre de molécules/maille	2	2	4
Volume/molécule ($Å^3$)	31,2160	34,061	32,172
Densité (g/cm^3)	4,13	3,79	3,99
Distance Ti-O (Å)	1,949 (4) 1,980 (2)	1,937 (4) 1,965 (2)	1,87-2,04
Angle O-Ti-O	81,2° 90,0°	77,7° 92,6°	77,0°-105°

Le titane représente le neuvième élément le plus abondant de la croûte terrestre (environ 4,4 g/kg) (Shi et al., 2013; Zhang et al., 2011). Le TiO_2 utilisé dans l'industrie est extrait de gisements constitués de différentes formes minérales de Ti, dont les principales sont le rutile (TiO_2, présent dans des sables de plages), l'ilménite ($FeO.TiO_2$ ou $TiFeO_3$, présent dans des sables de plage ou dans des roches dures) et le leucoxène (Fe_2O_3.nTiO2, produit de dégradation naturel de l'ilménite) (Zhang et al., 2011). Les gisements d'ilménite constituent les principales réserves mondiales de Ti (1300 tonnes) et devancent de plus de 10 fois les ressources naturelles de rutile (Itoh et al., 2006). L'extraction du TiO_2 est réalisée par un procédé utilisant des sulfates ou du chlore (Jovanović, 2015).

En présence de lumière d'énergie supérieure ou égale à la hauteur de la bande interdite du TiO_2, i.e. environ 3 eV / 400 nm (Di Paola et al., 2013), un électron (e^-) est promu de la bande de valence (correspondant aux orbitales 2p des O hybridées avec les orbitales 3d du Ti) à la bande de conduction (orbitales 3d du Ti), laissant derrière lui un trou de charge positive (h^+) (Gupta and Tripathi, 2011; Skocaj et al., 2011). Ces porteurs de charge (e^-/h^+) peuvent soit se recombiner, soit se retrouver piégés dans des défauts du réseau cristallin ou en surface et réagir avec des accepteurs/donneurs d'électrons (Chen and Mao, 2007). Cette photo-activation du TiO_2, qui peut être déclenchée par un large spectre lumineux (UV-A, B, C, ou encore rayons X), engendre la formation de radicaux hautement réactifs (•OH, etc.) capables d'oxyder les molécules organiques voisines (Chen and Mao, 2007; Gupta and Tripathi, 2011; Skocaj et al., 2011). Cette propriété de photocatalyse, qui augmente lorsque le diamètre des particules diminue (du fait de l'élévation de la surface spécifique d'échange), rend les NP de TiO_2 particulièrement appréciées dans l'industrie et en particulier les NP d'anatase, qui possèdent un pouvoir photocatalytique supérieur à celui des autres formes cristallines (Gupta and Tripathi, 2011; Shi et al., 2013; Skocaj et al., 2011).

En l'absence d'irradiation, le TiO_2 possède également une réactivité inversement proportionnelle à la taille des particules concernées, illustrée par exemple par le stress oxydant généré dans des cultures de cellules *in vitro* (Petersen and Nelson, 2010; Skocaj et al., 2011). Cependant les mécanismes réactionnels associés restent encore mal caractérisés.

2. *Utilisations du TiO_2 micro- ou nano-métrique*

La blancheur (maximale pour des particules de 200 nm de diamètre environ, soit 50% de la longueur d'onde moyenne de la lumière visible (Jovanović, 2015)), liée au fort indice de réfraction du TiO_2, font que cet oxyde métallique est utilisé dans de nombreuses industries comme agent de blanchiment (Shi et al., 2013). On en retrouve dans de nombreux produits de consommation courante (peintures,

pelliculages (de comprimés pharmaceutiques par exemple), plastiques, papiers, encres, produits alimentaires (bonbons, chewing-gums, lait, etc. – E171), cosmétiques (crèmes solaires en particulier), dentifrice, etc. Au total ce pigment est produit à plus de 4 millions de tonnes chaque année dans le monde (Figure 4) (sa production depuis 2010 ayant principalement lieu en Chine (Jovanović, 2015)) et représente 70% de la production totale de pigments (Shi et al., 2013). En outre le TiO_2 possède également des propriétés anticorrosives, d'où son utilisation dans les prothèses dentaires et articulaires (Bhola et al., 2011). Dans l'agroalimentaire le TiO_2 utilisé n'est généralement pas enrobé, alors qu'il l'est à 1-15% (en poids) dans les autres produits de consommation courante et ce principalement par des oxyhydrates, oxydes de silicone ou aluminium (Jovanović, 2015).

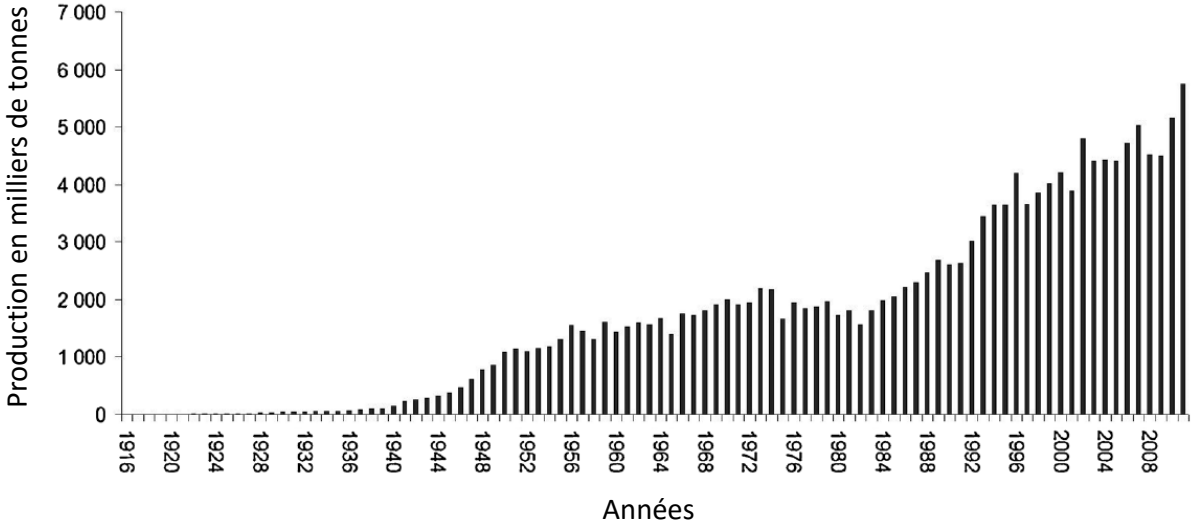


Figure 4 : Historique de production mondiale annuelle de TiO_2 (toutes tailles de particules confondues) entre 1916 et 2011 (Jovanović, 2015). Au total plus de 165 millions de tonnes de TiO_2 auraient été produites durant cette période.

Par ailleurs, à l'échelle nanométrique, le fort pouvoir photocatalytique des NP de TiO_2 promeut leur utilisation dans de vastes domaines (Gupta and Tripathi, 2011; Shi et al., 2013) :

- Energie : semi-conducteurs, cellules solaires nanocristallines, production d'hydrogène à partir d'eau
- Traitement d'eaux contaminées : minéralisation complète de polluants organiques aliphatiques, aromatiques, de polymères, pigments, surfactants, pesticides ou herbicides en CO_2, eau et acides minéraux, ne laissant ainsi aucun déchet solide et réduction de certains métaux comme Ag(I), Cr(VI), Hg(II) ou Pt(II)
- Assainissement d'air pollué : dégradation de polluants gazeux azotés tels que NO ou NO_x
- Matériaux autonettoyants ou anti-buée
- Nanomédecine (photosensibilisation dans le cadre de thérapies utilisant la lumière)
- Enfin la photo-activation du TiO_2 lui confère également des propriétés antibactériennes, pouvant être utilisées par exemple pour la stérilisation de cathéters médicaux.

On estime ainsi que la production annuelle de NP de TiO_2 est d'environ 3 800 - 7 800 tonnes aux USA : 9% des produits de consommation courante reconnus comme contenant des NP en contiendraient (Boland et al., 2014). La production mondiale annuelle de nano-TiO_2 avoisinerait 5% de la production totale de TiO_2, soit environ 300 000 tonnes/an (Jovanović, 2015).

3. Synthèse des nanoparticules de TiO_2

Les techniques de synthèse des NP de TiO_2 sont très diverses : sol-gel, micellaire, hydrothermale (en milieu aqueux), solvothermale (en milieu non-aqueux), dépôt de vapeur chimique (dont pyrolyse laser, plasma ou par vaporisation ultrasonique, etc.) ou physique (vaporisation laser, etc.), sonochimique ou par micro-ondes (900-2450 MHz) (Chen and Mao, 2007). Le choix de la méthode dépend des propriétés physico-chimiques désirées. Les techniques solvothermales permettent par exemple généralement de mieux contrôler la taille, forme et cristallinité des particules obtenues que la méthode hydrothermale. Quoi qu'il en soit, ces techniques de synthèse utilisent généralement les mêmes types de précurseurs, à savoir des sels métalliques inorganiques comme le $TiCl_4$ ou des alkoxides métalliques tels les tétraisopropoxyde/tétrabutoxyde de titane. Récemment des équipes ont également réussi à synthétiser des NP de TiO_2 grâce à des microorganismes, tels que des lactobacilles ou des levures, à partir de solutions de $TiO(OH)_2$ (Seabra and Durán, 2015).

4. Toxicité des nanoparticules de TiO_2

La grande réactivité des NP de TiO_2 leur confère de nombreuses applications industrielles. Mais le corolaire est qu'elle leur confère également une toxicité potentiellement plus élevée que pour les particules de taille supérieure, plus inertes (Shi et al., 2013). Par ailleurs du fait de leur petite taille, les NP ne partagent pas forcément les mêmes mécanismes d'entrée dans les systèmes biologiques que les particules plus grosses et pourraient être internalisées en plus grande proportion que celles-ci (Bruinink et al., 2015). Il en résulte une modification potentielle à la fois du danger et de l'exposition et donc du risque associé à la manipulation de ces nanomatériaux par rapport à leurs homologues non-nanométriques.

Du fait de la large gamme d'applications des (nano)particules de TiO_2, l'homme peut entrer en contact avec elles par inhalation, ingestion ou contact cutané (l'exposition par injection intraveineuse reste pour l'instant négligeable dans la mesure où les applications de ces (nano)particules en nanomédecine sont à ce jour limitées) (Shi et al., 2013). Les deux dernières voies d'exposition (ingestion et contact cutané) concernent plutôt les étapes d'utilisation du TiO_2 (en tant que pigment : alimentaire (composé d'environ 36% de NP (Weir et al., 2012)), cosmétique (taille moyenne inférieure à 50 nm (Dan et al., 2015)), etc.). L'exposition par inhalation est en revanche susceptible d'intervenir au cours de l'ensemble des étapes du cycle de vie de ces NP : lors de leur production, de leur utilisation (manipulation de poudres générant des aérosols, filtres solaires en spray, etc.) ou de leur fin de vie (aérosols générés par le vieillissement naturel ou le ponçage de peintures contenant des NP de TiO_2, etc.). Il s'agit de la première voie d'exposition de l'homme aux NP de TiO_2 en milieu professionnel (Shi et al., 2013).
Dans le cadre de cette étude, nous avons donc choisi d'étudier l'impact sur la santé humaine des NP de TiO_2 dans le contexte d'une exposition par inhalation.

II. Le tractus respiratoire humain

Depuis l'instant de notre naissance jusqu'à la mort, notre qualité d'être vivant est définie entre autres par notre capacité à respirer. Le but de la respiration consiste à extraire le dioxygène de l'air (O_2) pour le distribuer à nos cellules, afin que celles-ci l'utilisent pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate), et à évacuer le dioxyde de carbone (CO_2) généré par ce processus. La réalisation de cette fonction vitale est assurée par le système respiratoire, chargé de transporter l'air inspiré jusqu'à l'épithélium pulmonaire alvéolaire, où les échanges gazeux avec le système sanguin permettent le transfert de l'O_2 vers les cellules et l'export du CO_2.

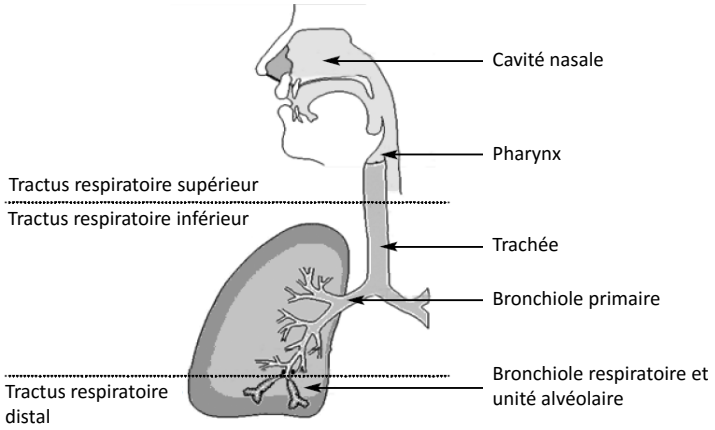
A. Structure générale du tractus respiratoire humain

Le tractus respiratoire humain est communément divisé en deux parties : la partie supérieure comprenant la cavité nasale et le pharynx et la partie inférieure constituée de la trachée et des poumons (Figure 5) (Mader, 2012). Lorsque l'air inspiré quitte la trachée, il est transféré dans les poumons via les bronches. Les bronches constituent un réseau de conduits aux ramifications de plus en plus étroites. Lorsque le diamètre de ces conduits devient inférieur ou égal à 1 mm, on ne parle plus de bronches, mais de bronchioles. Chacune d'entre elles mène à un espace fermé constitué d'une multitude de poches d'air appelées alvéoles.

Chaque poumon est enveloppé dans un sac constitué d'une bicouche membranaire appelée la plèvre (Mader, 2012). La plèvre pariétale adhère à la paroi de la cavité thoracique, alors que la plèvre viscérale adhère à la surface du poumon. Ces deux membranes sont maintenues entre elles par la tension de surface créée par le fluide séreux qu'elles sécrètent. L'ensemble permet l'accroche du poumon à la paroi thoracique. La structure des poumons n'est pas symétrique. Le poumon droit est constitué de trois lobes, alors que le gauche n'en a que deux, la place du troisième étant occupée par le cœur. Chaque lobe est divisé en lobules, desservis chacun par une bronchiole menant à de nombreuses alvéoles.

L'inspiration est à la fois un phénomène actif et passif (Mader, 2012). Elle débute par la composante active, à savoir la contraction du diaphragme, qui résulte en une augmentation du volume pulmonaire. Cela se traduit par une pression d'air pulmonaire inférieure à la pression atmosphérique. Par conséquent l'air extérieur est naturellement aspiré vers les poumons jusqu'aux alvéoles. L'expiration correspond au phénomène inverse, à la différence près qu'il s'agit cette fois-ci d'un processus purement passif, car déclenché par la relaxation du diaphragme.

L'ensemble de ce mécanisme repose sur le fait que le tractus respiratoire n'est jamais vide d'air (Mader, 2012). Au niveau des alvéoles, cette garantie est assurée par deux phénomènes. Tout d'abord les alvéoles sont recouvertes d'un liquide surfactant sécrété par certaines cellules épithéliales, qui a pour propriété d'abaisser la tension de surface. De plus lors de l'expiration, la pression entre les deux couches pleurales diminue, ce qui tend à maintenir les alvéoles ouvertes. L'ouverture des conduits d'air supérieurs est quant à elle assurée par des anneaux de cartilage qui rigidifient leur structure.



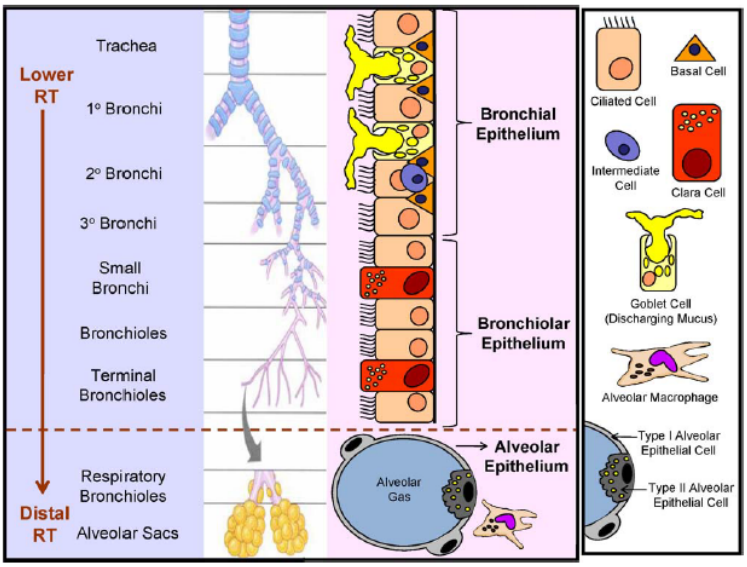


Figure 5: Structure générale du tractus respiratoire humain (BéruBé et al., 2010, 2009).

L'effet barrière et le bon fonctionnement des épithélia le long du tractus respiratoire (comme pour tous les épithélia dans l'organisme) dépendent également de l'étanchéité des jonctions entre cellules épithéliales (BéruBé et al., 2010) (Figure 6). Cette étanchéité est capitale pour le maintien de l'homéostasie entre les compartiments apicaux et basaux, ainsi que pour empêcher le passage de corps étrangers et/ou de pathogènes vers le compartiment endothélial.

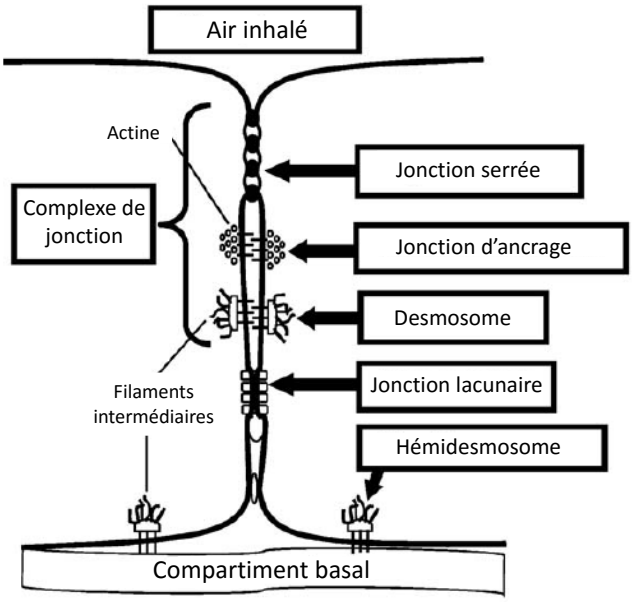


Figure 6 : Structure des jonctions inter-cellules épithéliales pulmonaires (BéruBé et al., 2010).

B. Mécanismes de clairance

Une des principales menaces pesant sur le système respiratoire est la possibilité de pollution de celui-ci par des corps étrangers (Tableau 3). Pour pallier à cela, plusieurs systèmes d'autodéfense existent (Mader, 2012). On les appelle communément "mécanismes de clairance". Ceux-ci diffèrent en fonction des zones du tractus respiratoire concernées, de la même façon que les types de particules déposées varient selon ces compartiments en raison des différents mécanismes physiques mis en jeu (Tableau

3). Le dépôt particulaire dans les voies respiratoires est en effet gouverné par trois phénomènes : l'impaction, la sédimentation et la diffusion (BéruBé et al., 2009). Le premier résulte de changements de direction de l'air circulant. Le second est une conséquence directe de la gravité, d'autant plus importante que la masse des particules concernées est élevée. Enfin la diffusion concerne principalement les particules ultrafines, qui sont en permanence soumises au bombardement aléatoire de molécules d'air. L'impaction et la sédimentation gouvernent la majorité des dépôts particulaires des cavités nasales aux bronches terminales, tandis que le dépôt alvéolaire dépend principalement de la diffusion.

Le premier système de clairance est constitué des poils naseaux, capables de piéger les petites particules telles que les poussières, spores, pollens, etc. (Mader, 2012). Les cavités nasales sont de plus recouvertes d'une couche de mucus, capable également de piéger les poussières et de les exporter vers le pharynx, où elles pourront être avalées ou expectorées en toussant ou en crachant.

La deuxième barrière est située au niveau de la trachée et des bronches (Mader, 2012). Cette dernière est tapissée d'un épithélium cilié et de cellules goblet. Les cellules goblet produisent du mucus, piégeant ainsi une partie des particules passant à travers la trachée et ce mucus est évacué dans le pharynx par les cils de l'épithélium. Cette évacuation est déclenchée par la toux, qui se traduit par une contraction de la trachée et une expulsion rapide de l'air vers l'extérieur, entraînant ainsi l'expulsion du mucus et des corps étrangers. L'ensemble constitue "l'escalator mucociliaire".

Cependant ces mécanismes de clairance cessent d'être efficaces lorsque la taille des particules inhalées passe en-dessous de 100 nm (Mader, 2012). Ces NP parviennent alors par diffusion jusque dans les alvéoles, où elles s'accumulent et peuvent endommager l'épithélium alvéolaire (Tableau 3). Le seul mécanisme de clairance actif au niveau alvéolaire implique la phagocytose des particules inhalées par des macrophages résidents et l'évacuation de ces macrophages par l'escalator mucociliaire (Oberdörster et al., 2005). Cette phagocytose est relativement rapide et intervient dans les 6-12 h suivant l'inhalation. Cependant l'élimination des macrophages par l'escalator mucociliaire est quant à elle beaucoup plus lente. Ainsi le temps de demi-vie des particules solides parvenues au niveau alvéolaire atteint 70 jours chez le rat et 700 jours chez l'homme. Par ailleurs il a été montré que la clairance par les macrophages est bien plus efficace pour les particules micrométriques que pour les particules de taille inférieure à 100 nm. D'où l'accumulation de ces dernières au niveau de l'épithélium alvéolaire, voire leur translocation vers d'autres organes via un passage à travers l'épithélium vers la circulation lymphatique ou sanguine. Ce passage est d'autant plus important si l'épithélium est endommagé, en particulier si les jonctions intercellulaires sont disjointes, car les NP peuvent alors se glisser entre les cellules.

Enfin quel que soit le niveau du tractus respiratoire atteint, les particules hydro/lipo-solubles ont la possibilité d'être dégradées, puis éliminées via la circulation sanguine ou lymphatique (Oberdörster et al., 2005).

Tableau 3 : Site de dépôt dans le tractus respiratoire des corps étrangers inhalés en fonction de la taille des particules (BéruBé et al., 2009).

Zone	Taille (µm)	Mécanisme de dépôt	Effets possibles
Nez	5-30	Impaction	Augmentation de la production de mucus
Pharynx	5-30	Impaction	Toux
Trachée/bronches primaires	1-5	Impaction et sédimentation	Endommagement de l'épithélium, toux, crachats, irritation, constriction
Bronches secondaires	2-3	Impaction et sédimentation	Idem ci-dessus
Bronches terminales	1-2	Impaction et sédimentation	Grave blessure de l'épithélium
Alvéoles	<1	Diffusion	Grave blessure de l'épithélium, œdème dû à la proximité des capillaires sanguins

C. L'épithélium alvéolaire

Les poumons contiennent environ 300-700 millions d'alvéoles, ce qui représente une surface d'échange d'environ 50-100 m² (BéruBé et al., 2009; Mader, 2012). C'est au niveau de ces alvéoles qu'ont lieu les échanges gazeux avec la circulation sanguine, par diffusion à travers l'épithélium alvéolaire dont l'épaisseur n'excède pas 100 nm (BéruBé et al., 2009).

L'épithélium alvéolaire est principalement constitué de deux types de cellules, nommées type I et type II (BéruBé et al., 2009). En complément cet espace contient également quelques macrophages et fibroblastes. Les fibroblastes se logent dans les interstices et agissent en tant que squelette de la structure alvéolaire. Les macrophages quant à eux se déplacent librement à la surface des alvéoles. Ils proviennent principalement du flux sanguin voisin ou de la réserve de macrophages alvéolaires à résidence permanente à la surface du lumen. Ils constituent une barrière vis à vis des poussières et autres corps étrangers inhalés, dont ils empêchent l'entrée dans le système sanguin. Les macrophages phagocytent ces particules afin qu'elles puissent par la suite être évacuées via l'escalator mucociliaire.

Les cellules alvéolaires de type I représentent 95% de la surface alvéolaire totale (BéruBé et al., 2009). Ce sont les cellules responsables des échanges gazeux avec le système sanguin. Elles disposent pour s'acquitter de cette fonction d'une morphologie fine et étalée. Elles sont par ailleurs incapables de se diviser.

Les cellules alvéolaires de type II représentent environ 5% de la surface alvéolaire totale (BéruBé et al., 2009). A l'inverse des cellules de type I, les cellules de type II ont une forme plutôt cuboïdale épaisse, bordée de microvillosités à leur surface apicale. Par conséquent même si elles ne couvrent que 5% de la surface alvéolaire totale, elles sont néanmoins plus nombreuses que les cellules de type I (Foster et al., 1998). Contrairement aux cellules de type I, les cellules alvéolaires de type II se divisent. Elles se différencient en cellules de type I ou II (BéruBé et al., 2009). Leur rôle principal est la sécrétion et le recyclage des corps lamellaires dans l'espace alvéolaire, qui contiennent le surfactant indispensable au maintien de la structure alvéolaire.

Ce surfactant, composé à 90% de lipides et 10% de protéines (Figure 7), agit en formant une couche mono-moléculaire à la surface de l'épithélium (BéruBé et al., 2009; Chroneos et al., 2010). L'interaction de ces protéines avec les phospholipides a pour conséquence de réduire la tension de surface et d'empêcher les alvéoles de se collaber lors de l'expiration. En outre il aide à maintenir la stérilité de la

barrière alvéolaire et intervient dans les réactions immunitaires de défense contre les pathogènes. En effet parmi les protéines qu'il contient (nommées SP-A/B/C/D), SP-A et SP-D ont la capacité d'adhérer aux pathogènes, de les endommager et de réguler la réponse immunitaire par phagocytose et/ou par activation/désactivation de réponses inflammatoires par les macrophages alvéolaires. De plus en plus de preuves tendent également à montrer un rôle similaire pour les protéines SP-B et SP-C, ainsi que pour certains constituants lipidiques du surfactant.

La composition et la quantité de surfactant disponible à tout instant dans l'espace alvéolaire sont contrôlées comme indiqué ci-dessus par les cellules alvéolaires de type II, mais également par les macrophages alvéolaires qui disposent eux-aussi de la capacité à le dégrader.

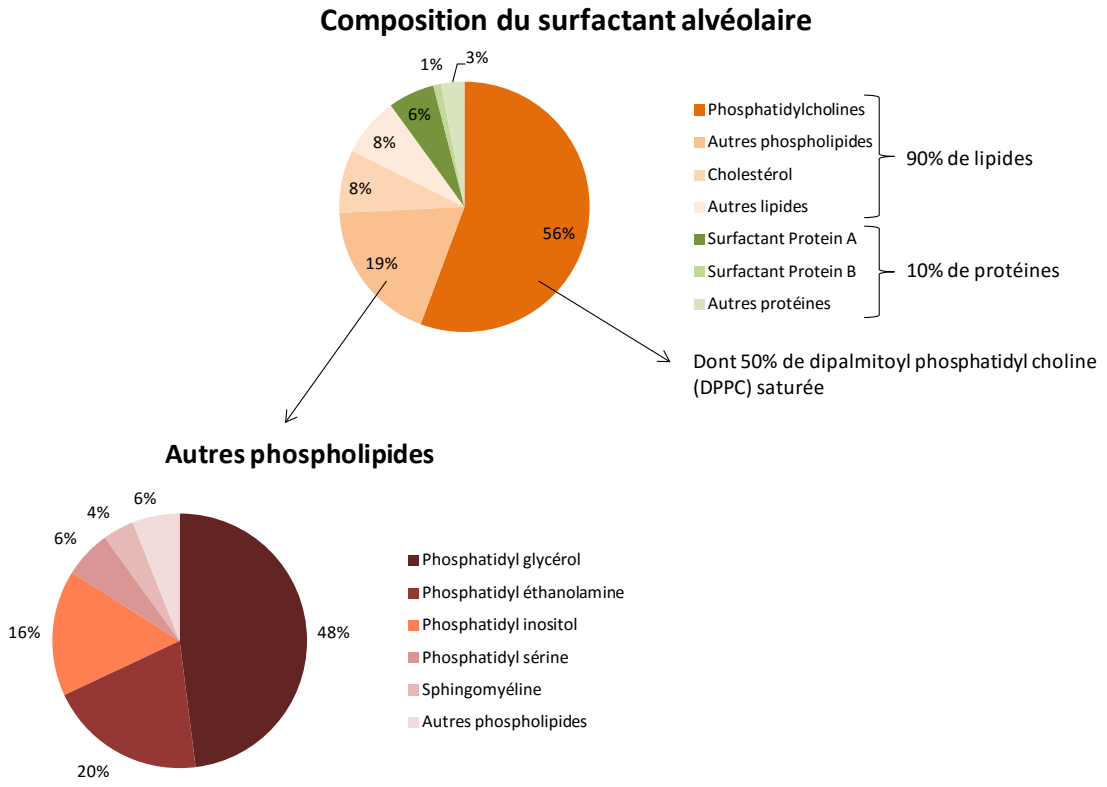


Figure 7 : Composition détaillée du surfactant alvéolaire (Chroneos et al., 2010).

III. De l'ADN aux protéines

A. Expression des gènes et production des protéines

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est une molécule présente dans toutes les cellules des organismes vivants. C'est la molécule porteuse de l'information génétique héréditaire, rendue célèbre par sa structure singulière en double-hélice, résolue en 1953 par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953) (Figure 8). Dans une cellule humaine, 99% de l'ADN total est situé dans le noyau (Kazak et al., 2012), le reste correspondant à l'ADN mitochondrial. A la différence de l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial est polyploïde et n'est transmis que par la mère. Qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, l'ADN est toujours constitué de deux brins de nucléotides reliés ensemble par des liaisons hydrogène, formant une hélice. Un nucléotide est composé d'un groupement phosphate, d'un sucre (désoxyribose) et d'une base aminée. Dans la nature, les bases de l'ADN peuvent être de quatre types différents :

adénine (A), thymine (T), guanine (G) ou cytosine (C). C'est entre ces différentes bases que se forment les liaisons hydrogène responsables de la structure en double-hélice de l'ADN. Une base A ne peut se lier qu'à une base T et une base G ne peut se lier qu'à une base C, ce qui signifie que les deux brins d'ADN appariés sont complémentaires et contiennent la même information.

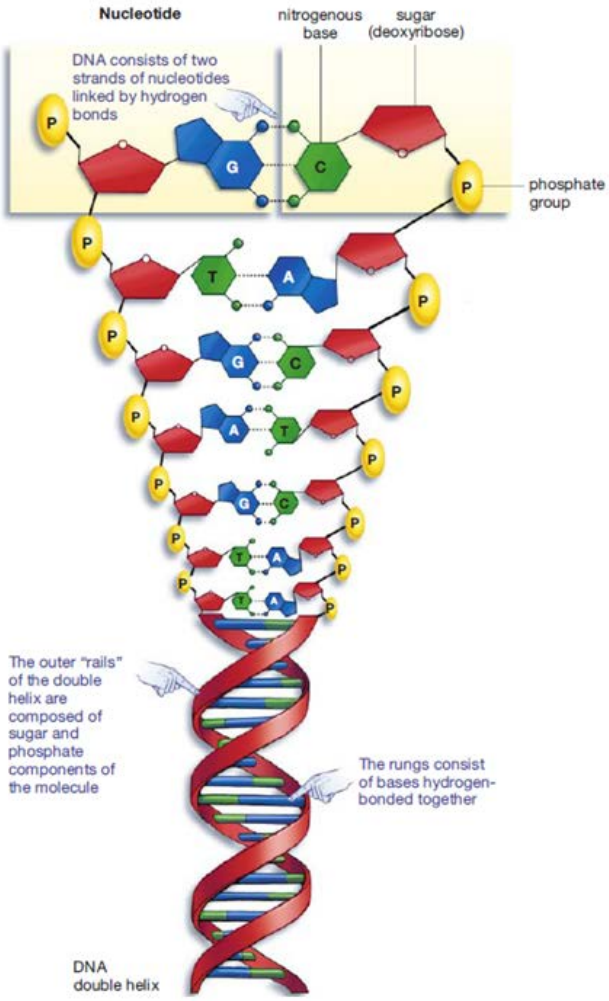


Figure 8: Structure de l'ADN en double-hélice (Krogh, 2011).

Selon le dogme central de la biologie moléculaire, chaque séquence d'ADN est divisée en segments, communément appelés gènes. La lecture ou l'expression de ces gènes passe par leur "transcription" en ARN (acide ribonucléique) messager (Mason et al., 2011). Lors de la transcription, un brin d'ADN est transcrit en un ARN messager (ARNm) complémentaire. La structure de l'ARNm est globalement similaire à celle de l'ADN, à la différence près que dans l'ARN la base T est remplacée par l'uracile (U) et le désoxyribose par le ribose. Par ailleurs l'ARNm, une fois détaché de son brin d'ADN matrice, présente une structure simple-brin et non double-brin.

Au cours de la transcription, cet ARNm est maturé par un processus appelé épissage, qui consiste en l'ablation de segments non-codants (Mason et al., 2011; Reece, 2011). Les segments codants sont nommés exons et les segments non-codants sont appelés introns. Cette nomenclature est aussi bien valable pour l'ARNm que pour l'ADN matrice.

Une fois l'ARNm maturé, celui-ci est exporté hors du noyau vers le réticulum endoplasmique, pour y être traduit en protéines via les ribosomes (Mason et al., 2011). L'assemblage linéaire des acides aminés d'une protéine constitue sa structure primaire. De cette séquence dépend sa structure secondaire, à savoir le premier niveau de repliement de ce ruban, enchainement d'hélices α et de feuillets β entrecoupé de boucles, rendu possible par la formation de liaisons hydrogène entre acides aminés d'une même région (Reece, 2011). Le repliement de ces structures secondaires, par le biais de liaisons hydrogène, ioniques, de ponts disulfures, d'interactions de Van der Waals et d'effets hydrophobes, définit la structure tertiaire. Pour finir, certaines protéines sont le résultat de l'assemblage de plusieurs sous-unités ayant chacune leurs propres structures primaire, secondaire et tertiaire. On parle dans ce cas de structure quaternaire. La formation des différents niveaux structuraux des protéines nécessite parfois l'intervention de protéines chaperonnes.

Enfin la fonctionnalité des protéines requiert souvent également l'addition sur leur squelette d'acides aminés de modifications post-traductionnelles. Il peut s'agir de l'addition de lipides, glycosylations, phosphorylations, etc. (Reece, 2011). L'ajout de ces groupements est pris en charge par une batterie d'enzymes spécialisées (kinases, glycosylases, etc.). Quel que soit son niveau, la structure d'une protéine est tout aussi importante pour sa fonctionnalité que sa séquence d'acides aminés ou ses modifications post-traductionnelles.

B. Régulation de l'expression génique

La régulation de l'expression des gènes passe par de nombreux mécanismes intervenant à différents niveaux du processus d'expression : les promoteurs et les régulateurs de transcription des gènes, les modifications de la chromatine et des histones, la méthylation de l'ADN, l'épissage alternatif, les micro-ARN, etc. (Krogh, 2011; Portela and Esteller, 2010).

1. Facteurs de transcription

La transcription de l'ADN en ARN est effectuée par un complexe protéique contenant entre autres une ARN polymérase. Pour que la transcription d'un gène débute, ce complexe doit se former et être dirigé vers le promoteur du gène en question (Mason et al., 2011). Les promoteurs sont de courtes séquences d'ADN précédant immédiatement les gènes. Ils servent de point d'accroche au complexe de transcription et indiquent le début de la séquence codante. Le recrutement du complexe de transcription au niveau du promoteur s'effectue par le biais de facteurs de transcription génériques. Cependant la transcription peut également être activée ou réprimée par des facteurs de transcription spécifiques du gène en question. Ces derniers fonctionnent en se fixant d'un côté sur le complexe de transcription et de l'autre sur une séquence d'ADN dite amplificatrice. A la différence des promoteurs, qui sont placés directement en amont des séquences codantes, les amplificateurs peuvent être situés beaucoup plus loin. Les facteurs de transcription spécifiques tirent parti de la capacité de l'ADN à se replier pour former des boucles et ainsi rapprocher spatialement les amplificateurs des promoteurs. La fixation des facteurs de transcription spécifiques sur le complexe de transcription est parfois médiée par des protéines que l'on appelle des co-activateurs. Chaque gène eucaryote ou presque constitue donc un cas particulier. Cette complexité présente l'avantage d'apporter beaucoup de flexibilité et de finesse à la régulation, ce qui permet à la cellule d'ajuster constamment ses taux de transcription en fonction des différents signaux qu'elle reçoit.

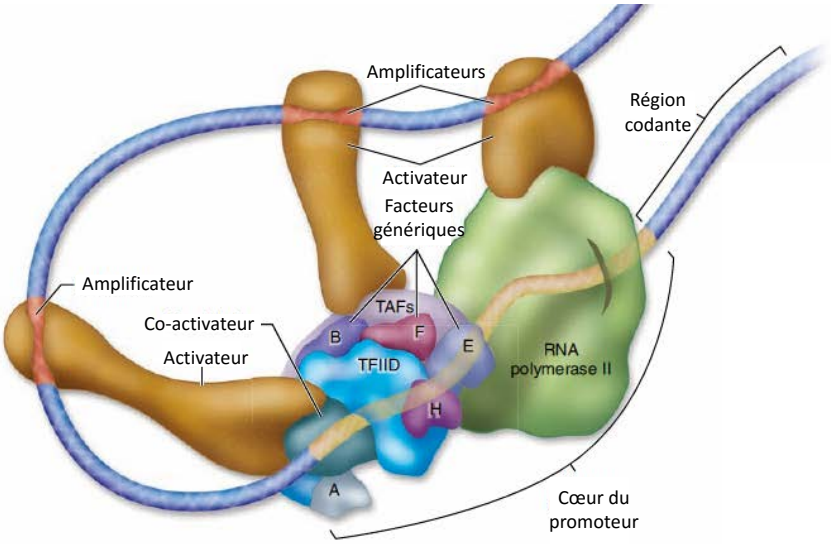


Figure 9 : Différents facteurs de transcription (Mason et al., 2011).

2. Modifications de l'état de la chromatine et des histones

La longueur du génome humain est telle que pour pouvoir tenir dans le noyau d'une cellule, l'ADN doit être condensé. Cette condensation a lieu à l'échelle des chromosomes. Ceux-ci ne sont composés que d'environ 40% d'ADN, le reste correspondant majoritairement à des protéines, ainsi qu'à de l'ARN en cours de transcription (Mason et al., 2011). L'ensemble constitue la "chromatine". La condensation de la chromatine se traduit tout d'abord par la formation à intervalle régulier de nucléosomes, c'est-à-dire d'enroulements de la double-hélice d'ADN autour de huit protéines imbriquées appelées histones. Pour être exact, un nucléosome correspond à 147 paires de bases enroulées en 1,65 tours autour du cœur d'histones et séparés entre eux par environ 50 paires de bases d'ADN libre (Portela and Esteller, 2010). Ces nucléosomes peuvent ensuite se compacter encore davantage en s'associant pour former des solénoïdes (Mason et al., 2011). Lorsqu'elle est ainsi condensée, la chromatine n'est pas transcrite. L'expression des gènes dépend donc de son état de condensation. On distingue ainsi l'hétérochromatine, correspondant aux régions non-exprimées, de l'euchromatine correspondant aux régions accessibles aux complexes de transcription et de réplication. Le passage d'un état à l'autre est gouverné par un large éventail de modifications post-traductionnelles des histones (acétylations, méthylations, phosphorylations, ubiquitinations, SUMOylations et ATP-ribosylations) (Smolkova et al., 2014). Les modifications les plus courantes sont les acétylations et méthylations sur les lysines, régulées grâce à des enzymes spécifiques. D'une manière générale, les acétylations ont pour effet d'ouvrir la chromatine pour permettre l'activation de la transcription. Le rôle des méthylations est plus complexe et peut se traduire par l'activation comme la répression de la transcription. L'ensemble de ces modifications conduirait à plus de 50 états chromatiniens différents, permettant ainsi une régulation fine de l'expression génique (Portela and Esteller, 2010).

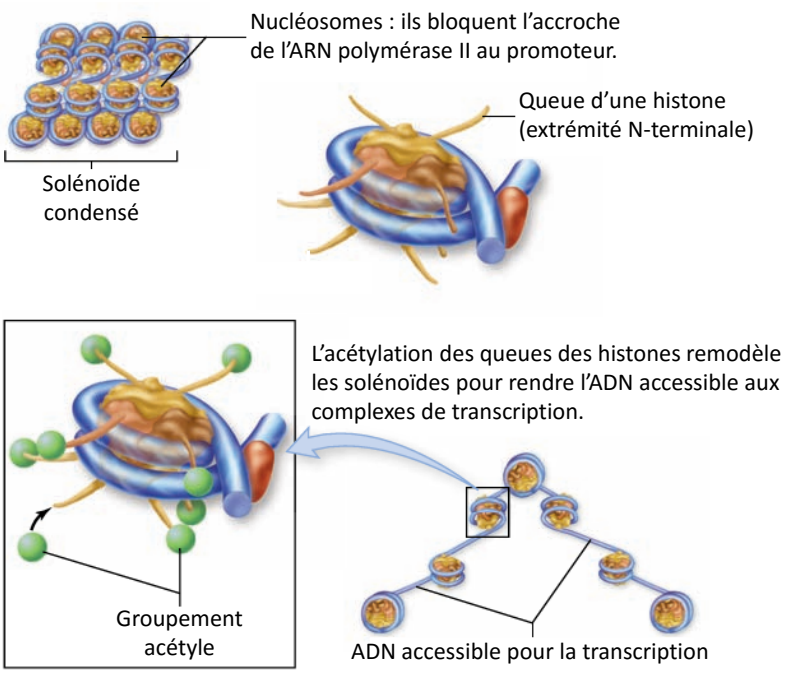


Figure 10: Modifications des histones affectant la structure de la chromatine (Mason et al., 2011).

3. *Méthylation de l'ADN*

Les histones ne sont pas les seules parties de la chromatine pouvant être méthylées. La méthylation de l'ADN joue également un rôle important dans la régulation de l'expression génique. Chez les mammifères, ces méthylations se retrouvent principalement sur les positions 5' des cytosines (Smolkova et al., 2014). D'une manière générale, les dinucléotides CpG disséminés de par le génome sont majoritairement méthylés, à l'exception de ceux situés dans les promoteurs ou dans le premier exon des gènes. La règle veut que la méthylation d'un promoteur supprime la transcription du gène concerné. Cette méthylation réversible est contrôlée par des enzymes spécifiques (DNA méthyltransférases - DNMT), qui catalysent le transfert des groupements méthyle entre la S-adénosyl-méthionine et l'ADN (Portela and Esteller, 2010). Les DNMT sont particulièrement exprimées en phase S du cycle cellulaire, c'est-à-dire au cours de la réplication de l'ADN, afin de méthyler l'ADN fraichement synthétisé. La méthylation de l'ADN joue aussi un rôle dans la régulation des différentes étapes du développement des organismes, ainsi que dans le maintien de l'intégrité génomique par la réparation de l'ADN (Lahtz and Pfeifer, 2011).

4. *Epissage alternatif*

Comme précisé précédemment, avant leur traduction en protéines, les séquences d'ARNm sont épissées pour en extraire les introns. Cependant pour une même séquence d'ARNm, ce processus n'est pas toujours effectué de la même manière. Il arrive parfois par exemple que des exons soient également excisés. Ainsi un même gène peut conduire à l'expression de différentes séquences peptidiques et donc de protéines différentes, ayant des rôles différents. Il semblerait que ce phénomène, appelé épissage alternatif, ait une importance capitale et que celle-ci croisse avec la complexité des êtres vivants (Krogh, 2011). A titre d'exemple, on estime actuellement que le génome humain contient entre 20 000 et 25 000 gènes. Or le nombre de protéines codées s'élève quant à lui à

plus de 68 000[4] (selon la base de données Uniprot). 94% des gènes humains seraient sujets à l'épissage alternatif, alors que ce ne serait le cas que pour 10% des gènes chez *C. elegans* (Krogh, 2011).

5. Interférence à ARN

Cependant les ARN recèlent encore de nombreuses particularités influençant l'expression des gènes. En effet dans certains cas, des séquences d'ARN provenant par exemple d'introns clivés peuvent se replier sur elles-mêmes et s'apparier pour former des boucles (Mason et al., 2011). Ces boucles sont prises en charge par une série d'enzymes ayant pour fonction de les exporter du noyau et d'exciser les zones non-appariées. Cet ARN double-brin est alors incorporé dans le complexe protéique RISC (RNA induced silencing complex) et les deux brins sont séparés. Le complexe résultant peut s'apparier avec des séquences d'ARNm plus ou moins complémentaires et cela a pour effet soit la dégradation de cet ARNm, soit l'inhibition de sa traduction en protéine (cas le plus fréquent chez les animaux).

Parmi les séquences d'ARN capables d'induire de telles interférences, on distingue les "miARN" et "siARN" (Mason et al., 2011). Les premiers proviennent le plus souvent de l'auto-appariement de courtes séquences d'ARN, et les ARN ciblés correspondent généralement à des gènes différents de leur gène d'origine. A l'inverse les siARN représentent à la base des séquences plus longues, présentant de grandes régions d'auto-appariement (il peut également s'agir de l'assemblage de deux ARN de sources différentes). Ces longs ARN double-brins sont clivés en plusieurs siARN, qui tendent à réprimer les gènes dont ils sont issus (ce qui les rend particulièrement utiles lorsque l'on souhaite inhiber artificiellement en laboratoire l'expression d'un gène donné). Par ailleurs les comparaisons inter-espèces montrent que les miARN sont bien plus conservés que les siARN.

On estime qu'environ 30% des gènes humains sont la cible d'ARN interférents (Tessitore et al., 2014).

6. Interaction des différents mécanismes de régulation de l'expression génique

L'expression des gènes est le résultat de l'interaction de l'ensemble des mécanismes décrits ci-dessus. Par exemple, outre gêner l'accroche des complexes de transcription, la méthylation de l'ADN peut également avoir des conséquences sur l'état local de la chromatine, inhibant ainsi encore plus la transcription (Portela and Esteller, 2010). Ce phénomène passe notamment par le recrutement et la stabilisation des histone méthyltransférases et des DNMT. Inversement l'incorporation de certaines histones "variantes" dans les nucléosomes (événement pouvant être provoqué en partie par l'action d'ARN interférents) peut avoir pour effet de protéger localement l'ADN de la méthylation. Par ailleurs certains complexes de remodelage de la chromatine sont également impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif de l'ARN.

D'autre part, la méthylation de l'ADN permet parfois l'interaction de séquences génomiques éloignées (voire situées sur des chromosomes différents), ce qui peut influencer l'expression génique (Portela and Esteller, 2010). Une des hypothèses pour expliquer l'adressage spécifique des DNMT vers les séquences à méthyler implique l'interférence à ARN. Enfin il a été montré que de nombreux co-activateurs transcriptionnels possèdent une activité histone acétyltransférase intrinsèque et qu'à l'inverse les corépresseurs transcriptionnels présentent souvent une activité histone désacétylase.

[4] http://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640, consulté le 29/04/2015

C. Régulation de l'activité des protéines par phosphorylation

A la différence des modifications post-traductionnelles par ajout de lipides ou par glycosylation, qui ont principalement lieu dans des organites bien définis (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi), les phosphorylations peuvent avoir lieu dans n'importe quel compartiment cellulaire. Elles sont réalisées par des enzymes spécifiques, que l'on nomme kinases. Alors que les ajouts de lipides ou les glycosylations servent principalement de signaux d'adressage des protéines vers différentes destinations, les phosphorylations correspondent à des régulations rapides de l'activité des protéines et impactent la quasi intégralité des processus cellulaires (Cohen, 2002). Elles peuvent avoir pour effet d'augmenter ou de diminuer l'activité biologique, de stabiliser une protéine ou de l'étiqueter en vue de sa destruction, de faciliter ou d'inhiber les transferts entre compartiments cellulaires, etc., et ce en initiant ou en perturbant des interactions protéine-protéine. Les protéines possédant des sites de phosphorylation répertoriés sont nommées phosphoprotéines. Chez l'homme, on estime que 30% environ des protéines sont phosphorylées (Cohen, 2002), ce qui si l'on admet le chiffre de 68 511 protéines humaines[5] (d'après la base de données Uniprot), représenterait environ 20 500 phosphoprotéines. En 2009 les bases de données de phosphoprotéomique rapportaient déjà approximativement 25 000 sites de phosphorylation portés par environ 7 000 protéines humaines (Lemeer and Heck, 2009). Cependant à un instant précis, chaque cellule n'exprime qu'une partie de ce (phospho)protéome (Boekhorst et al., 2011). Par ailleurs il est probable qu'une fraction de ces sites de phosphorylation corresponde à des erreurs d'attribution, qui représentent environ 1% des sites détectés dans chaque étude de phosphoprotéomique. Ces phosphorylations sont le fruit d'au moins 518 kinases (Manning, 2002) (538 selon la base de données KinBase[6]), dont l'activité est souvent également régulée par phosphorylation. Les phosphatases, qui catalysent la réaction inverse de déphosphorylation, sont quant à elle au nombre de 200 environ (Ubersax and Ferrell Jr, 2007) (228 actives et 11 inactives selon la base de données DEPOD[7]).

Les kinases catalysent le transfert du phosphate γ de l'ATP (adénosine triphosphate) vers la protéine substrat, libérant au passage une molécule d'ADP (adénosine diphosphate) (Ubersax and Ferrell Jr, 2007). Ce transfert ne se fait que vers 3 types d'acides aminés : les sérines (notées Ser ou S), thréonines (Thr ou T) ou tyrosines (Tyr ou Y). Dans le protéome humain, ces acides aminés représentent respectivement 79,3%, 16,9% et 3,8% du nombre total de résidus phosphorylés (et chez les eucaryotes ils représentent 8,5%, 5,7% et 3,0% des résidus totaux). Les kinases et phosphatases peuvent être divisées en trois groupes en fonction de leur spécificité à l'égard de ces acides aminés : Ser/Thr (environ 400 kinases et 40 phosphatases), Tyr (≈90 kinases et ≈100 phosphatases) et spécificité double (≈40 kinases et 50 phosphatases). On notera au passage que le nombre de kinases spécifiques des Ser/Thr est largement supérieur au nombre de phosphatases de même spécificité, alors qu'il est comparable pour les Tyr. Par ailleurs il semblerait que les kinases Ser/Thr aient une préférence nette pour les Ser, alors que les phosphatases Ser/Thr présentent quant à elles une préférence pour les Thr. Ces biais pourraient expliquer la prédominance des résidus Ser parmi les acides aminés phosphorylés.

D. Dégradation des protéines

Au cours de la vie d'une protéine, de nombreux facteurs peuvent avoir pour conséquence de lui faire perdre sa fonctionnalité de manière plus ou moins irréversible. C'est le cas notamment lorsque la

[5] http://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640, consulté le 29/04/2015
[6] http://kinase.com/web/current/kinbase/genes/SpeciesID/9606/, consulté le 29/04/2015
[7] http://www.koehn.embl.de/depod/index.php, consulté le 29/04/2015

protéine subit un stress conformationnel. Si cette déformation peut être réparée, la cellule active les protéines chaperones pour s'en charger. Mais si au contraire les dommages sont irréversibles, la protéine doit être dégradée. Le risque si elle ne l'est pas est qu'elle s'agrège avec d'autres protéines mal-conformées, ce qui peut mener à des pathologies comme par exemple la maladie d'Alzheimer (Lindquist and Kelly, 2011). La cellule dispose de deux systèmes pour dégrader ces protéines : le système ubiquitine protéasome (UPS) ou les lysosomes (Schmidt and Finley, 2014).

Les lysosomes servent principalement à dégrader les gros agrégats protéiques et même des organites entiers dans le cadre de l'autophagie (Glick et al., 2010). Il s'agit de vésicules cytoplasmiques contenant de nombreuses enzymes protéolytiques capables de digérer n'importe quelle structure cellulaire et d'en extraire les composants (acides aminés dans le cas des protéines), qui peuvent ainsi à nouveau servir à la synthèse de nouveaux objets biologiques.

Le système UPS prend plutôt en charge la dégradation des protéines régulatrices à durée de vie courte et des protéines solubles, non-agrégées (Schmidt and Finley, 2014). Contrairement à la dégradation lysosomale qui ne peut avoir lieu que dans les vésicules cytoplasmiques dédiées, la dégradation protéasomale peut intervenir à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, ce qui permet une dégradation rapide des protéines concernées (Kouranti and Peyroche, 2012). Les protéines sont d'abord étiquetées par l'ajout d'une chaîne comportant au moins 4 maillons d'ubiquitine, ce qui leur permet d'être ensuite adressées vers le protéasome, un complexe protéique ayant pour rôle de les dégrader (Schmidt and Finley, 2014). L'ajout de ces motifs ubiquitine est réalisé via l'action de trois types d'enzymes : les « ubiquitin-activating enzymes » (E1), « ubiquitin-conjugating enzymes » (E2) et enfin les « ubiquitin ligases » (E3). Le protéasome comporte plusieurs sous-unités, chacune étant responsable d'une activité protéolytique particulière. On distingue ainsi trois activités enzymatiques : l'activité « chymotrypsin-like », responsable du clivage au niveau des résidus hydrophobes, l'activité « trypsin-like », résultant en un clivage au niveau des résidus basiques, et enfin l'activité « caspase-like », en charge du clivage après les résidus acides.

Cependant l'action du système UPS ne se limite pas à la dégradation des protéines mal conformées. En effet, du fait de son action ubiquitaire dans l'ensemble des compartiments cellulaires, il intervient également dans la régulation de nombreux processus biologiques, comme par exemple la réparation de l'ADN (Kouranti and Peyroche, 2012). Il peut permettre à ce titre de libérer des espaces (nucléotidiques par exemple) encombrés et inaccessibles aux protéines de réparation par dégradation des protéines responsables de l'encombrement. Ce système peut également permettre de dégrader des protéines intervenant dans un processus biologique, afin que les protéines aval dans le processus puissent agir à leur tour.

IV. Dommages à l'ADN et systèmes de réparation

A. Des agents génotoxiques aux lésions de l'ADN

L'ADN, entité porteuse de notre information génétique, est une molécule fragile. Elle subit quotidiennement un très grand nombre d'agressions, de sources endogènes ou exogènes (Hoeijmakers, 2001). Les sources exogènes de lésions de l'ADN sont d'origines multiples. Il peut s'agir du rayonnement UV, de radiations ionisantes, ou encore d'agents chimiques dits « génotoxiques ». A titre d'exemple, l'exposition au soleil à l'heure de midi engendre l'équivalent de 100 000 lésions par cellule et par jour (Tableau 4). Parmi les sources endogènes, le stress oxydant généré par le métabolisme énergétique des cellules mène à l'apparition de lésions oxydatives (exemple : 8oxodG)

et/ou de cassures simples-brins. On estime que ce facteur engendre plusieurs dizaines de milliers de cassures simples-brins par cellule et par jour (Wallace, 2014). Les liaisons covalentes de l'ADN peuvent également s'hydrolyser spontanément et mener entre autres à l'apparition de sites abasiques, ou encore à la transformation respective des bases C, A, G ou 5-méthyldC en uracile, hypoxanthine, xanthine et thymine, entraînant par là-même des erreurs de transcription et de réplication.

Tableau 4 : Exemples de taux de lésions de l'ADN générées par des agents génotoxiques endogènes ou exogènes (Ciccia and Elledge, 2010).[a]

Lésions endogènes	Types de lésions	Lésions/cellule/jour	
Dépurination	Site abasique	10 000	
Désamination des cytosines	Bases de transition	100-500	
Méthylation par SAM	3meA	600	
	7meG	4 000	
	O^6meG	10-30	
Oxydation	8oxodG	400 - 1 500	
Lésions exogènes	**Dose d'exposition (mSv)**	**Types de lésions induites**	**Lésions/cellule**
Soleil au zénith	-	Dimères de pyrimidines, photoproduits 6-4	100 000 par jour
Fumée de cigarette	-	Adduits aromatiques	45 – 1 029
Rayons X (poitrine)	0,02	Cassures doubles-brins	0,0008
Rayons X (dents)	0,005	Cassures doubles-brins	0,0002
Mammographie	0,4	Cassures doubles-brins	0,016
Angioplastie coronaire	22	Cassures doubles-brins	0,88
Traitement ^{131}I	70-150	Cassures doubles-brins	2,8-6
Radiothérapie	1 800 – 2 000	Cassures doubles-brins	72-80
Voyage en avion	0,005 par heure	Cassures doubles-brins	0,0002 par heure
Mission spaciale (60 jours)	50	Cassures doubles-brins	2
Accident de Tchernobyl	300	Cassures doubles-brins	12
Bombes atomiques d'Hiroshima et Nagasaki	5 – 4 000	Cassures doubles-brins	0,2-160

[a]« SAM » : s-adénosylméthionine, « 3meA » : 3-méthyladénine, « 7meG » : 7-méthylguanine, « O^6meG » : O^6-méthylguanine, « 8oxodG » : 8oxodGuanine.

Les conséquences de ces lésions de l'ADN sont multiples et le plus souvent délétères (Hoeijmakers, 2001). A court terme, elles peuvent mener à l'arrêt du cycle cellulaire, afin de permettre la réparation de l'ADN lésé, ou encore à la mort cellulaire par apoptose si la quantité de lésions est trop importante pour être réparée. A long-terme, la non-réparation et l'accumulation de ces lésions engendre des mutations, qui si elles s'accumulent peuvent entraîner l'apparition de tumeurs.

B. Réponses aux dommages à l'ADN et systèmes de réparation

1. Les différents systèmes de réparation de l'ADN

La réparation de l'ADN se décline en plusieurs voies, en fonction de la nature des lésions à réparer et de l'étape du cycle cellulaire (Figure 11). Ces différentes voies sont détaillées dans les paragraphes suivants.

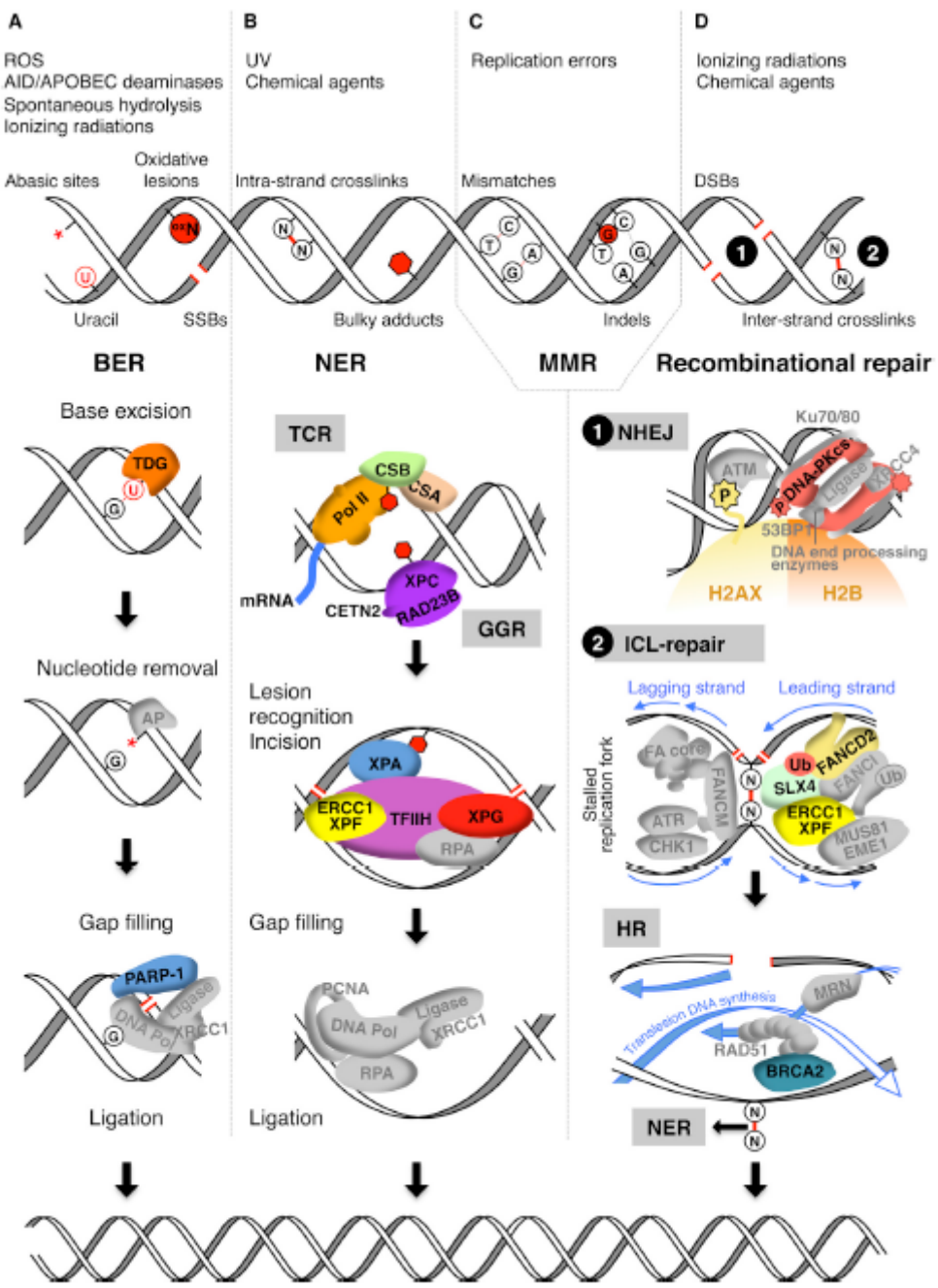


Figure 11 : Schéma récapitulatif des principales voies de réparation de l'ADN chez les mammifères (Fong et al., 2013).

a. Réparation par excision de bases

La voie de réparation par excision de base, appelée BER (Base Excision Repair), est spécialisée dans la réparation des lésions de l'ADN n'affectant qu'un seul brin et n'induisant pas de distorsion majeure de la double hélice (Hegde et al., 2008). Il s'agit en grande partie des dommages induits par le stress oxydant, associé au métabolisme énergétique de la cellule ou issu d'autres sources (Hoeijmakers, 2001). Cette voie est divisée en deux sous-voies, appelées « short-patch BER » et « long-patch BER » (Figure 12). D'une manière générale, la première prend en charge les petites altérations chimiques affectant les bases de l'ADN (méthylations, désaminations, sites abasiques, lésions oxydatives de type 8oxodG, etc.), tandis que la seconde se charge de la réparation des cassures simples-brins allant

jusqu'à une dizaine de nucléotides. Cependant de nombreuses passerelles existent entre ces sous-voies (Hegde et al., 2008).

Dans le short-patch BER, les bases altérées sont identifiées et excisées par une batterie de glycosylases spécialisées en fonction de la structure des dommages (Tableau 5). A titre d'exemple, la glycosylase OGG1 se charge des bases oxydées de type 8oxodG ou formamidopyridine-G, UNG gère les incorporations d'uracile dans l'ADN et NTH1 s'occupe des bases thymine glycol et 5-formylU (Hegde et al., 2008). La résultante de la coupure de la base modifiée est un site abasique.

Tableau 5 : Glycosylases intervenant dans le BER (Hegde et al., 2008).[a]

E. coli			Humain		
Symbole	Type	Substrats privilégiés	Symbole	Type	Substrats privilégiés
Ung	Monofonctionnelle	Uracile	UNG	Monofonctionnelle	Uracile
			SMUG1	Monofonctionnelle	Uracile
			TDG	Monofonctionnelle	U et T, face à G
Tag. AlkA	Monofonctionnelle	3meA	MPG	Monofonctionnelle	3meA, hypoxanthine
MutY	Monofonctionnelle	A face à 8oxodG	MYH	Monofonctionnelle	A face à 8oxodG
EndoIII (Nth)	Bifonctionnelle (β-lyase)	5-OHC, 5-OHU, Tg	NTH1	Bifonctionnelle (β)	Tg, 5-formylU
			OGG1	Bifonctionnelle (β)	8oxodG, Fapy-G
EndoVIII (Nei)	Bifonctionnelle (β-lyase)	Tg, 5-OHU	NEIL1	Bifonctionnelle (βδ)	Fapy-A (-G), Tg, 5-OHU
	Bifonctionnelle (β-lyase)	8oxodG, Fapy-G (-A)	NEIL2	Bifonctionnelle (βδ)	Hydantoïne (Sp, Gu), 5-OHU

[a] « 3meA » : 3-méthyladénine, « 8oxodG » : 8oxodGuanine, « Sp » : spiriminohydantoïne, « Gu » : guanidinohydantoïne, « Tg » : thymine glycol, « Fapy » : formamidopyridine.

Ces glycosylases peuvent être mono ou bi-fonctionnelles. Lorsqu'elles sont monofonctionnelles, l'AP-endonucléase 1, i.e. APE1, se charge de l'excision du site abasique, afin d'obtenir des extrémités « propres » 3'OH et 5' désoxyribose phosphate (dRP), permettant ainsi à la polymérase POLβ (qui possède une activité dRP lyase intrinsèque) de remplacer le nucléotide manquant, tout en clivant le résidu dRP pour générer un 5' phosphate (P). Cette interaction de POLβ avec le site abasique pourrait entre autres être stabilisée par p53 (Bernstein et al., 2002). La ligation est enfin assurée par le complexe XRCC1-LIG3 (Hegde et al., 2008). Cependant si cette étape de ligation intervient trop tôt, avant que l'extrémité 5'-dRP ait été remplacée par une 5'-P, la ligation peut réussir ou être avortée en ayant transformé le 5'-dRP en 5' – adénosine monophosphate (AMP) (Rass et al., 2007). La protéine APTX permet alors de retransformer le 5'-AMP en 5'-dRP afin de reprendre le processus de réparation normal.

Les glycosylases bifonctionnelles (c'est le cas par exemple des enzymes comme OGG1 chargées de l'excision des bases oxydées), possèdent une activité AP-lyase intrinsèque qui permet l'incision du brin endommagé sans l'intervention d'APE1 (Hegde et al., 2008). Toutefois l'action d'APE1 ou de PNK (i.e. Poly Nucleotide Kinase) est toute de même requise pour « nettoyer » les extrémités 3' et 5', afin d'obtenir des extrémités 3'OH et 5'-P reconnaissables par une polymérase pour la synthèse du nucléotide manquant avant la ligation par XRCC1-LIG3. Pour le nettoyage des extrémités 5' et 3' après

l'action d'une telle glycosylase bi-fonctionnelle, on distingue deux cas de figure. Certaines de ces glycosylases (exemple : OGG1, NTH1) procèdent par β-élimination, laissant de ce fait une extrémité 3' couplée à un produit de déshydratation d'un aldéhyde α,β-insaturé, ainsi qu'une extrémité 5' phosphate. Le nettoyage est dans ce cas pris en charge par APE1. Si en revanche la glycosylase bi-fonctionnelle réalise une βδ-élimination (exemple : NEIL1/2), les deux extrémités se retrouvent couplées à un phosphate et le nettoyage est effectué par PNK.

Les cassures simples-brins réparées par le BER peuvent avoir plusieurs origines. Elles peuvent être la conséquence du stress oxydant via la dégradation d'un sucre oxydé, mais aussi résulter de l'action du BER, ou encore de l'activité d'enzymes comme la DNA topoisomérase 1 (TOP1), chargée de désenrouler l'ADN lorsque la structure de celui-ci a été modifiée par la réplication ou la transcription (Caldecott, 2014). Elles peuvent aussi être le résultat de l'incorporation erronée de ribonucléotides dans l'ADN, qui déclenche, via RNaseH2 ou via l'action avortée de TOP1, l'apparition de cassures simples-brins (Caldecott, 2014). Enfin les protéines des familles APOBEC et TET, impliquées respectivement dans l'édition des acides nucléiques et la méthylation de l'ADN, peuvent également déclencher de façon erronée les étapes du BER menant à l'apparition de cassures simples-brins.

Dans le long-patch BER, la cassure simple-brin est détectée par PARP1 (ou PARP2 en cas de problème avec PARP1), qui s'attache au niveau de la cassure, ainsi qu'à d'autres protéines cibles (comme par exemple p53 ou les histones environnantes), des chaînes ramifiées de plusieurs centaines d'ADP-riboses (Bernstein et al., 2002; Caldecott, 2014; Wallace, 2014). Les charges négatives portées par cette chaîne d'ADP-riboses contribuent à l'ouverture de la chromatine autour de la lésion, ce qui facilite l'accès des protéines réparatrices. PARP1 recrute ensuite XRCC1 (protéine stabilisatrice des complexes de réparation) sur le lieu de la cassure. Les extrémités du brin lésé sont alors « nettoyées », afin de permettre la resynthèse d'ADN par POL-δ/ε via PCNA (Hoeijmakers, 2001). Le nettoyage des extrémités 3' et 5' est effectué selon leur état par PNK, APE1, POLβ, APTX ou TDP1. PNK et APE1 se chargent des extrémités 3' retrouvées dans la plupart des cassures simples-brins engendrées par le stress oxydant, à savoir les 3'-phosphate et 3'-phosphoglycolate respectivement. Comme précisé plus haut, APE1 est également capable de transformer les 3'-aldéhydes α,β-insaturés en 3'OH et POLβ permet la transformation des 5'-dRP en 5'-P. Les extrémités générées par l'action de TOP1 sont nettoyées par TDP1 et les 5'-AMP (issues d'une tentative de ligation trop précoce) par APTX. Enfin APTX semble également prendre en charge le nettoyage des 5'-ribonucléotides résultant de l'activité de RNaseH2. A l'issue de ce nettoyage, FEN1 excise l'oligonucléotide endommagé et la ligation est réalisée par LIG1.

Dans certains cas, le short-patch BER fusionne avec le long-patch BER à l'étape de resynthèse d'ADN, qui s'étend alors quelques nucléotides au-delà de la position initialement endommagée (Hegde et al., 2008; Hoeijmakers, 2001). C'est le cas notamment lorsque l'activité dRP lyase de POLβ est inefficace et que le nucléotide manquant est ajouté sans excision du sucre de l'extrémité 5' (Wallace, 2014). Celui-ci sera alors finalement éliminé lors de l'excision par FEN1 de l'oligonucléotide remplacé. Inversement le long-patch BER peut lui aussi rejoindre le short-patch lors de cette même étape de resynthèse d'ADN. Cela implique que POLβ soit capable d'intervenir, c'est-à-dire éventuellement de transformer un 5'-dRP en 5'-P, puis de synthétiser les nucléotides manquants.

Des études structurales ont permis de mettre en évidence le fait que l'excision des bases endommagées et l'incision du brin à réparer (étapes respectivement réalisées par les glycosylases avec/sans l'aide d'APE1) passe par la condensation du squelette de l'ADN et l'incorporation de la base

dans le site actif des protéines réparatrices (Wallace, 2014). La forme B de la structure de l'ADN est maintenue par l'insertion d'acides aminés venant se loger à la place de la base extrudée. Il semblerait que ces acides aminés « de remplissage » interagissent avec la base complémentaire orpheline. NTH1 et NEIL1/2 paraissent toutefois faire exception à cette règle.

Dans une variante du BER, appelée Nucleotide Incision Repair (NIR), APE1 incise le brin endommagé en amont des lésions oxydatives, laissant des extrémités 3'OH et 5'P à côté des nucléotides lésés et la suite de la réparation est prise en charge par le long-patch BER (Ischenko and Saparbaev, 2002; Wallace, 2014).

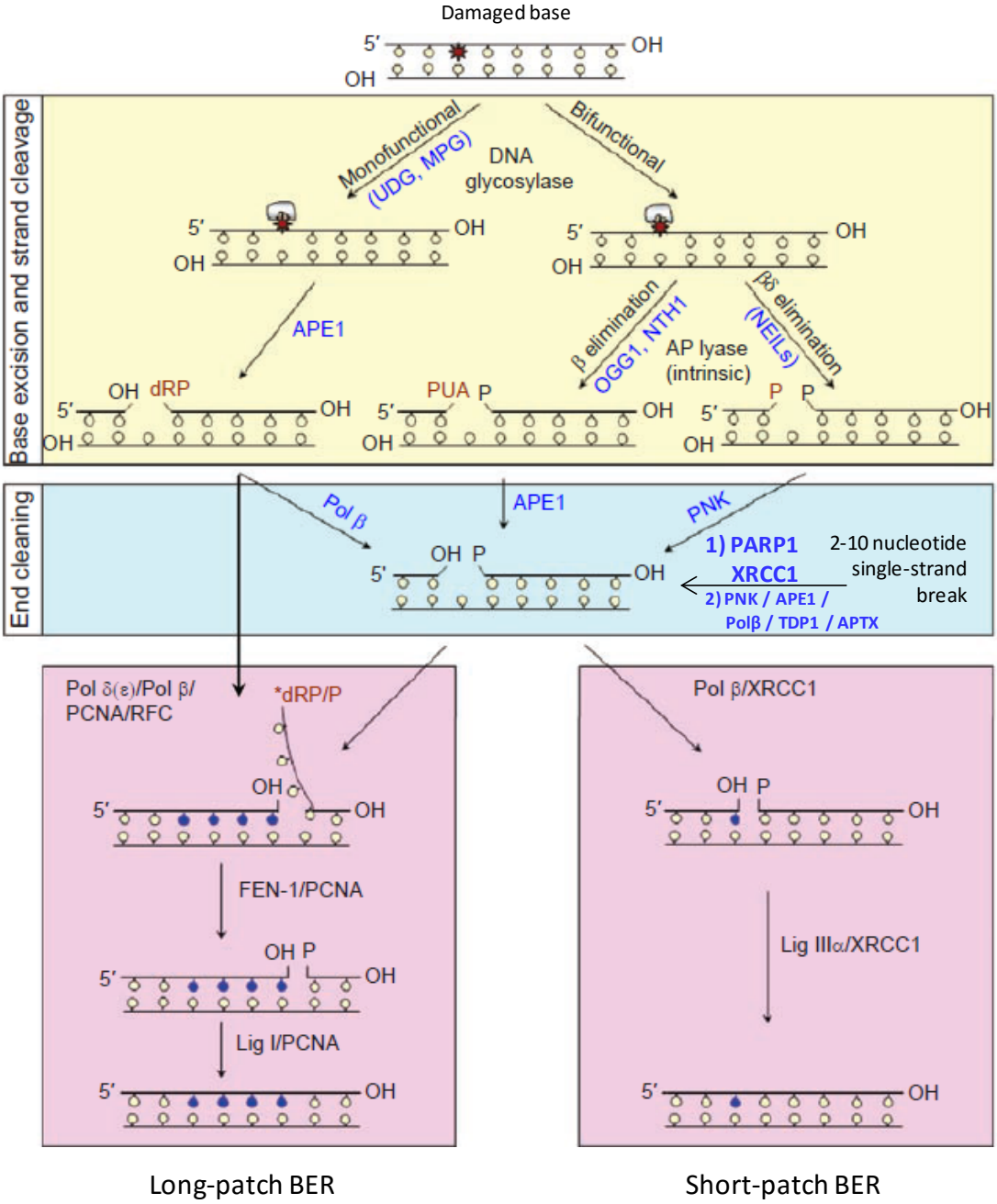


Figure 12 : Schéma du mécanisme de la voie BER (Hegde et al., 2008).

b. Réparation par excision de nucléotides

A la différence du BER, la réparation par excision de nucléotides, appelée NER (Nucleotide Excision Repair), prend en charge la réparation de lésions volumineuses entraînant une distorsion majeure de la double-hélice et affectant un seul des deux brins (Bernstein et al., 2002). Cela inclut par exemple les dimères cyclobutane de pyrimidines, les photoproduits (6-4) engendrés par l'exposition aux UV, ou encore les adduits générés par les agents génotoxiques thérapeutiques tels que le cisplatine ou l'oxyde 4-nitroquinoline. Le NER est constitué de quatre grandes étapes : la reconnaissance des dommages accompagnée d'une activité hélicase, le désenroulement local, l'excision du nucléotide endommagé et enfin la synthèse et ligation (Fousteri and Mullenders, 2008). Cette voie de réparation est divisée en deux sous-voies : le « global-genome » (GG) NER et le « transcription-coupled » (TC) NER (Bernstein et al., 2002). La seconde est spécialisée sur la réparation des lésions situées dans des zones du génome en cours de transcription et bloquant celle-ci, tandis que la première agit sur l'ensemble du génome et plus particulièrement en l'absence de transcription des régions concernées.

La différence entre les deux mécanismes réside dans la première étape, c'est-à-dire l'identification de la lésion, ainsi que l'activité hélicase (Kamileri et al., 2012; Scharer, 2013). Dans le GG-NER, cette étape est réalisée par le complexe constitué des protéines XPC, hHR23B et CETN2, avec parfois l'aide de XPE (DDB1/2) pour la détection des dimères cyclobutane de pyrimidines. Dans la majorité des cas, la lésion est principalement détectée par XPC, via son affinité pour les régions à l'appariement distordu (Petruseva et al., 2014) et hHR23B (ou hHR23A) sert à stabiliser XPC (Kamileri et al., 2012; Scharer, 2013). Dans le TC-NER en revanche, la polymérase bloquée RNAPII reste associée au brin d'ADN endommagé et recrute CSA (complexe contenant notamment DDB1) et CSB (qui est stabilisée par la protéine UVSSA). CSA/B recrutent ensuite HMGN1 et XAB2 (XPA binding protein 2), ainsi que le facteur de transcription TFIIS. La suite du mécanisme de réparation est commune aux deux sous-voies.

Le désenroulement de l'ADN autour de la lésion est réalisé par le facteur de transcription TFIIH, associé dans un complexe contenant XPD/B (protéines dotées respectivement d'une activité 5'->3' et 3'->5' hélicase), CAK (qui se dissocie rapidement des autres protéines) et XPG (Bernstein et al., 2002; Kamileri et al., 2012). L'activité ATPase de XPB permet la formation d'une bulle de 27 nucléotides autour de la lésion. XPA, RPA, XPB et XPD stabilisent l'ADN endommagé en vue de son incision. RPA active ensuite XPG et ERCC1-XPF, afin que ceux-ci clivent les extrémités 3' et 5' du fragment de 24-32 nucléotides contenant la lésion. Le trou simple-brin ainsi généré est comblé par l'action d'une polymérase (δ, ε ou κ), dont l'activité est stimulée et contrôlée par PCNA (protéine ayant été recrutée par RFC/A). La ligation finale est réalisée par le complexe LIG3-XRCC1 ou FEN1-LIG1 (Iyama and Wilson, 2013). Il a été montré que LIG1 et POLε n'interviennent que dans le cas de cellules non-quiescentes (Scharer, 2013).

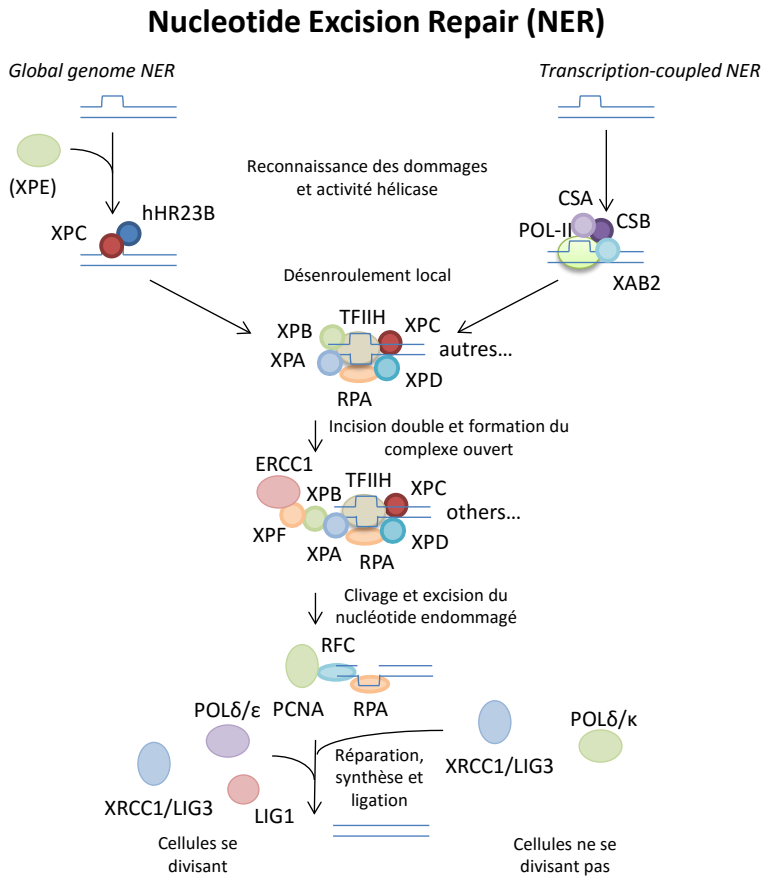


Figure 13 : Schéma du mécanisme de la voie NER (Fousteri and Mullenders, 2008).

Il semblerait que le NER ait également la capacité de réparer les bases oxydées comme les diols de thymine (Wallace, 2014). Il a de même été montré que la fréquence des lésions 8oxodG augmentait en l'absence de CSB ou XPC/XPA et que CSB et XPC pourraient stimuler l'activité d'OGG1, ainsi que celle de nombreuses autres glycosylases et d'APE1.

c. Systèmes de réparation des cassures doubles-brinss

Les cassures doubles-brins peuvent être d'origine exogène ou endogène (Hoeijmakers, 2001). Elles peuvent résulter de l'exposition à des radiations ionisantes, agents génotoxiques chimiques ou encore stress oxydant en général. Mais elles peuvent également être le résultat de processus endogènes comme la réplication de cassures simples-brins ou de bases oxydées non-réparées ou encore des phénomènes de recombinaison destinés à générer de la diversité génétique, comme par exemple dans le cadre de la création d'anticorps ou de gamètes (Iyama and Wilson, 2013), cas particuliers que nous laisserons ici de côté.

La réparation des cassures doubles-brins est répartie en deux voies, en fonction de la phase du cycle cellulaire : la recombinaison homologue appelée HR (Homologous Recombination) et la suture non-homologue nommée NHEJ (Non-Homologous End Joining) (Iyama and Wilson, 2013). Le HR est la voie la plus fidèle. En effet elle intervient majoritairement en phases S et G2 du cycle cellulaire, c'est-à-dire lorsque chaque chromosome est doté de deux chromatides. La réparation d'une des chromatides peut ainsi mettre à profit l'autre chromatide comme modèle et éviter par là-même les erreurs du type insertion ou délétion de nucléotides. Le NHEJ quant à lui intervient plutôt en phase G1 du cycle, phase pendant laquelle les chromosomes ne possèdent qu'une seule chromatide. La réparation ne peut donc

pas s'appuyer sur la chromatide sœur, ni même sur le chromosome homologue. En effet ce dernier peut être géographiquement éloigné du premier à l'échelle des complexes de réparation et par ailleurs la copie de celui-ci pourrait engendrer des problèmes d'homozygotie. La réparation doit donc être réalisée sans modèle, ce qui génère intrinsèquement plus d'erreurs. Le NHEJ peut également être mis en place en phases S/G2, mais dans ce cas la voie privilégiée est tout de même généralement plutôt le HR.

Quelle que soit la voie de réparation utilisée, la signalisation de la réparation des cassures doubles-brins passe en grande partie par les kinases de la famille PIKK, à savoir ATM, DNAPKcs-Ku et ATR, ainsi que par PARP1 et PARP2 (Deriano and Roth, 2013). DNA-PKcs-Ku et ATM sont recrutées sur le lieu des cassures, tandis qu'ATR se localise sur les fourches de réplication bloquées. Ces protéines, en plus de contrôler le recrutement des protéines réparatrices, veillent à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, afin d'arrêter celui-ci le temps de la réparation ou de déclencher la mort cellulaire en cas de dommages trop importants (Shiloh and Ziv, 2013). Toutefois l'influence d'ATM en particulier ne s'arrête pas là. Elle dénombre en effet parmi ses centaines de substrats des protéines impliquées dans de nombreuses autres fonctions cellulaires, comme l'organisation intracellulaire, chromatinienne, télomérique, etc. En réponse à l'apparition de cassures doubles-brins, ATM est recruté immédiatement au niveau de ces lésions et peut y rester jusqu'à plusieurs heures. Cependant une partie des protéines ATM disponibles demeure dans le nucléoplasme, afin de pouvoir mieux contrôler les réponses cellulaires annexes à la réparation.

Par ailleurs, parmi les réponses cellulaires intervenant immédiatement après l'apparition de cassures doubles-brins, on retrouve également des modifications de la chromatine au niveau de ces lésions, sur des distances de l'ordre de la mégabase autour de celle-ci (Amunugama and Fishel, 2012) et en particulier la phosphorylation de l'histone H2AX (qui devient alors γ-H2AX) (Shiloh and Ziv, 2013). Cet événement est d'ailleurs largement utilisé en toxicologie génétique pour la détection par immunofluorescence des cassures doubles-brins (Magdolenova et al., 2014).

Les cassures doubles-brins sont identifiées grâce au complexe MRN, constitué des protéines MRE11, Rad50 et NBS1 (Iyama and Wilson, 2013). MRN recrute ATM sur le lieu de la cassure (grâce en particulier à sa sous-unité NBS1, ainsi qu'à l'action de 53BP1 et BRCA1), ce qui déclenche en retour la phosphorylation de MRN et l'envoi des nombreux signaux décrits ci-dessus (Shiloh and Ziv, 2013). ATM interagit également fortement avec l'histone γ-H2AX, associée à la protéine MDC1. Cette interaction passe notamment par la phosphorylation de γ-H2AX et MDC1 par ATM, qui contribue par une boucle de rétroaction positive à auto-entretenir la formation du complexe protéique entourant la lésion. L'histone H2AX est également phosphorylée par la kinase WSTF sur Y142 et déphosphorylée sur ce même résidu par les phosphatases EYA1/EYA3 (Amunugama and Fishel, 2012). L'interaction MDC1-γH2AX dépend de la déphosphorylation de ce site, qui agit par conséquent comme un interrupteur entre la réparation de la cassure ou le recrutement de facteurs pro-apoptotiques.

i. Recombinaison homologue

Dans le cadre du HR, bien que MRE11 possède une activité nucléase 3'->5' intrinsèque (Amunugama and Fishel, 2012), le complexe MRN recrute CtIP, dont le rôle est de débuter la section des extrémités 5'-3' et de générer les extrémités 3' nécessaires au croisement des brins des deux chromatides (Iyama and Wilson, 2013). Ce nettoyage est nécessaire particulièrement dans le cas des cassures doubles-brins générées par des agents chimiques génotoxiques ou des radiations ionisantes, car ces facteurs

engendrent souvent des extrémités modifiées ou liées à des protéines (Amunugama and Fishel, 2012). La phosphorylation de CtIP par des kinases dépendantes des cyclines semble être à l'origine de la discrimination entre le HR et le NHEJ. CtIP est par ailleurs ubiquitiné par BRCA1 au cours des phases S et G2 du cycle, ce qui favorise sa fixation aux cassures doubles-brins.

La suite du découpage des extrémités 5'-3' est prise en charge par des exonucléases (EXO1, DNA2, etc.), éventuellement associées à des hélicases (le complexe BLM-TOP3α-RMI1-RMI2, à l'activité 3'->5' hélicase, agit en association avec DNA2 et permet à la différence d'EXO1 de contourner les barrières nucléosomales) et l'ADN simple-brin qui en découle est stabilisé par la protéine RPA, afin d'empêcher la formation de structures secondaires inhibitrices pour la suite de la réparation (Amunugama and Fishel, 2012; Daley et al., 2013; Iyama and Wilson, 2013). RPA active ensuite ATR via ATRIP, ce qui à l'image de l'activation d'ATM, génère de nombreux signaux, dirigés en particulier vers les points de contrôle du cycle cellulaire (Iyama and Wilson, 2013). BRCA2 remplace ensuite RPA par la recombinase RAD51 (éventuellement associée ou remplacée par DMC1 dans le cas des cellules germinales), qui a pour fonction de permettre la formation de filaments nucléoprotéiques constitués de multiples copies de cette même protéine (Amunugama and Fishel, 2012; Daley et al., 2013). Ces filaments sont appelés « filaments présynaptiques » (Daley et al., 2013). Ils possèdent une structure en hélice droite comprenant environ 18 nucléotides et 6 protomères de recombinase par répétition. Au sein de chaque filament présynaptique, l'ADN est étiré de manière à obtenir un allongement de l'axe de l'hélice d'environ 5,4 Å entre chaque nucléotide adjacent, ce qui augmente le pas de l'hélice de 50% environ par rapport à la forme B classique de l'ADN (Amunugama and Fishel, 2012; Daley et al., 2013).

Au sein des filaments présynaptiques, une molécule d'ATP se lie entre chaque monomère de recombinase (Amunugama and Fishel, 2012). Cette fixation d'ATP permet d'étirer la conformation des filaments, ce qui la rend nécessaire à la recherche d'homologie de séquence et au croisement des brins. Cette recherche d'homologie se traduit par des collisions aléatoires avec le brin sondé jusqu'à l'appariement avec la séquence homologue. Une fois cette recherche achevée, l'alignement obtenu est appelé « complexe synaptique » (Amunugama and Fishel, 2012; Daley et al., 2013). L'invasion de ce complexe par les filaments présynaptiques constitue la « boucle de déplacement » ou « boucle en D ». L'assemblage du complexe synaptique est facilité par l'action de plusieurs facteurs, en particulier RAD51AP1, PALB2 et DMC1. RAD51AP1 et PALB2 possèdent tous deux la capacité de se lier à l'ADN et d'interagir avec le filament présynaptique pour capturer le duplex d'ADN homologue et ainsi former le complexe synaptique. RAD51AP1 agit ainsi en synergie avec PALB2 (via la formation d'un complexe entre ces deux protéines) d'une part et DMC1 d'autre part. L'appariement avec l'ADN homologue est par ailleurs favorisé par l'action de RAD54. Cette ATP hydrolase spécifique de l'ADN double-brin interagit avec RAD51 et DMC1 et est capable de translocation sur l'ADN double-brin, qui a pour effet de désenrouler celui-ci localement, ce qui facilite l'accès des filaments présynaptiques et leur appariement aux brins homologues. Le rôle de RAD54 aboutit également à l'éviction de RAD51 et DMC1, qui peut également être facilitée par HEL308 et RFS-1 pendant la méiose.

A partir de cette étape, le mécanisme du HR se divise en plusieurs sous-voies (Figure 14). Dans le premier cas, appelé SDSA (Synthesis-Dependant Strand Annealing), l'hélicase FANCM dissocie le brin invasif de la boucle en D, ce qui permet d'éviter la formation de crossing overs (définis comme l'échange réciproque de séquences adjacentes (Guirouilh-Barbat et al., 2014)), qui peuvent avoir des conséquences dommageables pour la cellule (translocations chromosomiques, pertes d'hétérozygotie, etc.) (Daley et al., 2013). La deuxième voie possible est nommée dissolution de jonctions doubles de

Holliday (dHJ). Elle est médiée par l'hélicase BLM, qui agit de concert avec la topoisomérase TOPO IIIα. RPA, ainsi que le complexe RMI1-RMI2, favorisent cette réaction de dissolution. Cette voie aboutit également à l'évitement du crossing over. La structure ainsi formée est appelée le « dHJ dissolvasome ». Quelle que soit la voie, la réparation finale de la cassure est assurée par des polymérases (POLδ ou POLη) (Amunugama and Fishel, 2012). Enfin si par hasard la réparation échoue, les hélicases BLM ou RECQ5 (stimulée par RPA) sont capables de former un complexe avec RAD51 aboutissant au démantèlement des filaments présynaptiques (Amunugama and Fishel, 2012; Daley et al., 2013). Ce démantèlement est dans ce cas facilité par l'activité ATPase de RAD51.

Enfin dans des cas très particuliers, le HR se résout par « résolution » des dHJ. Celle-ci implique l'action de résolvases comme SLX1-SLX4, MUS81-EME1, etc. et le processus aboutit à un échange génétique entre l'ADN modèle et l'ADN lésé, qu'il s'apparente ou non à un crossing over. Dans ce cas, même s'il y a crossing over, celui-ci n'engendre normalement pas de conséquence délétère, dans la mesure où la recombinaison est effectuée avec la chromatique sœur, dont la séquence est rigoureusement identique à celle de la chromatide lésée (Guirouilh-Barbat et al., 2014).

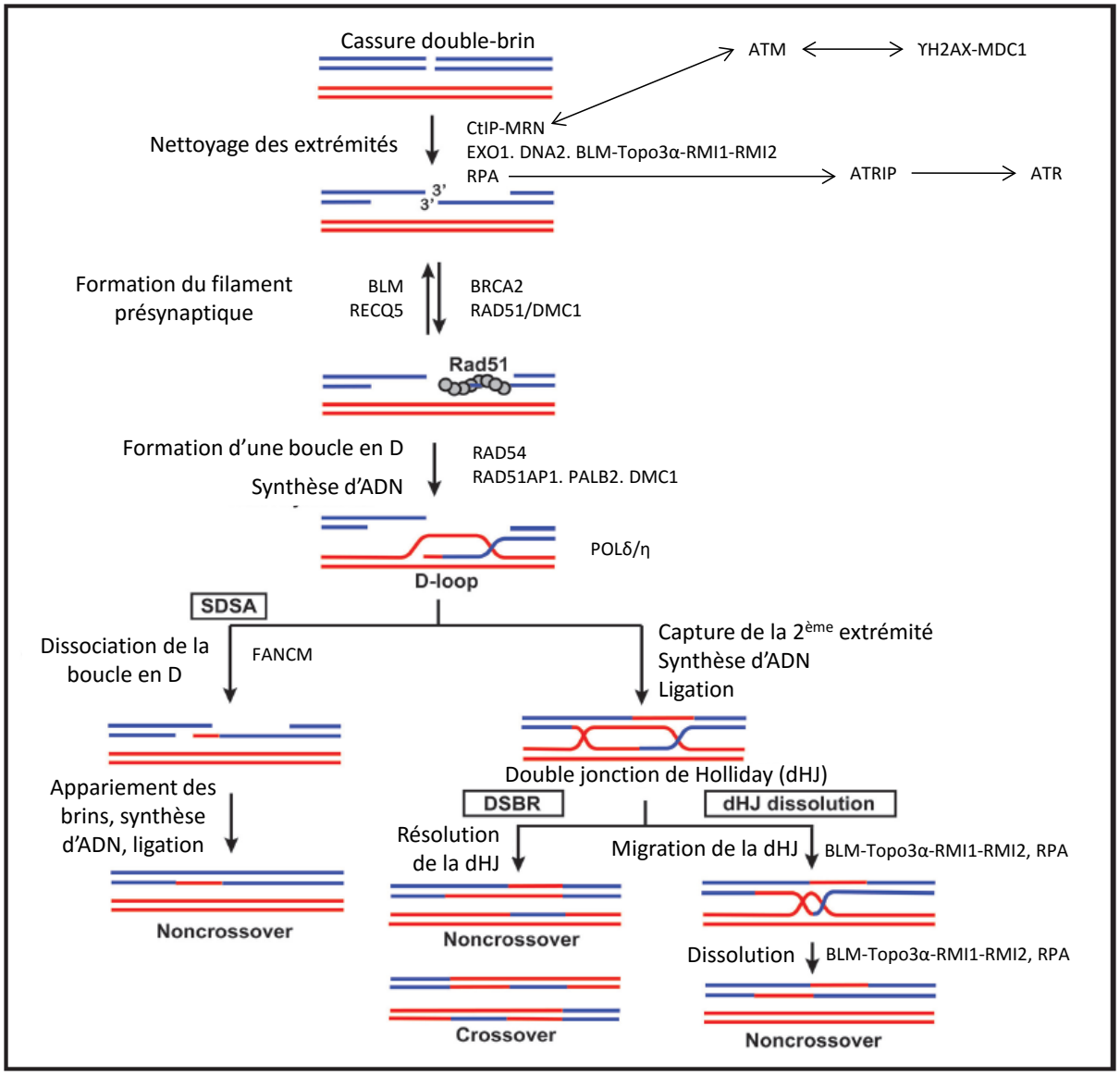


Figure 14 : Schéma du mécanisme de la voie HR (Amunugama and Fishel, 2012; Daley et al., 2013; Iyama and Wilson, 2013; Shiloh and Ziv, 2013).

ii. Suture non-homologue

Dans le cadre du NHEJ, contrairement au HR, la réparation s'effectue en l'absence de tout modèle (Deriano and Roth, 2013; Iyama and Wilson, 2013). De plus elle entraîne généralement de petites suppressions ou insertions de nucléotides. Par conséquent cette voie est une source d'erreurs bien plus importante que le HR. Cependant compte tenu de la grande proportion du génome constitué de séquences non-codantes, il se pourrait que les quelques modifications engendrées par le NHEJ soient globalement sans conséquence dans la plupart des cas.

Le NHEJ est divisé en deux sous-voies : une voie canonique majoritaire (c-NHEJ) et une voie alternative (a-NHEJ), également appelée microhomology-mediated NHEJ ou backup-NHEJ (Deriano and Roth, 2013; Iyama and Wilson, 2013). Dans la voie canonique, le repérage des cassures doubles-brins est effectué par le complexe Ku70/80 (Ku), qui s'attache aux extrémités lésées et recrute la kinase DNA-PKcs, dont un exemplaire se lie à chaque extrémité. Le complexe Ku, abondamment présent dans la cellule (environ 400 000 exemplaires), possède une grande affinité pour l'ADN, y compris lorsque celui-ci présente des extrémités particulières, comme par exemple des structures en épingle à cheveux (Deriano and Roth, 2013). Sa translocation le long de l'ADN permet à plusieurs exemplaires de ce complexe de s'associer au niveau de la cassure. DNA-PKcs (dont la distance de contact avec l'ADN est d'environ 10 pb à chaque extrémité) stabilise et aligne les deux extrémités et l'interaction avec Ku et entre les deux exemplaires de la protéine déclenche l'autophosphorylation de celle-ci et sa dissociation, ce qui favorise l'accès ultérieur des autres protéines de réparation (Deriano and Roth, 2013; Iyama and Wilson, 2013). Mais avant cela, DNA-PKcs recrute Artemis, dont le rôle est de digérer les extrémités 3' et 5' lésées jusqu'à révéler de chaque côté des extensions simple-brin contenant des nucléotides complémentaires en bon état pouvant être appariés (Iyama and Wilson, 2013). Artemis peut également servir à ouvrir les structures en épingle à cheveux formées par exemple lors d'un processus de brassage génétique (Deriano and Roth, 2013). Une interaction avec XRCC4-LIG4 permet ensuite le recrutement de PNKP, qui se charge du nettoyage final des extrémités avant leur ligation, en ôtant les éventuels groupements phosphates résiduels en 3' et en les rajoutant le cas échéant en 5' (Iyama and Wilson, 2013). Si l'une des extrémités contient un site abasique, Ku utilise son activité 5'-dRP/AP lyase pour exciser le nucléotide endommagé (Deriano and Roth, 2013). Les polymérases POLμ/λ comblent les éventuels trous nucléotidiques subsistant et les extrémités complémentaires sont liées à l'aide du complexe XRCC4-LIG4, le tout étant stimulé par XLF (Deriano and Roth, 2013; Iyama and Wilson, 2013). Il semblerait que le complexe Ku soit alors éliminé par ubiquitination (Deriano and Roth, 2013).
Les protéines WRN, APLF et BLM pourraient également jouer un rôle dans le cNHEJ (Deriano and Roth, 2013). Par ailleurs le complexe MRN pourrait être impliqué dans le maintien des deux extrémités de part et d'autre de la cassure tout au long du processus de réparation, afin que la ligation n'ait pas lieu avec une autre extrémité du génome. Cette propriété du complexe MRN ferait intervenir un motif de coordination du zinc situé au sein de RAD50.

Le paradigme selon lequel le a-NHEJ ne se mettrait en place qu'en cas de déficience du c-NHEJ a récemment été contredit (Deriano and Roth, 2013). Il semblerait que le a-NHEJ représente environ 10% des réparations par NHEJ, que la cellule présente ou non un c-NHEJ déficient. Cette voie alternative est source de plus de pertes de nucléotides et donc de plus d'erreurs que le c-NHEJ. Elle se traduit par de longues suppressions de séquences, des microhomologies (servant probablement à

stabiliser les intermédiaires appariés) ou encore par des insertions de longues séquences d'ADN d'origine inconnue. Cependant aucune de ces caractéristiques ne semble invariablement présente. Il semblerait par ailleurs que la réparation par a-NHEJ soit plus lente que par c-NHEJ, ce qui augmenterait les risques que d'autres cassures doubles-brins se forment à proximité de la première et que les extrémités de ces cassures se mélangent en cours de réparation.

D'une manière générale, on pense que cette voie doit faire intervenir des enzymes de digestion des extrémités, des protéines stabilisatrices des microhomologies et des nucléases capables de nettoyer les extrémités 5' et 3' pour la ligation (Deriano and Roth, 2013). Néanmoins de nombreuses incertitudes subsistent concernant cette voie. Parmi les protéines candidates pour faire partie de ce mécanisme, on retrouve le complexe MRN accompagné de CtIP (pour la digestion des extrémités), PARP1, ainsi que XRCC1, LIG3 et LIG1. Cependant l'implication de XRCC1, LIG3 et LIG1 reste controversée (Deriano and Roth, 2013; Iyama and Wilson, 2013).

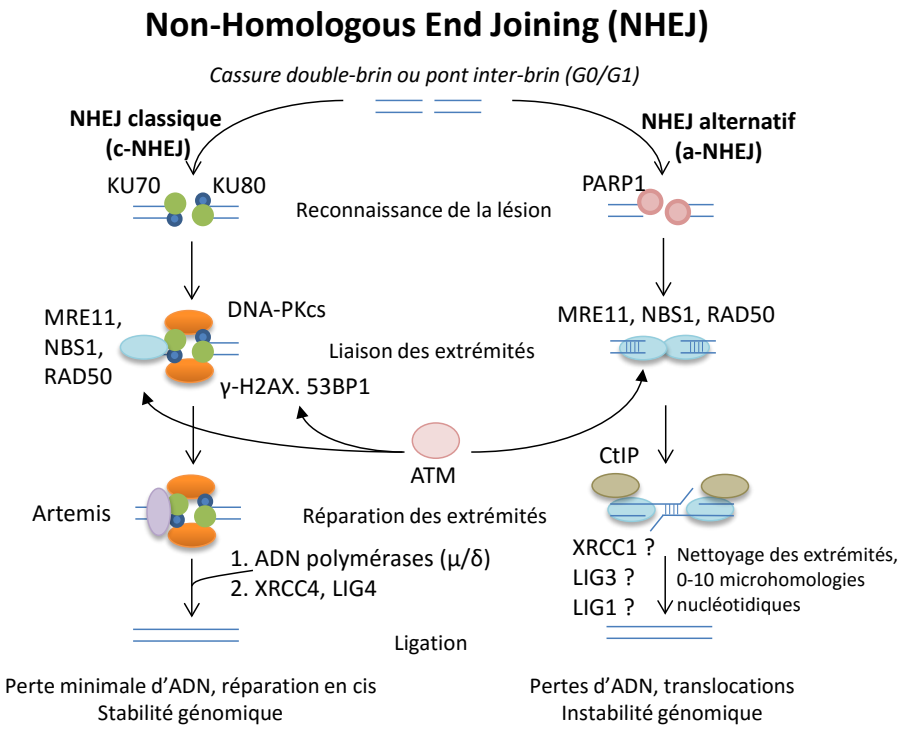


Figure 15 : Schéma du mécanisme de la voie NHEJ (Deriano and Roth, 2013).

iii. Single-Strand Annealing (SSA)

Pour finir, il semblerait qu'il existe une dernière voie de réparation des cassures doubles-brins, principalement étudiée chez la levure (Iyama and Wilson, 2013). Cette voie, appelée SSA (Single-Strand Annealing), est parfois classée dans le HR. Néanmoins elle n'implique l'utilisation d'aucun modèle (ni chromatide sœur, ni chromosome homologue). Elle intervient dans le cas de cassures doubles-brins situées entre deux zones à hautes répétitions de séquences, comme par exemple des loci d'ADNr. Le SSA est activé par le recrutement de RPA à l'extrémité 3' (déjà nettoyée par une nucléase, comme MRE11 par exemple (Karran, 2000)) et par l'interaction du complexe RPA-ADN simple-brin avec l'équivalent de BRCA2. Les séquences complémentaires en amont et en aval de la cassure sont ensuite appariées, générant par la même occasion des queues simple-brin non-appariées, qui sont probablement excisées par le complexe ERCC1-XPF (avec l'aide de MSH2-MSH3 dans certains cas (Karran, 2000)). Les extrémités sont encore nettoyées et rallongées au besoin par des nucléases et des

polymérases avant leur ligation. Cette voie de réparation entraîne par conséquent des pertes nucléotidiques et donc un certain degré d'instabilité génomique.

d. Réparation des mésappariements

La réparation des mésappariements, appelée MMR (Mismatch Repair) et/ou des boucles d'insertion/suppression (BIS) de nucléotides est un processus essentiel, qui intervient principalement au cours de la réplication de l'ADN (Bak et al., 2014). Lorsque ces erreurs ne sont pas réparées, la fréquence de mutation de la réplication, qui est en temps normal d'environ 1/100 000 à 1/10 000 (Jiricny, 2013), augmente de 2 à 3 ordres de grandeur (Bak et al., 2014). Les polymérases possèdent intrinsèquement la capacité d'exciser le dernier nucléotide inséré en 3', ce qui constitue un premier niveau de contrôle et de correction, qui permet déjà d'augmenter la fidélité de 2 ordres de grandeur (Jiricny, 2013). Le MMR prend en charge les mésappariements ayant échappé à cette première vérification.

Les mésappariements ou BIS sont repérés par le complexe hétérodimérique MutS (Bak et al., 2014). Celui-ci existe sous deux formes : MutSα (MSH2-6) ou MutSβ (MSH2-3). MutSα se charge des mésappariements d'une seule base et des BIS de 1-2 nucléotides maximum, tandis que MutSβ est spécialisé dans les BIS de plus grande envergure, allant jusqu'à 16 nucléotides (Kunkel and Erie, 2005). Le repérage du mésappariement par MutS induit chez lui un changement conformationnel, lié à un échange ADP-ATP, qui lui permet de coulisser le long de l'ADN. MutS recrute ensuite un autre complexe hétérodimérique appelé MutL. A l'image de MutS, MutL existe sous plusieurs formes : MutLα (MLH1-PMS2), qui est la forme prédominante, MutLβ (MLH1-PMS1), dont la fonction dans le MMR reste inconnue et MutLϒ (MLH1-3), qui intervient principalement dans le cadre de la recombinaison méiotique. Le complexe MutS-MutL est capable de transloquer de manière bidirectionnelle le long de l'ADN à la recherche d'une discontinuité (telle un trou entre fragments d'Okazaki) lui permettant de distinguer le brin nouvellement répliqué du brin matrice. Plusieurs hypothèses circulent concernant le mécanisme précis permettant à MutS-MutL de réaliser cette distinction (Kunkel and Erie, 2005). Une de ces hypothèses, qui semble être la plus probable à l'heure actuelle, est que MutS-MutL coulisse le long de l'ADN jusqu'à rencontrer une unité PCNA ayant été chargée à une extrémité 3' par RFC (Peña-Diaz and Jiricny, 2012). PCNA étant toujours orienté de la même manière sur l'ADN, son orientation indiquerait l'identité du brin nouvellement formé.

L'étape suivante consiste à dégrader le brin neuf jusqu'au mésappariement et au-delà, afin que celui-ci puisse être à nouveau synthétisé, potentiellement sans erreur. Cette dégradation est prise en charge par l'exonucléase EXO1 (Peña-Diaz and Jiricny, 2012). Cependant EXO1 ne possède qu'une activité exonucléase 5'->3', incompatible avec une dégradation à partir des extrémités 3'. Ce problème est résolu par la sous-unité PMS2 de MutLα, qui possède une activité endonucléase lui permettant d'inciser le brin à dégrader de part et d'autre du mésappariement. Ainsi EXO1 trouve toujours une extrémité 5' à laquelle se lier pour effectuer la dégradation. L'action d'EXO1 génère un trou simple-brin se prolongeant d'environ 150 nucléotides après le mésappariement (Peña-Diaz and Jiricny, 2012), lequel est stabilisé par RPA (Bak et al., 2014). L'étape de resynthèse implique ensuite PCNA, POLδ et la ligation est effectuée par LIG1 (Peña-Diaz and Jiricny, 2012).

Certaines études ont montré que le MMR pouvait également être activé en dehors de la phase S du cycle cellulaire (Bak et al., 2014). Dans ce cas, le MMR pourrait profiter du fait que PCNA demeure lié à l'ADN longtemps après sa réplication et conserve son orientation unique indiquant l'identité du brin le plus neuf (Peña-Diaz and Jiricny, 2012). PMS2 serait ainsi encore capable d'inciser le brin mésapparié malgré la disparition des discontinuités liées aux fragments d'Okazaki.

Il se pourrait également que le MMR se serve de l'activité du BER ou de la réparation par excision de ribonucléotides (RER) pour distinguer le brin neuf du brin matrice (Peña-Diaz and Jiricny, 2012). En effet ces voies de réparation créent des cassures simples-brins, qui indiqueraient l'identité du brin le plus neuf.

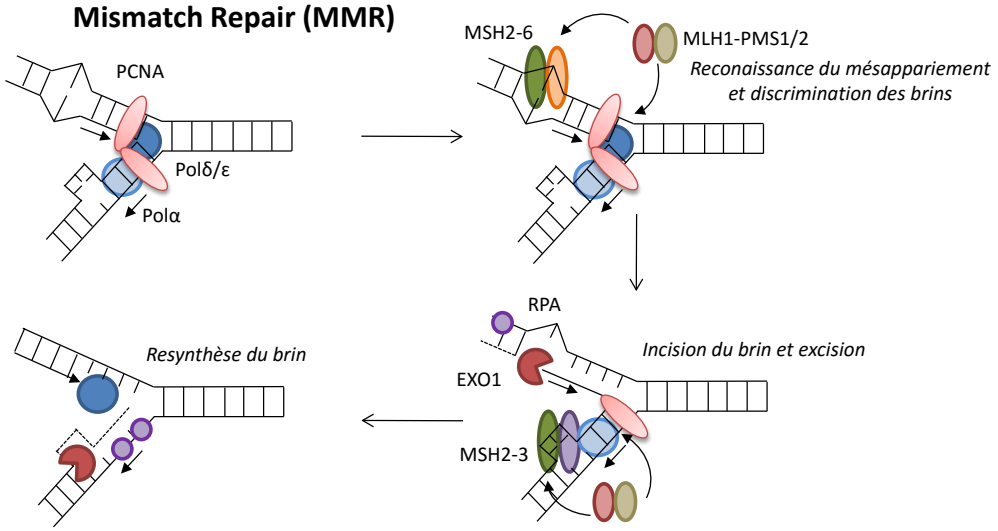


Figure 16 : Schéma du mécanisme de la voie MMR (Bak et al., 2014; Hoeijmakers, 2001; Peña-Diaz and Jiricny, 2012). Ce schéma représente la réparation d'un mésappariement à 1 nucléotide sur le brin du haut, ainsi que d'une boucle d'insertion à 3 nucléotides sur le brin du bas, au niveau d'une fourche de réplication de l'ADN.

e. Translesion synthesis (TLS) : un système de « survie »

Le blocage des fourches de réplication par diverses lésions de l'ADN est un phénomène délétère pour la cellule, qui est normalement pris en charge par la machinerie de réparation en fonction du type de dommage occasionné. Cependant il arrive que la cellule poursuive tout de même la réplication de son ADN. La réparation intervient alors dans un deuxième temps (via le GG-NER par exemple). Ce système de contournement transitoire de la réparation est appelé TLS (Trans-Lesion Synthesis). Il est gouverné par une batterie de polymérases dédiées, dont la particularité est de posséder des sites actifs capables d'accommoder des matrices d'ADN endommagées (Yang et al., 2013). Le recrutement des polymérases TLS est déclenché par l'ubiquitination de PCNA par le complexe RAD6-RAD18, éventuellement recruté par RPA. Il s'ensuit deux hypothèses mécanistiques (Figure 17).

Selon la première hypothèse (A), la polymérase TLS correspondant à la lésion est immédiatement recrutée et remplace la polymérase en place, afin de poursuivre la synthèse au niveau du dommage et jusqu'à 3 nucléotides au-delà. PCNA est ensuite désubiquitiné, ce qui provoque le départ de la polymérase TLS et le retour de la polymérase normale pour la poursuite de la réplication.

Selon la seconde hypothèse (B), la TLS n'est pas déclenchée immédiatement. La synthèse est simplement arrêtée au niveau du blocage et reprise quelques nucléotides après la lésion. C'est donc a posteriori que PCNA est ubiquitiné et recrute la polymérase TLS correspondante, qui se charge de combler le trou.

Chez l'homme on dénombre 5 polymérases TLS : REV3, REV1, POLη (qui intervient également dans le HR), POLι et POLκ (Goodman and Woodgate, 2013). Leurs caractéristiques et spécificités sont répertoriées dans le Tableau 6.

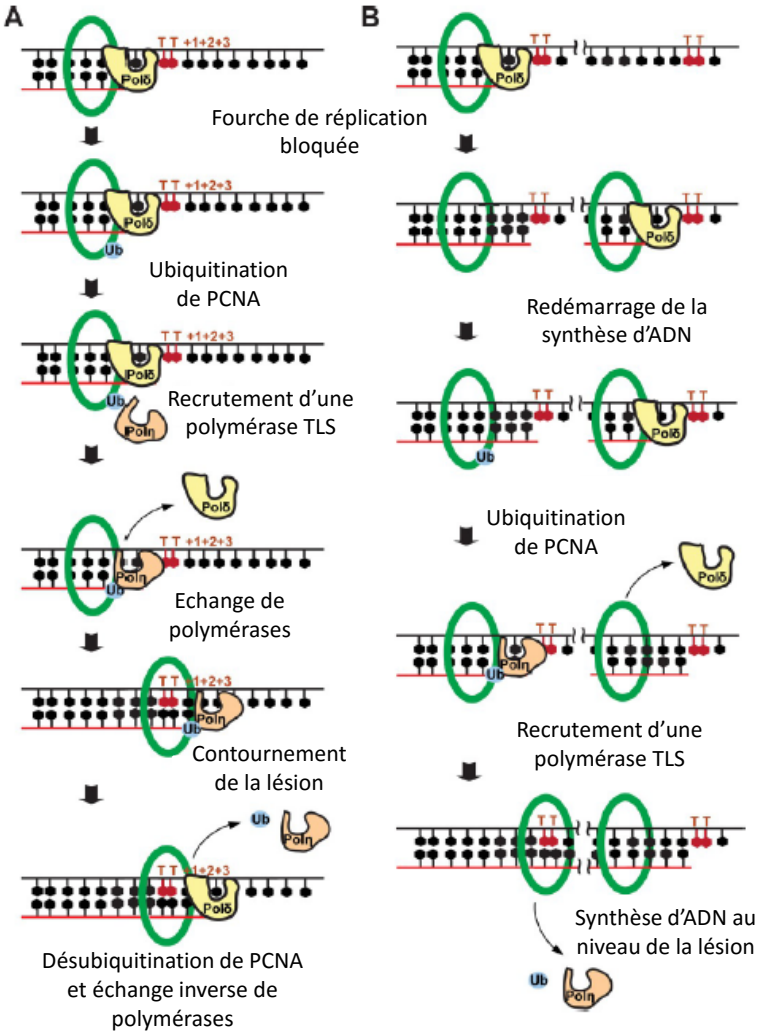


Figure 17: Schéma du mécanisme de TLS selon les deux hypothèses en vigueur (A/B) (Yang et al., 2013).

Tableau 6 : Propriétés des polymérases TLS chez l'homme (Goodman and Woodgate, 2013; Yang et al., 2013).

Nom	Famille	Propriétés
REV3	B	Sous-unité catalytique de POLζ
REV1	Y	Incorpore des dCMP en face des dG et sites abasiques Protéine support interagissant avec POLζ, POLη, POLι et POLκ, notamment dans le cadre des échanges de polymérases
POLη	Y	Contourne efficacement les dimères cyclobutane T-T (mais pas les photoproduits 6-4 pyrimidine-pyrimidone) Régulée par ubiquitination et phosphorylation
POLι	Y	Incorpore un dC en face d'une 8oxodG Incorpore fidèlement les dA, mais beaucoup moins fidèlement les dT
POLκ	Y	Contourne efficacement un grand nombre de lésions N^2-dG Engendre souvent des décalages de -1 nucléotide

f. Autres voies de réparation de l'ADN

i. Réversion directe

En plus des voies BER, NER, HR, NHEJ et MMR, qui font intervenir chacune un grand nombre de protéines, il existe quelques voies de réparation mineures. Certains adduits de l'ADN en particulier

peuvent ainsi être réparés par réversion directe (Direct Reversal – DR) (Yi and He, 2013). Le DR présente l'avantage de n'impliquer généralement qu'une seule protéine et de ne pas nécessiter d'incision du squelette de l'ADN. A ce jour on dénombre chez l'homme deux grands mécanismes de DR : la réversion des dommages O-alkylés (O^6-méthyl-guanine – 6-meG, etc.) par les O^6-alkylguanine-DNA alkyltransférases et celle des adduits de bases N-alkylés par la famille de dioxygénases AlkB (Figure 18).

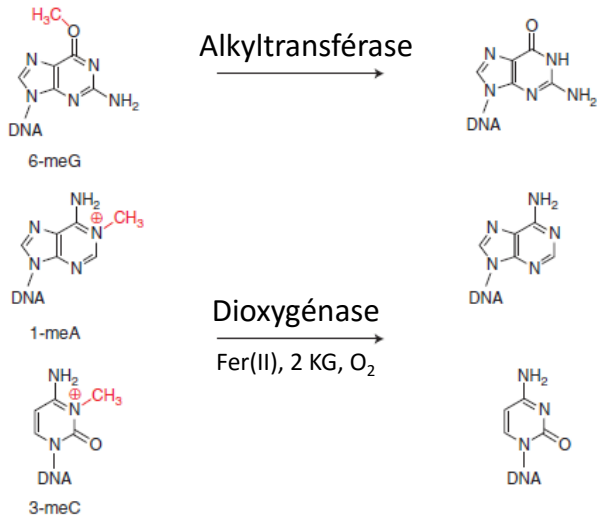


Figure 18 : Exemples de réversions directes (Yi and He, 2013). « 2KG » : 2-kétoglutarate.

ii. Réparation des pontages inter-brins : Fanconi Anaemia (FA)

On recense par ailleurs une autre voie de réparation, centrée cette fois-ci sur la réparation des pontages inter-brins, qui peuvent en particulier apparaître lors de la réplication de l'ADN (Kottemann and Smogorzewska, 2013). Cette voie est appelée Fanconi Anaemia (FA), en référence au syndrome provoqué par l'inactivation des gènes et des protéines impliqués chez l'homme. Cette voie comprend une quinzaine de protéines, mais fait également intervenir de nombreuses protéines impliquées dans les autres voies de réparation (NER, HR, etc.). Il semblerait qu'elle joue également un rôle inhibiteur dans le cadre du NHEJ, à la faveur du HR.

Le principal événement déclencheur de FA est l'ubiquitination du complexe ID2, constitué de FANCD2 et FANCI, par le complexe principal de la voie (comprenant FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FAAP20, FAAP24 et FAAP100) (Kottemann and Smogorzewska, 2013). Cette ubiquitination, réalisée grâce à la sous-unité FANCL, nécessite la phosphorylation préalable de FANCI et FANCE, ainsi que l'attachement d'ID2 à l'ADN (Kottemann and Smogorzewska, 2013; Walden and Deans, 2014). La protéine SLX4 (aussi appelée FANCP) recrute ensuite une batterie de nucléases chargées de séparer les brins anormalement liés par digestion du pontage, engendrant ainsi une cassure double-brin et une autre simple-brin. Le principal complexe nucléolytique semble être XPF-ERCC1 (Kottemann and Smogorzewska, 2013). Cependant on recense également l'action de MUSB1-EME1, SLX1, FAN1 et SNM1A, même si leurs spécificités et interactions restent encore floues à ce jour. L'étape suivante a pour but de combler la cassure simple-brin générée par l'action des nucléases. Cet événement est pris en charge par le groupe de polymérases impliquées dans la TLS. Enfin la cassure double-bin est réparée par HR. A l'issue de la réparation, celle-ci est désactivée par la désubiquitination de FANCD2 par USP1-UAF1 (Longerich et al., 2014).

Des preuves de plus en plus nombreuses laissent penser que FANCM, FANCD2 et FANCI notamment sont impliquées dans le réseau de signalisation des kinases ATM et ATR (Longerich et al., 2014; Walden

and Deans, 2014). Par ailleurs PCNA semble également jouer un rôle important dans l'activation de FA par ubiquitination de ID2, ainsi que dans le contrôle de la synthèse d'ADN par les polymérases TLS (Walden and Deans, 2014). La Figure 19 résume le mécanisme de la voie FA.

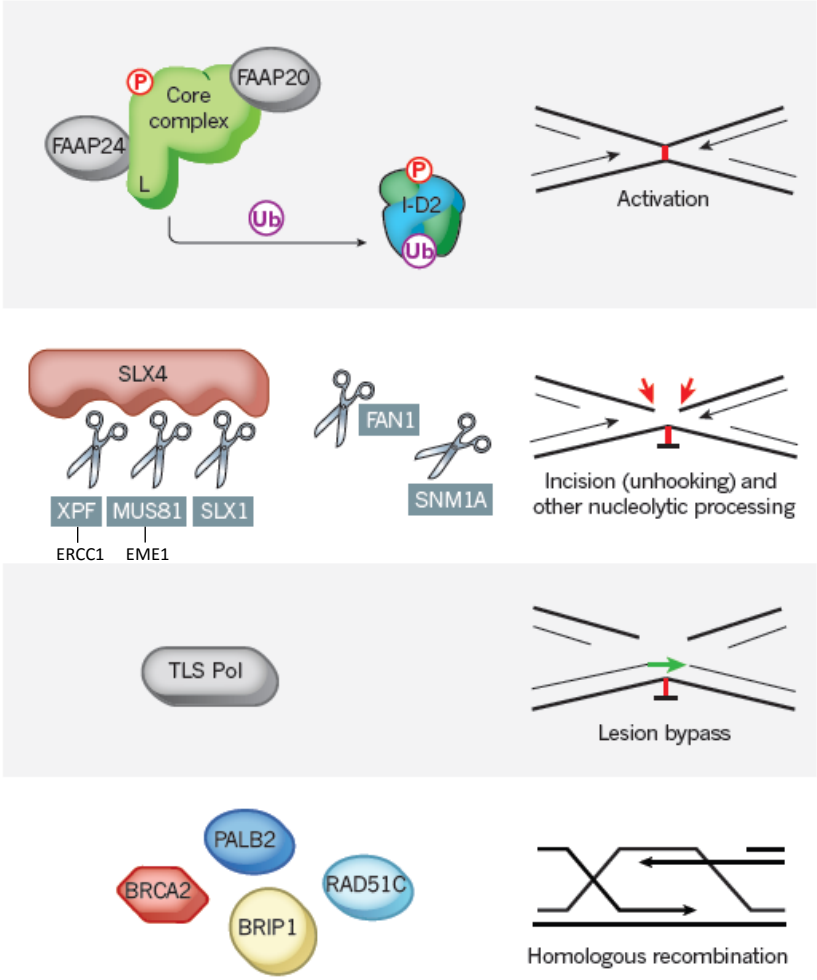


Figure 19 : Schéma du mécanisme de la voie Fanconi Anaemia en phase S ou G2 du cycle cellulaire (Kottemann and Smogorzewska, 2013).

iii. Réparation par Excision de Ribonucléotides (RER)

L'incorporation de ribonucléotides dans l'ADN au cours de sa réplication est un événement courant. On en répertorie environ 1-2 par kilobase (Wallace, 2014). La réparation de ces erreurs peut être réalisée de plusieurs manières différentes, la voie principale étant la réparation par excision de ribonucléotides (RER) (Figure 20) (Williams and Kunkel, 2014). Dans ce cadre, le brin concerné est premièrement incisé au niveau du ribonucléotide par RNaseH2, puis est écarté pour permettre sa resynthèse par POLδ/ε, avec l'aide entre autres de PCNA. L'oligonucléotide endommagé est excisé par FEN1 ou EXO1 et la ligation est prise en charge par LIG1. En cas de perte d'activité RNaseH2, l'excision peut également être réalisée par TOP1. Il en résulte une cassure simple-brin réparée par le BER (Hegde et al., 2008). Dans tous les cas on remarque une forte similitude entre les mécanismes du RER et du long-patch BER.

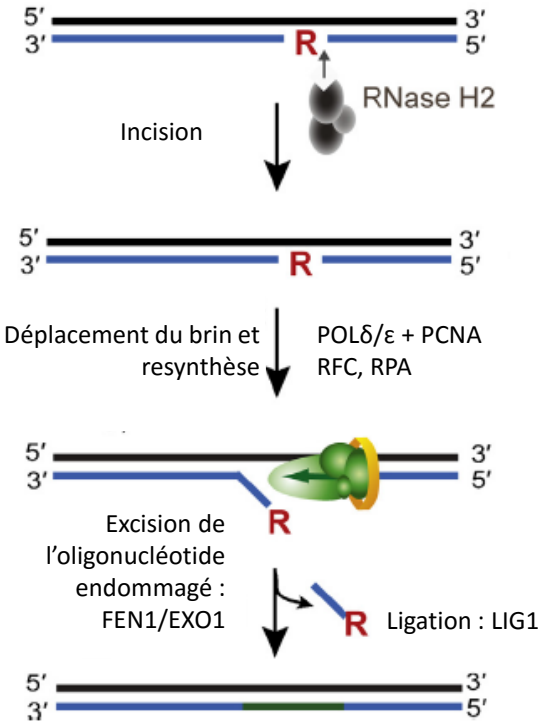


Figure 20 : Schéma du mécanisme de la voie RER (Williams and Kunkel, 2014).

2. *Régulation de la réparation de l'ADN*

a. Blocage du cycle cellulaire

La réparation de l'ADN est intimement liée au cycle cellulaire, c'est-à-dire au cheminement de la cellule vers sa réplication. Certains événements, comme par exemple l'apparition de dommages à l'ADN, peuvent mettre en danger l'intégrité de la cellule si celle-ci poursuit sa progression le long du cycle. La progression dans le cycle est alors arrêtée.

Le cycle cellulaire est divisé en deux étapes principales : l'étape de mitose, aussi appelée « phase M » et l'interphase (Mader, 2012; Reece, 2011). Cette dernière constitue la phase la plus longue du cycle. Elle est divisée en plusieurs sous-phases : la phase G1, au cours de laquelle le volume cellulaire augmente, la phase S durant laquelle l'ADN est répliqué et la phase G2, au cours de laquelle la cellule prépare l'entrée en mitose. La phase M est quant à elle également divisée en plusieurs étapes successives : prophase, prométaphase (ou prophase tardive), métaphase, anaphase et télophase.

La progression du cycle cellulaire est gouvernée par les kinases dépendantes des cyclines, appelées CDK (Cyclin-Dependent Kinases) (Reece, 2011). Ces complexes protéiques sont constitués d'une sous-unité cycline et d'une sous-unité kinase. Une CDK n'est active que lorsque ces deux sous-unités sont associées. Alors que les concentrations cellulaires en kinases sont relativement stables au cours du cycle, les concentrations en cyclines quant à elles varient fortement, ce qui par conséquent régule l'activité enzymatique des CDK.

Le cycle cellulaire est ponctué par des points de contrôle répartis aux différentes étapes cruciales et ayant pour rôle d'arrêter le cycle, afin de laisser du temps à la cellule pour résoudre le problème (Medema and Macůrek, 2012; Reece, 2011) (Figure 21). La résolution de ce dernier mène à la reprise du cycle. A l'inverse si la cellule ne parvient pas à résoudre le problème, elle devient sénescente, i.e.

reste viable mais ne se divise plus (l'arrêt du cycle devient alors permanent), ou entre en apoptose (i.e. mort cellulaire programmée). L'arrêt du cycle cellulaire est gouverné par le biais de phosphorylations et notamment par les kinases CHK1 et CHK2, elles-mêmes activées par les kinases ATM, ATR et DNA-PKcs (Medema and Macůrek, 2012). L'activation des CHK engendre l'inactivation des CDK (Patil et al., 2013).

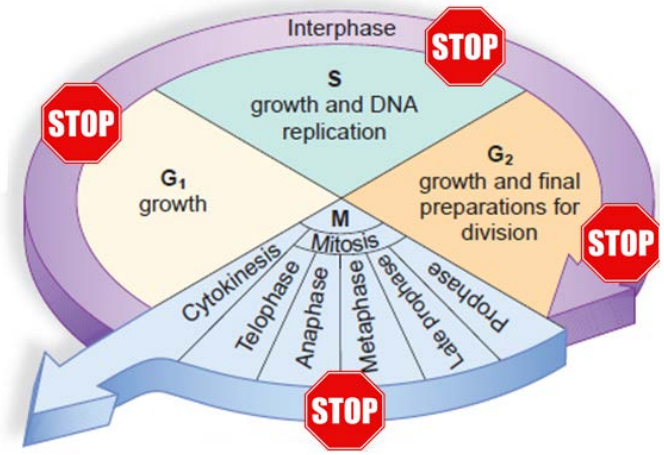


Figure 21 : Schéma des différentes étapes du cycle cellulaire (Mader, 2012; Patil et al., 2013).

b. Régulation de l'accès aux lésions par remodelage de la chromatine

Le remodelage de la chromatine permet l'accès des protéines de réparation de l'ADN aux sites endommagés (Gong and Miller, 2013). Ce remodelage fait intervenir de nombreuses modifications post-traductionnelles. La plus célèbre et la plus étudiée d'entre elles est la phosphorylation de l'histone H2AX en réponse aux cassures doubles-brins (Polo and Jackson, 2011). Cependant on note également de nombreux phénomènes d'acétylations (y compris sur H2AX) et de méthylations dont le rôle est non-négligeable. Le Tableau 7 résume les principaux facteurs (hors kinases) impliqués dans ce remodelage de la chromatine : DNA méthyltransférases, histone méthyltransférases, acétyltransférases, déacétylases, chaperones, etc.

Tableau 7 : Protéines (hors kinases) impliquées dans le remodelage de la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN chez les mammifères (Gong and Miller, 2013; Polo and Jackson, 2011).

ADN méthyltransférases	Histone méthyltransférases	Histone acétyltransférases	Histone désacétylases	Facteurs de remodelage de la chromatine	Histone chaperones
DNMT1	EZH2	KAT1/HAT1	HDAC1	ALC1	CAF-1
DNMT3B	PR-SET-7/SET8	KAT2A/GCN5	HDAC2	INO80	FACT
		KAT2B/PCAF	HDAC3	ISWI	
		KAT3A/CBP	HDAC4	NURD	
		KAT3B/p300	HDAC9	p400	
		KAT4/TAF1	HDAC10	SWI/SNF	
		KAT5/TIP60	SIRT1		
		KAT8/MOF	SIRT2		
		KAT13D/CLOCK	SIRT6		

c. Régulation de la transcription des protéines de réparation de l'ADN

Le système UPS est fortement impliqué dans la régulation transcriptionnelle des protéines de réparation de l'ADN (Tableau 8) (Vlachostergios et al., 2009). Les cibles de ce système sont multiples et appartiennent à l'ensemble des voies de réparation.

Tableau 8 : Influence directe ou indirecte (via des facteurs de transcription dépendant du système UPS) du système UPS sur la régulation transcriptionnelle de la réparation de l'ADN (Vlachostergios et al., 2009).

Gène ciblé	Voie de réparation	Modificateur	Résultat	Gène ciblé	Voie de réparation	Modificateur	Résultat
MGMT	DR	NF-κB	Induction	ARN POL II	TC-NER	Poly-Ub et protéasome 26S	Dégradation de RPB1
		p53	Induction (si dommages à l'ADN) Répression (si expression basale)			NEDD8	Inconnu
						SUMO	Inconnu
MAG1(MPG)	BER	Protéasome 26S (RPN4P)	Induction			BRCA1	Ubiquitination pour dégradation de RPB1
		p53	Répression				Inhibition de la phosphorylation de CTD
DDB2	NER	p53	Induction	CSB	TC-NER	Poly-Ub et protéasome 26S	Dégradation
XPC	NER	p53	Induction	TOP1	Réparation des adduits protéine-ADN	Poly-Ub et protéasome 26S	Dégradation
RAD23	NER	Protéasome 26S (RPN4P)	Induction			SUMO	Ciblage de pores nucléaires ou liaison protéique
		p53	Induction	TOP2	Réparation des adduits protéine-ADN	Poly-Ub et protéasome 26S	Dégradation
GADD45	BER, NER	p53	Induction			SUMO	Ciblage de pores nucléaires ou liaison protéique
		BRCA1	Induction			NEDD8	Inconnu
PPM1D	BER	p53	Induction	PML		Protéasome 26S	Dispersion de corps nucléaires
p53R2	Toutes	p53	Induction			SUMO	Assemblage de corps nucléaires
PCNA	BER, NER, MMR, HR, NHEJ, TLS	p53	Induction	MDC1		Poly-Ub et protéasome 26S	Dégradation, assemblage de BRCA1
MSH2	MMR	p53	Induction	H2A, H2B		Mono-Ub	Désubiquitination de H2A/H2B après inhibition du protéasome, chromatine dense
PMS2	MMR	p53	Induction				
MLH1	MMR	p53	Induction				
KARP-1	NHEJ	p53	Induction				

RAD51	HR	p53	Induction	
FAC (FANCC)	FA	p53	Induction	
KU70	NHEJ	NF-κB	Induction	
KU80	NHEJ	NF-κB	Induction	
ERCC1	NER	Protéasome 26S	Pas d'induction après inhibition du protéasome et avant traitement au cisplatine	
PML		p53	Induction	

En plus de ceux liés au système UPS (Tableau 8), de nombreux autres facteurs de transcription indépendants interviennent également dans la régulation de l'expression des gènes et des protéines de réparation de l'ADN. Outre les facteurs très amonts comme p53 et NF-κB, dont l'influence s'étend bien au-delà de la réparation de l'ADN, on trouve des régulateurs plus spécifiques, comme AP-1/c-Jun, BRCA1, E2F1, Aurora-A, ou encore de manière plus éloignée NRF2 ou BCL2 (Tableau 9) (Christmann and Kaina, 2013; Laulier and Lopez, 2012; Niture and Jaiswal, 2012; Piao et al., 2011; Polager et al., 2002; Saha et al., 2010; Wang et al., 2014).

Tableau 9 : Relations de régulations transcriptionnelles probablement non-exhaustives des protéines BRCA1, E2F1, AP-1/c-JUN, NRF2, BCL2 et Aurora-A sur les protéines de réparation de l'ADN (Christmann and Kaina, 2013; Laulier and Lopez, 2012; Niture and Jaiswal, 2012; Piao et al., 2011; Polager et al., 2002; Saha et al., 2010; Wang et al., 2014).[a]

Régulateurs transcriptionnels	Gènes/protéines régulées	Voies de réparation concernées
BRCA1	OGG1, APE1, XRCC1, XPC, XPE(DDB1/2), NTH1	BER, NER, NHEJ
E2F1	BRCA1, XRCC1, MSH6/2, PCNA, XPG, ATM, PMS2	HR, NHEJ, MMR, NER, TLS, FA
AP-1/c-JUN	APE1, ERCC1, MGMT, MSH2, NEIL1, PCNA, XPF, XPG	BER, NER, MMR, TLS, FA
NRF2	OGG1, BCL2	BER
BCL2	APE1, NRF2	BER
Aurora-A	BRCA1/2, RAD51	HR, NHEJ

[a]Les régulations positives sont indiquées en vert et les régulations négatives en rouge.

d. Modifications post-traductionnelles des protéines de réparation de l'ADN

Les phosphorylations jouent un rôle crucial dans la régulation de l'activité de réparation de l'ADN. Elles peuvent à elles seules l'activer ou l'inhiber. Les principales kinases à l'origine de ces phosphorylations sont ATM, ATR et DNA-PKcs (Polo and Jackson, 2011). A elles seules, ATM et ATR seraient responsables de la phosphorylation de 900 sites portés par 700 protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (Matsuoka et al., 2007). Parmi les protéines substrats, on retrouve des protéines centrales dans les processus de réparation, comme par exemple : le complexe MRN, l'histone H2AX, 53BP1, p53, E2F1, BRCA1, Artemis, PARP1, XPA, FANCD2, etc. (Shiloh and Ziv, 2013; Shiotani and Zou, 2009). Par ailleurs certaines protéines de réparation sont également phosphorylées par les kinases des points de contrôle du cycle cellulaire telles que CHK1, qui phosphoryle entre autres RAD51 et FANCE (Patil et al., 2013).

L'ubiquitination, quant à elle, facilite entre autres la formation et le désassemblage de nombreux foci de réparation et permet la dégradation de protéines bloquant l'accès aux lésions (Kouranti and Peyroche, 2012; Polo and Jackson, 2011).

En plus des phosphorylations et ubiquitinations, d'autres modifications post-traductionnelles jouent également un rôle important dans la régulation de la réparation de l'ADN. C'est le cas notamment des SUMOylations (Sarangi and Zhao, 2015). La SUMOylation consiste en l'ajout covalent d'une protéine appelée SUMO sur la protéine substrat. Le mécanisme à l'origine de cet ajout est très semblable à celui des ubiquitinations et fait appel à des enzymes E1, E2 et E3 aux rôles similaires. La SUMOylation des protéines de réparation de l'ADN peut avoir pour conséquence de promouvoir certaines interactions protéiques, d'influer sur l'expression ou la stabilité de certaines protéines ou encore de faciliter le recrutement de protéines de réparation au niveau des lésions de l'ADN (Tableau 10). On retrouve entre autres parmi les protéines substrats des protéines centrales dans la réparation de l'ADN : RPA, ATRIP, FEN1, MDC1, FANCI, XPC, BRCA1, XRCC4, TDP1, BLM, TDG, etc.

Tableau 10 : Effets de la sumoylation sur les protéines de réparation de l'ADN (Sarangi and Zhao, 2015).

Substrat	Fonction	Effets moléculaires de la SUMOylation	Lysines modifiées	Enzyme E3
		Interactions protéiques		
RPA	Liaison à l'ADN simple-brin	Promeut une interaction avec RAD51	K449, 577	N/D
ATRIP	Partenaire de la kinase ATR	Promeut une interaction avec les protéines des points de contrôle du cycle cellulaire	K234, 289	N/D
		Niveau protéique et stabilité		
FEN1	Endonucléase Flap	Promeut sa dégradation	K168	N/D
MDC1	Point de contrôle de l'ADN	Promeut sa dégradation	K1840	PIAS4
FANCI	Reconnaissance des dommages	Promeut sa dégradation	K4638, 646, 715, 1248, 1288	PIAS1, 4
XPC	Reconnaissance des dommages	Stabilise la protéine	K655	N/D
		Activité		
BRCA1	Ubiquitine E3	Stimule son activité E3 *in vitro*	N/D	PIAS1, 4
		Localisation et/ou recrutement		
XRCC4	Echafaudage de ligase à ADN	Promeut sa localisation nucléaire	K210	PIAS1, xβ
TDP1	Phosphodiestérase	Promeut sa localisation aux sites de dommages à l'ADN	K111	N/D
		Effets multiples		
BLM	Translocase à ADN	Promeut une interaction avec RAD51, localisation de PML	K317, 331, 334, 347	N/D

TDG	Glycosylase à ADN	Réduit la liaison à l'ADN, promeut une liaison intermoléculaire aux SIM[a]	K330	N/D

[a]« SIM » : motif d'interaction SUMO-SUMO.

Enfin on note également le rôle des PARylations, qui consiste en l'ajout covalent de polymères d'ADP-riboses et qui est médié par les protéines PARP (exemple : PARP1) (Polo and Jackson, 2011). Il s'agirait d'un des premiers événements dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, mais qui serait rapidement contré par l'action de PARG (PAR glycohydrolase). La PARylation permettrait entre autres le recrutement de XRCC1, MRN et APLF au niveau des lésions et participerait également au remodelage de la chromatine sur le lieu des dommages.

V. Toxicité pulmonaire des nanoparticules de TiO_2

A. Modèles et méthodes d'étude de la toxicité pulmonaire

La toxicité pulmonaire humaine d'une substance peut s'évaluer de différentes manières. Les études ayant le plus grand pouvoir de preuve sont celles menées chez l'homme : études épidémiologiques d'observation ou d'intervention. En toxicologie environnementale, les études d'intervention chez l'homme sont peu éthiques dans la mesure où elles impliquent d'exposer volontairement des individus à de potentiels produits toxiques. Les études d'observation, qui étudient la santé de personnes exposées aux produits concernés dans leur vie quotidienne ou professionnelle, sont plus acceptables. Cependant l'interprétation des données est alors plus délicate, car les niveaux exacts d'exposition des sujets sont souvent moins bien connus. Une autre approche consiste à utiliser des études expérimentales *in vivo* sur animaux ou *in vitro* sur des modèles cellulaires.

Pour exposer des animaux à des aérosols, trois méthodes principales existent : l'instillation intra-trachéale, l'exposition intranasale et l'inhalation (Shi et al., 2013). L'instillation intra-trachéale permet de bien contrôler la dose d'aérosol reçue par les zones profondes du tractus respiratoire, car elle contourne la majeure partie des mécanismes de clairance des particules. En revanche le corolaire est qu'elle ne permet pas de modéliser ces mécanismes de clairance, ni de modéliser une éventuelle translocation des particules depuis la cavité nasale vers les nerfs sensoriels et le système nerveux en général. L'exposition intranasale se rapproche plus d'une exposition réelle par inhalation. Cependant de plus en plus de laboratoires utilisent désormais directement l'inhalation, qui constitue la modélisation la plus réaliste.

Ces méthodes d'étude *in vivo* sur animaux permettent l'étude de la biodistribution des particules inhalées et en particulier leur éventuelle translocation vers d'autres organes. En revanche les règles de bioéthique régissant les études expérimentales sur animaux interdisent le recours systématique à ces modèles, en particulier lorsqu'il s'agit de réaliser des études de criblage de grande ampleur, qui nécessiteraient un nombre d'animaux trop important. Des modèles cellulaires *in vitro* peuvent alors être utilisés. Ils ne remplacent pas parfaitement les modèles *in vivo*, dans la mesure où ils ne fournissent pas d'information systémique à l'échelle de l'organisme (biocinétique, etc.). En revanche ils sont particulièrement indiqués lorsqu'il s'agit d'étudier les mécanismes d'impact sur des types cellulaires spécifiques et/ou des études de criblage à haut débit. Leur emploi est enfin bien moins coûteux que l'utilisation d'animaux de laboratoire.

Il existe plusieurs manières d'exposer *in vitro* des cellules pulmonaires à des (nano)particules (Paur et al., 2011). La méthode classique consiste à immerger les cellules dans du milieu de culture contenant une suspension des particules en question. Cette technique présente l'avantage d'être facile à mettre en place. En revanche les effets biologiques des particules peuvent être modifiés par l'adsorption à leur surface de composants du milieu de culture, ainsi que par l'agglomération fréquente des particules. Par ailleurs ces modèles sont intrinsèquement éloignés de la réalité, dans la mesure où dans l'organisme les cellules épithéliales pulmonaires sont exposées aux aérosols à l'interface air-liquide et non en conditions submergées. De plus en réalité les épithélia sont constitués de plusieurs types cellulaires, ce qui est rarement le cas *in vitro*. D'où le développement de dispositifs permettant de cultiver des cellules pulmonaires à l'interface air-liquide. Ces derniers sont basés sur des membranes semi-perméables permettant aux cellules d'être exposées à des aérosols au niveau de leur pôle apical et nourries par du milieu de culture liquide au niveau de leur pôle basal. Ces dispositifs constituent actuellement les modèles d'exposition *in vitro* les plus réalistes. Cependant ils nécessitent de pouvoir disposer d'un générateur d'aérosol et d'une chambre d'incubation adaptée, ce qui n'est pas le cas de la plupart des équipes de recherche. Par ailleurs rares sont les personnes ayant réussi à maintenir des cellules en bon état à l'interface air-liquide pendant plus de quelques heures. En effet au-delà de cette durée on constate une augmentation de la mortalité et un développement anormal des tapis cellulaires (en multicouches), ce qui limite donc l'utilisation de ces modèles à des expositions courtes/aigues, alors que les modèles *in vitro* classiques immergés sont aussi bien adaptés aux expositions aigues que chroniques. Les deux approches sont donc complémentaires.

B. Dosimétrie

1. Dosimétrie lors d'expositions en conditions réelles

D'après les quelques valeurs disponibles dans la littérature, il semblerait que les concentrations en aérosols de TiO_2 (toutes tailles de particules confondues) usuellement mesurées en milieu professionnel se situent entre 0,1 - 6 mg/m^3 et entre 11 000 - 140 000 particules/cm^3 (Figure 22) (Baan, 2007; Fryzek et al., 2003; Gangwal et al., 2011; Garabrant et al., 1987; Hext et al., 2005; Koivisto et al., 2012; Lee et al., 2011). Les concentrations maximales pouvant être atteintes sont estimées à 6-15 mg/m^3 environ (Boffetta et al., 2001, 2004; Rode et al., 1981).

Par extrapolation à partir des premières données de toxicité, plusieurs instances réglementaires américaines ont établi des concentrations maximales recommandées en aérosols de TiO_2 (Figure 22). Ces valeurs limites sont supérieures aux concentrations usuellement mesurées dans le cas des seuils fixés par l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) et l'OSHA (Occupational Safety & Health Administration, USA), qui sont respectivement de 10 et 15 mg/m^3 pour 8 h de travail/jour, 5 jours/semaine (Shi et al., 2013). En revanche le seuil de 2,4 mg/m^3 fixé par le NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health, USA) (NIOSH, 2011) est quant à lui compris dans la gamme de concentrations usuellement mesurées en milieu professionnel.

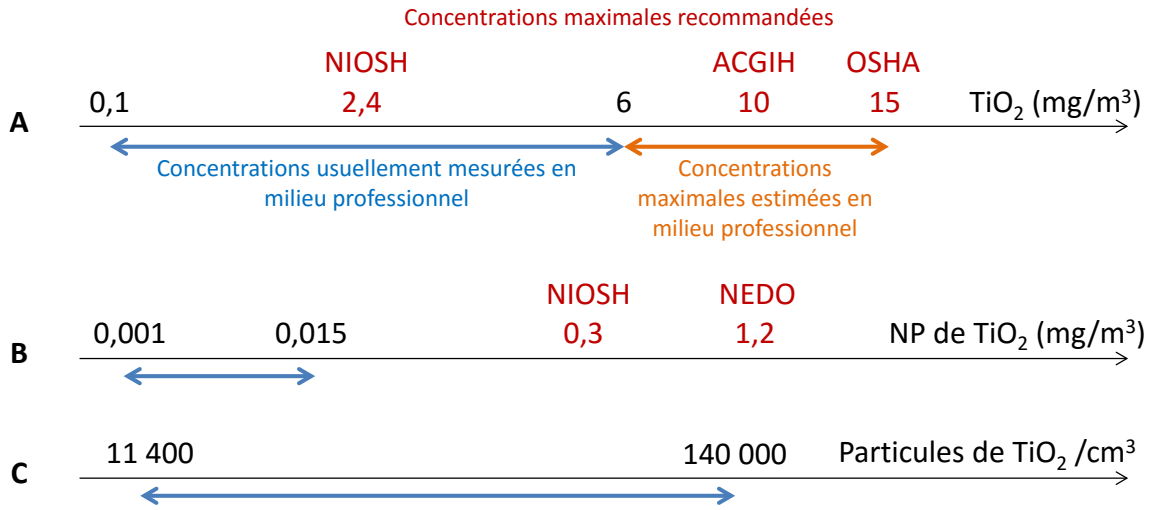


Figure 22 : Echelles de concentrations en aérosols mesurées en mg/m³ (A et B) ou en particules/cm³ (C) pour les particules de TiO_2 en général (A et C) et de taille nanométrique (B) en milieu professionnel. Les concentrations maximales recommandées par les différents organismes sont notées en rouge (NIOSH, 2011; Shi et al., 2013), les concentrations usuellement mesurées sont indiquées en bleu (Baan, 2007; Fryzek et al., 2003; Gangwal et al., 2011; Garabrant et al., 1987; Hext et al., 2005; Koivisto et al., 2012; Lee et al., 2011) et les concentrations maximales estimées sont représentées en orange (Boffetta et al., 2001, 2004; Rode et al., 1981).

Seuls le NIOSH et le NEDO (New Energy and industrial technology Development Organization, Japon) ont établi des valeurs maximales d'exposition recommandées pour les aérosols de NP de TiO_2 (Shi et al., 2013). Ces valeurs limites sont respectivement de 0,3 et 1,2 mg/m³ (pour 10h ou 8 h/jour, 40h/semaine (Boland et al., 2014)). Elles sont largement supérieures aux résultats des deux seules équipes ayant rapporté des données d'exposition professionnelle à des aérosols de TiO_2 nanoparticulaire (Figure 22). Ces groupes de chercheurs ont tous deux étudié les aérosols présents dans des lieux de production de particules de TiO_2 (Gangwal et al., 2011). La première équipe fait état d'un aérosol composé de NP dont la distribution de taille est centrée sur 16 nm (Figure 23) et correspondant à des concentrations de 0,001 mg/m³ et 140 000 particules/cm³ (Gangwal et al., 2011; Hämeri et al., 2009). La seconde quant à elle rapporte un aérosol centré sur 40 nm et équivalent à des concentrations de 0,015 mg/m³ ou 111 300 particules/cm³ (Gangwal et al., 2011).

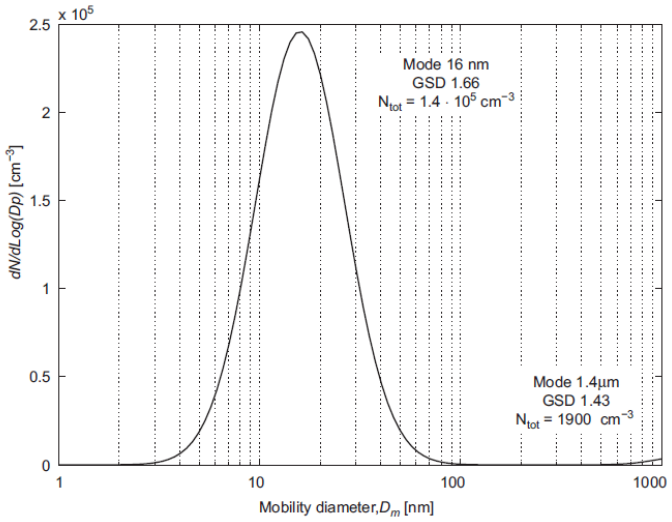


Figure 23 : Distribution de taille (diamètre en nm) d'un aérosol mesuré sur un lieu de production de particules de TiO_2 (Hämeri et al., 2009). Cette distribution est centrée sur 16 nm.

2. Dosimétrie dans le cadre des études expérimentales

Comme relevé au paragraphe précédent, rares sont les études mentionnant des valeurs d'exposition humaine aux aérosols de TiO_2 nanométrique. D'où la difficulté de définir des seuils d'exposition réalistes pour les études expérimentales *in vivo* ou *in vitro*, à laquelle s'ajoute la nécessité de transposer ces valeurs en fonction des modèles et des méthodes expérimentales, ce qui suppose d'effectuer un certain nombre d'hypothèses sur le dépôt des NP dans le tractus respiratoire. Pour cela des modèles informatiques ont été développés (Geiser and Kreyling, 2010). Les premiers algorithmes se sont focalisés sur la modélisation de l'appareil respiratoire et des mécanismes de clairance, dans le but de caractériser les fractions de particules déposées dans les différentes zones de ce tractus. Les principaux modèles ainsi élaborés sont le HRTM (Human Respiratory Tract Model) de l'ICRP (International Commission of Radiological Protection) et le MPPD (Multipath Model of Particle Deposition). Le premier est destiné à la modélisation du tractus respiratoire humain (des hommes, femmes ou enfants) selon différents niveaux d'activité physique et donc différents débits d'air inhalé, tandis que le second permet en plus de modéliser l'appareil respiratoire des rats. Le modèle MPPD est donc particulièrement adapté à la transposition des doses d'exposition *in vivo* chez les rongeurs en doses d'exposition humaines réalistes et inversement. On note une bonne adéquation entre les prédictions de cet algorithme et les données expérimentales disponibles chez le rat.

Comme mentionné précédemment (Tableau 3), ces modèles nous enseignent que le dépôt de particules dans le tractus respiratoire dépend des mécanismes physiques mis en jeu (sédimentation, impaction ou diffusion), qui eux-mêmes dépendent de la taille des particules inhalées (Geiser and Kreyling, 2010). Lorsque cette taille est comprise entre 5 et 100 nm, la région la plus concernée est la zone alvéolaire, dans laquelle le principal mécanisme de clairance, via les macrophages, est inefficace pour les NP (Figure 24). D'où une rétention importante des nanomatériaux au niveau des alvéoles.

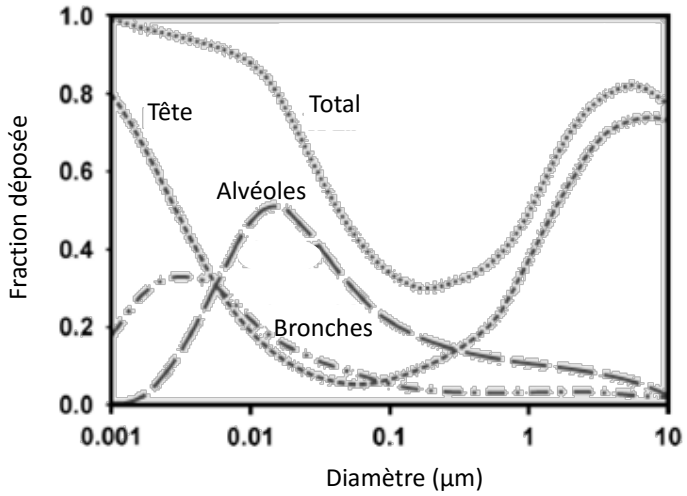


Figure 24 : Fractions de particules déposées dans les différentes parties du tractus respiratoire en fonction du diamètre de ces particules (Geiser and Kreyling, 2010).

Par ailleurs le modèle MPPD a permis de montrer l'existence de « points-chauds » de dépôts dans certains acini du tractus respiratoire, au niveau desquels les doses déposées sont jusqu'à 2 fois plus élevées que la dose moyenne reçue par ailleurs (Anjilvel, 1995). Cependant les extrapolations de doses entre des inhalations réelles chez l'homme ou chez des animaux et les doses appliquées à des cultures de cellules *in vitro* est délicate, en particulier en conditions classiques immergées. En effet en milieu

liquide, les particules sont sujettes à plusieurs mécanismes physiques pouvant aboutir à leur agrégation/agglomération, mais plus généralement à leur transport par diffusion ou sédimentation (Hinderliter et al., 2010). On négligera ici la convection en supposant que les milieux de culture ne sont pas agités au cours des séquences d'exposition des cellules aux particules d'intérêt. La prédominance relative des effets de la diffusion et de la sédimentation dépend de la taille des particules (Figure 25). La vitesse de déplacement liée à la diffusion croit de manière inversement proportionnelle au diamètre des particules et prédomine sur la sédimentation pour des diamètres compris entre 1 et 10 nm. A l'inverse la sédimentation induit un déplacement d'autant plus rapide que le diamètre des particules est grand et prédomine sur la diffusion dans la gamme de taille 100-1000 nm. Enfin dans l'intervalle 10-100 nm, les deux phénomènes coexistent mais produisent tous deux des effets peu intenses, d'où une faible vitesse de déplacement des particules correspondantes.

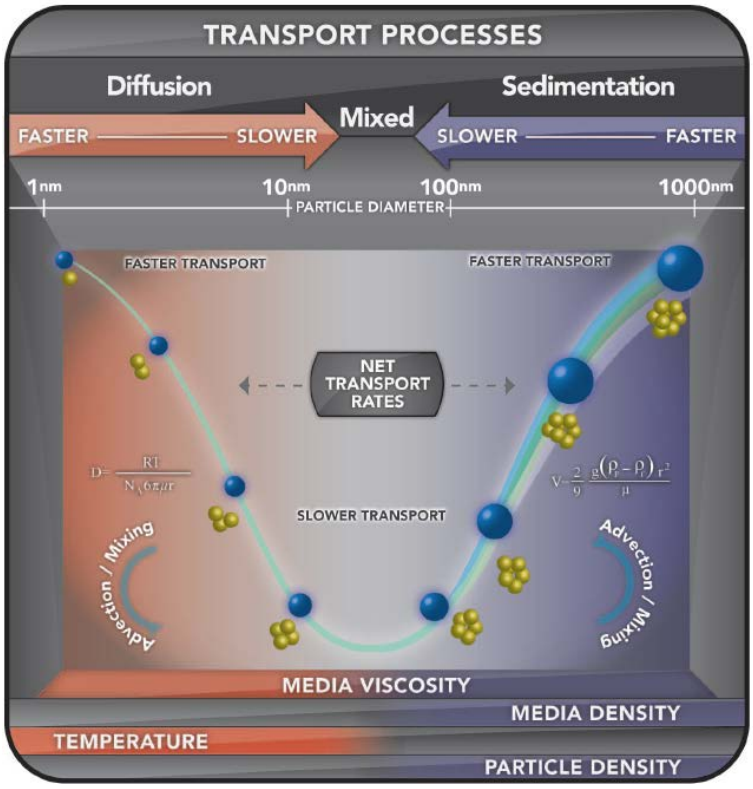


Figure 25 : Mécanismes physiques influençant le transport des particules en milieu liquide en fonction de leur diamètre, d'après le modèle ISDD (Hinderliter et al., 2010).

Le modèle ISDD (*In vitro* Sedimentation, Diffusion and Dosimetry model) a été développé pour modéliser ces phénomènes de transport et mieux caractériser le lien entre les valeurs d'exposition *in vitro* (concentration de particules dans le milieu de culture et durée d'exposition) et les doses réellement déposées sur les cellules (Hinderliter et al., 2010). En effet contrairement aux substances solubles dans les milieux de culture aqueux, dans le cas des particules insolubles comme le TiO_2, les valeurs d'exposition *in vitro* ne sont pas forcément proportionnelles aux doses reçues par les cellules et peuvent même en être très éloignées (Hinderliter et al., 2010; Paur et al., 2011). Pour une taille de particules donnée, les principaux facteurs influençant le dépôt des particules en suspension sur les cellules sont la durée d'exposition et la hauteur de milieu de culture située au-dessus du tapis cellulaire. L'influence de ces facteurs sur la fraction de particules de TiO_2 déposées (par rapport à la quantité de particules de TiO_2 en suspension dans le milieu d'exposition) a été modélisée par

l'algorithme ISDD (Figure 26). Les résultats illustrent bien le fait que les particules dont le diamètre est compris entre 30 et 100 nm se déplacent plus lentement et donc se déposent en moindres proportions sur les cellules que les particules plus petites ou plus grosses. Par ailleurs on constate qu'au-delà de 200-500 nm de diamètre, la durée d'exposition et la hauteur de milieu n'ont que peu d'effets sur la fraction de particules déposée, qui avoisine très vite les 100%.

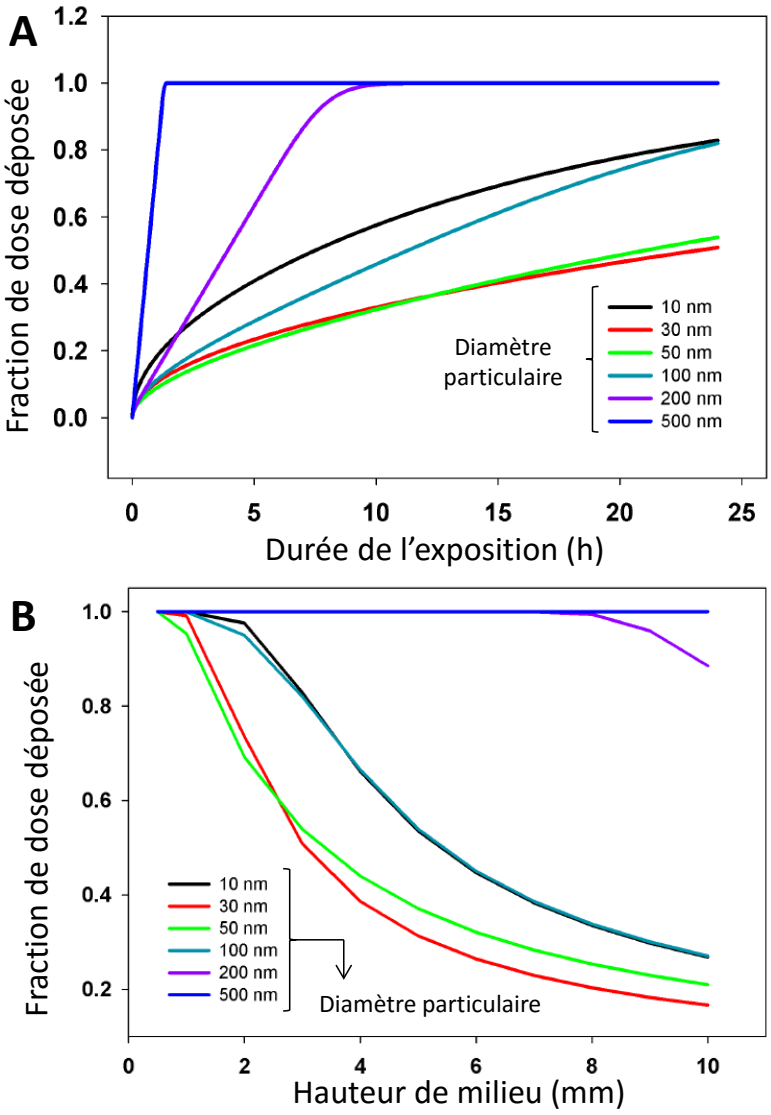


Figure 26 : Fraction de la dose de particules de TiO_2 déposée sur un tapis cellulaire en fonction de la durée d'exposition (pour une hauteur de milieu de culture de 3,1 mm) (A) ou en fonction de la hauteur de milieu de culture (pour une exposition de 24 h) (B), d'après le modèle ISDD (Hinderliter et al., 2010).

Dans le cadre des expositions *in vitro* de cellules à l'interface air-liquide, l'estimation de la dose reçue est facile à calculer, car aucune barrière physique ne sépare les cellules de l'aérosol de particules. La dose déposée peut donc être mesurée par des appareils standards de caractérisation des aérosols.

Pour finir de relier les doses appliquées en conditions *in vitro* sur des cellules alvéolaires à des doses réelles d'inhalation, une équipe s'est appuyée sur le modèle MPPD et sur les quelques données d'exposition professionnelle à des aérosols de NP disponibles dans la littérature (Gangwal et al., 2011). Ce groupe a considéré deux scenarii d'exposition : 24 h ou une Carrière Professionnelle Complète (CPC)

de 45 ans, 8 heures/jour, 5 jours/semaine, 52 semaines/an. Les résultats sont résumés dans le Tableau 11. On constate que le dépôt alvéolaire maximal dans les conditions d'étude est égal à 48,9 µg/cm² et est atteint pour une exposition CPC à 1 mg/m³ de NP de TiO_2 de 20 nm de diamètre. Le même niveau de dépôt alvéolaire dans un scénario d'exposition de 24 h suppose une concentration d'aérosol de 330 mg/m³. Les dépôts alvéolaires maximaux sont atteints pour des diamètres particulaires de 20 nm et on observe une relation de proportionnalité directe entre la concentration de l'aérosol et le dépôt alvéolaire. Cependant pour un même aérosol (concentration et diamètre particulaire) on note une différence de plus de deux ordres de grandeur entre les dépôts alvéolaires en condition CPC et sur 24 h.

Tableau 11 : Correspondances entre des concentrations d'aérosols de NP de TiO_2 inhalés et les doses déposées dans les alvéoles pulmonaires selon différents scenarii d'exposition (Gangwal et al., 2011).[a]

Scénario d'exposition	Concentration de l'aérosol (mg/m³)	Diamètre des particules (nm)	Dépôt alvéolaire (µg/cm²)
CPC	1	20	48,9
	1	100	20,3
	1	5	25,1
	0,1	20	4,9
	0,1	5-100	2,0-4,9
24 h	1	5-100	0,061-0,15
	330	20	48,9

[a]« CPC » : Carrière Professionnelle Complète de 45 ans, 8 heures/jour, 5 jours/semaine, 52 semaines/an. Ces calculs supposent notamment une surface alvéolaire de 106 350 cm² et une densité de 4 g/cm³ pour le TiO_2, dont les particules sont considérées comme sphériques.

3. Internalisation dans les cellules

Les études *in vitro* montrent que les NP de TiO_2 sont internalisées dans la plupart des types cellulaires, mais que les modalités de cette internalisation dépendent de la taille des particules ou de leurs agrégats/agglomérats (Figure 27) (Bruinink et al., 2015; Shi et al., 2013; Skocaj et al., 2011). D'une manière générale, l'internalisation des nanomatériaux dans les cellules passe la plupart du temps par des mécanismes d'endocytose (dépendant ou indépendant de la clathrine ou de la cavéoline, (macro)pinocytose ou phagocytose) (Bruinink et al., 2015). La (macro)pinocytose et la phagocytose concernent les particules (ou agrégats/agglomérats) de 0,2-10 µm et de 2-3 µm respectivement. Les autres modes d'endocytose se superposent pour les entités inférieures à 500 nm. Ces mécanismes d'internalisation mènent généralement au stockage des particules dans des vésicules cytoplasmiques (Bruinink et al., 2015; Simon-Deckers et al., 2008). Cependant des études ont également retrouvé quelques NP de TiO_2 sous forme libre dans le cytoplasme et de manière plus rare dans les organites comme le noyau (Bruinink et al., 2015; Jugan et al., 2012; Shi et al., 2013; Skocaj et al., 2011). Cela a en particulier été observé dans des types cellulaires non-dotés de capacités d'endocytose (Bruinink et al., 2015). Par conséquent il est probable que des mécanismes comme la diffusion jouent également un rôle dans l'internalisation des NP. La rare pénétration de NP dans le noyau pourrait avoir lieu pendant la mitose, au cours de laquelle l'enveloppe nucléaire disparait (Magdolenova et al., 2014). Enfin il est important de noter que les protocoles expérimentaux et notamment l'utilisation de sérum de veau fœtal (qui aide à la dispersion des NP (Ji et al., 2010)) dans les milieux de culture *in vitro*, peuvent avoir un impact sur l'internalisation cellulaire des NP de TiO_2 (Tedja et al., 2012). En effet l'utilisation de sérum induit un enrobage des NP par les protéines dont il est constitué. Il a été observé que cela réduisait dans un premier temps les quantités de NP de TiO_2 internalisées dans des cellules

A549 en contribuant à leur expulsion. Cependant dans un second temps ces NP sont à nouveau internalisées et on aboutit finalement à une internalisation quantitativement plus importante en présence plutôt qu'en l'absence de sérum. Néanmoins le sérum tend à réduire la cytotoxicité engendrée par les NP de TiO_2.

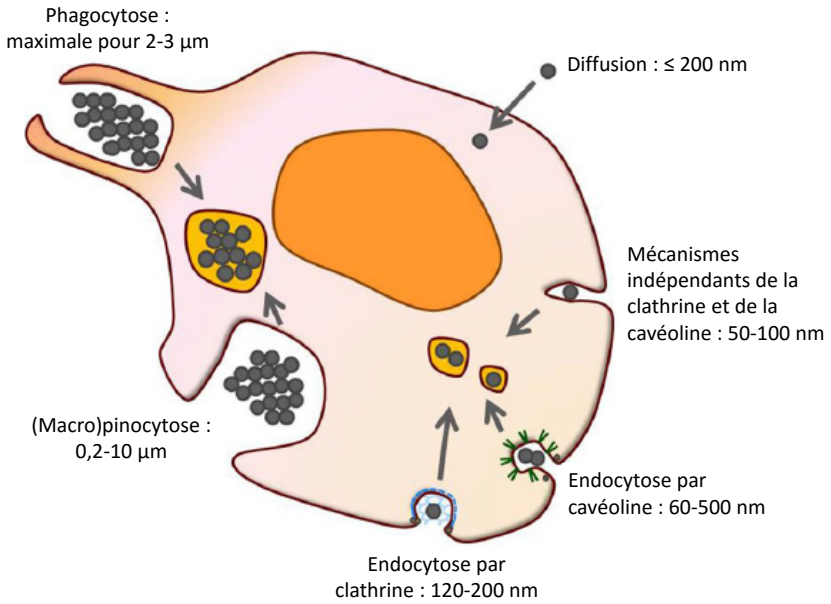


Figure 27 : Principaux modes d'internalisation des nanomatériaux dans les cellules en fonction de leur taille primaire ou de celle de leurs agrégats/agglomérats (Bruinink et al., 2015).

C. Etudes épidémiologiques

Les études épidémiologiques peuvent être de deux types : études de cas ou d'observation, les études d'observation étant elles-mêmes classées en études cas-témoins ou de cohortes (Song and Chung, 2010). Les études de cas portent rétrospectivement sur l'état de santé de sujets exposés, éventuellement de manière intentionnelle, même si ce cas de figure se présente rarement chez l'homme pour des raisons éthiques. Les études d'observation à l'inverse ne se traduisent jamais par l'exposition intentionnelle des sujets. Les expositions étudiées dans ce cadre sont de nature environnementale (au sens large incluant la sphère privée) ou professionnelle. Les études cas-témoins comparent rétrospectivement des populations exposées ayant développé (cas) ou non (témoins) des pathologies afin d'identifier les facteurs de risques associés à l'exposition. Enfin les études de cohortes sélectionnent de manière prospective ou rétrospective des populations exposées et étudient leur état de santé pendant un certain nombre d'années, afin de déterminer si les expositions en question constituent ou non un facteur de risque pour la santé humaine. La principale différence entre les études cas-témoins et de cohortes réside donc dans le critère de sélection des sujets, centré sur le développement de pathologies dans le premier cas et sur l'exposition uniquement dans le deuxième cas.

Dans la littérature, on dénombre 14 études épidémiologiques portant sur l'effet de l'exposition pulmonaire aux particules de TiO_2 sur la santé humaine (Tableau 12) : 5 études de cas, 4 études cas-témoins et 5 études de cohortes. Les études de cas rapportent un dépôt important de TiO_2 dans les poumons des sujets exposés (Ellis et al., 2010; Elo et al., 1972; Määttä and Arstila, 1975; Ophus et al., 1979; Rode et al., 1981; Yamadori et al., 1986), mais seulement 2 études relèvent des affections

pulmonaires associées (fibrose et adénocarcinome pulmonaires) (Ellis et al., 2010; Elo et al., 1972; Yamadori et al., 1986), qui dans l'un des cas pourraient également être liées au fort tabagisme du sujet (Yamadori et al., 1986). Parmi les études cas-témoins, 2 d'entre elles mettent en évidence un lien entre l'exposition et les risques de cancers du poumon ou de la vessie (Baan, 2007; Siemiatycki, 1991; Siemiatycki et al., 1994), tandis que les 2 autres ne relèvent aucun effet significatif (Boffetta et al., 2001; Ramanakumar et al., 2008). Enfin parmi les études de cohortes, seule 1 étude rapporte un lien possible entre l'exposition au TiO_2 et des affections pulmonaires, en l'occurrence une réduction des capacités respiratoires et une apparition de plaques/épaississements pleuraux (Garabrant et al., 1987). Cependant ces résultats sont biaisés par le fait que les sujets étaient également exposés à du $TiCl_4$ et que certains d'entre eux avaient été exposés antérieurement à de l'amiante. Les 4 autres études de cohortes ne recensent aucun effet de l'exposition pulmonaire au TiO_2 sur une quelconque incidence de cancer (y compris pulmonaire) ou de maladie mortelle (Boffetta et al., 2004; Chen and Fayerweather, 1988; Ellis et al., 2010; Fryzek et al., 2003).

Tableau 12 : Etudes épidémiologiques (cas, cas-témoins ou cohortes) recensées portant sur l'effet de l'exposition pulmonaire aux particules de TiO_2 sur la santé humaine.

Références	Type	Population	Résultat
(Elo et al., 1972), d'après (Ellis et al., 2010)	Cas	Sujets exposés au TiO_2	Dépôt de TiO_2 dans le poumon et fibrose pulmonaire
(Määttä and Arstila, 1975)	Cas	3+7 travailleurs exposés au TiO_2	Présence conséquente de TiO_2 dans les lysosomes des macrophages alvéolaires
(Ophus et al., 1979)	Cas	1 homme de 55 ans exposé au TiO_2 pendant 3 ans, 4 ans avant sa mort	Dépôt conséquent de TiO_2 dans les poumons mais aucun signe d'inflammation ou de fibrose pulmonaire
(Rode et al., 1981)	Cas	1 homme de 55 ans exposé au TiO_2 (concentrations parfois > 10 mg/m^3) depuis 6 ans	Dépôt conséquent de TiO_2 dans les poumons mais aucun signe d'affection pulmonaire
(Yamadori et al., 1986)	Cas	1 homme de 53 ans emballant du TiO_2 depuis 13 ans (dont 6 sans usage de masque) et fumant 17 cigarettes/jour depuis l'âge de 13 ans	Adénocarcinome pulmonaire papillonaire, dépôt diffus de Ti dans le poumon accompagné de macrophages dans l'interstitium et les alvéoles et légère fibrose de l'interstitium au niveau des bronchioles et des vaisseaux
(Garabrant et al., 1987)	Cohorte	209 travailleurs exposés au Ti/NaCl/HCl ou $TiCl_4/TiOCl_2/TiO_2$ (0,2-2,8 mg/m^3)/(fumées de soudures), étude sur 2 semaines	Réduction des capacités respiratoires chez les sujets exposés au $TiCl_4/TiO_2$ et apparition de plaques et d'épaississements pleuraux diffus chez 17% des sujets, proportionnellement au temps d'exposition, mais pouvant être liées à une éventuelle exposition antérieure à de l'amiante
(Chen and Fayerweather, 1988)	Cohorte	1576 travailleurs exposés au TiO_2, durée de l'étude 48 ans	Pas d'effet significatif de l'exposition au TiO_2 sur l'incidence de cancers du poumon, maladies respiratoires chroniques, épaississements/plaques pleurales, fibroses pulmonaires
(Siemiatycki, 1991), d'après (Baan, 2007)	Cas-témoin	Travailleurs exposés au TiO_2	Augmentation du risque de cancer du poumon (sur 20 cas) et de la vessie (sur 28 cas)

(Siemiatycki et al., 1994)	Cas-témoin	484 sujets atteints de cancers de la vessie, 1879 sujets atteints d'autres types de cancers et 533 contrôles	Faible lien entre l'exposition au TiO_2 et le risque de cancer de la vessie (sur 28 cas) chez des peintres et des mécaniciens
(Boffetta et al., 2001)	Cas-témoin	857 hommes de 35-70 ans atteints de cancers du poumon, 533 sujets sains et 533 sujets atteints d'autres types de cancers	Pas d'effet significatif de l'exposition au TiO_2 (estimée comme allant parfois au-delà de 10 mg/m^3) sur l'incidence de cancers du poumon (sur 33 cas et 43 contrôles)
(Fryzek et al., 2003)	Cohorte	4241 travailleurs exposés au TiO_2 (0,3-6 mg/m^3) pendant au moins 6 mois	Pas d'effet significatif de l'exposition au TiO_2 sur l'incidence de cancers ou de maladies mortelles
(Boffetta et al., 2004)	Cohorte	15017 travailleurs (95% d'hommes) exposés au TiO_2 (concentrations parfois > 14 mg/m^3.an)	Pas d'effet significatif de l'exposition au TiO_2 sur l'incidence de cancers du poumon
(Ramanakumar et al., 2008)	Cas-témoin	1236 sujets atteints de cancers du poumon et 1512 contrôles	Pas d'effet significatif de l'exposition au TiO_2 sur l'incidence de cancers du poumon
(Ellis et al., 2010)	Cohorte	5054 travailleurs exposés au TiO_2 pendant au moins 6 mois	Pas d'effet significatif de l'exposition au TiO_2 sur l'incidence de cancers ou de maladies mortelles

Dans l'ensemble l'exposition pulmonaire professionnelle aux particules de TiO_2 ne semble donc pas être un facteur de risque de pathologies graves. Néanmoins le faible nombre d'études et l'absence de caractérisation systématique des niveaux d'exposition des sujets (en particulier en comparaison avec les autres facteurs de risque environnementaux auxquels ils ont éventuellement été exposés) rendent l'interprétation délicate. Par ailleurs on déplore également le fait que la taille des particules concernées ne soit jamais indiquée. Il est donc difficile d'en tirer des conclusions sur la toxicité des NP de TiO_2. Le CIRC (Centre International de Recherche contre le Cancer) a ainsi conclu en 2007 à l'absence de preuves suffisantes chez l'homme de carcinogénicité du TiO_2, quelle que soit sa taille (Baan, 2007).

D. Effets toxiques et mécanismes

La toxicité des NP de TiO_2 est un sujet de recherche en pleine expansion depuis le milieu des années 2000. Le nombre d'articles publiés sur le sujet chaque année ne cesse de croître et a dépassé en 2014 les 550 références, pour un total de 2 975 articles depuis 1996 (Figure 28). Les principaux mécanismes de toxicité rapportés sont liés à l'inflammation, au stress oxydant et à la génotoxicité (Boland et al., 2014; Skocaj et al., 2011). Ces effets seront détaillés dans les paragraphes suivants.

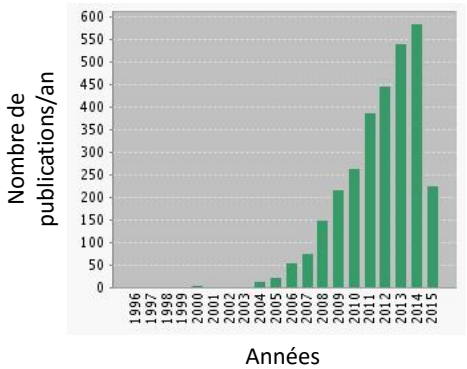


Figure 28 : Nombre d'articles scientifiques publiés chaque année depuis 1996 sur la toxicité des NP de TiO_2, d'après une recherche effectuée le 13 mai 2015 dans la base de données Web of Science™ (Thomson Reuters), selon l'équation « tox* AND (tio2 OR "titanium dioxide" OR "titanium oxide" OR "titania") AND nano* ». On en dénombre au total 2 975.

1. Mort cellulaire

La mort cellulaire, même si elle peut être bénéfique dans la lutte contre les cancers, est un des premiers marqueurs de toxicité étudiés dans les tissus sains. Elle peut être déclenchée par la cellule elle-même en réponse par exemple à une accumulation trop importante de dommages à l'ADN (Hoeijmakers, 2001). On parle dans ce cas de mort programmée, qui est généralement assimilée à de l'apoptose (Nikoletopoulou et al., 2013). L'apoptose est également appelée « mort propre », dans la mesure où elle n'induit pas d'inflammation dans les tissus environnants (Boland et al., 2014). A l'inverse la nécrose, longtemps considérée comme une mort subie, engendre une réaction inflammatoire. Les dernières avancées dans le domaine montrent qu'il existe de nombreux modes de mort cellulaire intermédiaires, comme par exemple la pyroptose (Vanden Berghe et al., 2014) et que ceux-ci peuvent être évités par d'autres processus comme l'autophagie, qui permet l'élimination et le recyclage de structures cellulaires ou d'organites entiers endommagés (Boland et al., 2014).

Si les études de toxicité commencent systématiquement par une caractérisation de l'effet de la substance en question sur la viabilité cellulaire, rares sont les études prenant la peine de caractériser le type de mort cellulaire mis en jeu (Boland et al., 2014). D'une manière générale, les études montrent que lorsque les NP de TiO_2 engendrent une mortalité cellulaire significative (quelle que soit la méthode de mesure), celle-ci reste modérée, surtout comparée à la cytotoxicité engendrée par les particules solubles (Landsiedel et al., 2014). Cette cytotoxicité atteint rapidement un plateau dépassant rarement 30% (Chusuei et al., 2013; Franchi et al., 2015; Ghosh et al., 2013; Jeong et al., 2013; Jugan et al., 2012; Park et al., 2014a; Pujalte et al., 2011; Saquib et al., 2012; Simon-Deckers et al., 2008; Wang et al., 2007). L'anatase apparait en outre souvent plus cytotoxique que le rutile ou les mélanges anatase/rutile (Landsiedel et al., 2014).

De nombreuses études ont rapporté l'induction d'apoptose à la suite d'expositions aux NP de TiO_2, notamment dans des modèles pulmonaires (Boland et al., 2014; Lee et al., 2009; Li et al., 2013; Msiska et al., 2010; Park et al., 2008, 2014a; Sauer et al., 2014; Shi et al., 2010; Srivastava et al., 2013). Ces travaux observent par des techniques de microscopie la présence de cellules ou de corps apoptotiques (Park et al., 2014a; Shi et al., 2010; Srivastava et al., 2013), une condensation de la chromatine (Park et al., 2008), ainsi que l'activation de caspases (Msiska et al., 2010; Park et al., 2008, 2014a; Sauer et al., 2014; Shi et al., 2010) et la modulation de l'expression de gènes ou de protéines impliquées dans les cascades de processus apoptotiques (BCL2, BAX, p53, caspases, etc.) (Lee et al., 2009; Li et al., 2013; Park et al., 2014a; Shi et al., 2010; Srivastava et al., 2013). D'une manière générale il semblerait que l'apoptose induite par les NP de TiO_2 soit le résultat d'une chaine d'événements débutant par la peroxydation des lipides membranaires, menant à la déstabilisation des membranes cellulaires et en particulier lysosomales, d'où une libération de cathepsine et l'activation des caspases (Boland et al., 2014). Ces phénomènes pourraient en outre être liés à un impact des NP sur les mitochondries, mais sans que l'on sache vraiment s'il s'agit d'un événement amont ou aval (résultant du stress oxydant ou de la libération d'hydrolases provenant des lysosomes déstabilisés).

Les perturbations lysosomales induites par les NP de TiO_2 pourraient également être des signes d'autophagie (Boland et al., 2014; Stern et al., 2012), hypothèse qui est d'ailleurs renforcée par l'observation directe d'autophagosomes dans des cellules exposées (Park et al., 2014b) et de perturbations mitochondriales (Yu et al., 2015). Il pourrait s'agir d'une tentative de dégradation des NP internalisées (Stern et al., 2012), ce qui est d'autant plus probable que ces NP sont la plupart du

temps stockées dans les cellules au sein de vésicules cytoplasmiques (Bruinink et al., 2015; Jugan et al., 2012; Simon-Deckers et al., 2008)...

Enfin quelques études relèvent également des signes de nécrose, mais dans une moindre mesure par rapport à l'apoptose (Ghosh et al., 2013; Gui et al., 2013a; Park et al., 2008).

2. Inflammation

Les revues de la littérature portant sur la toxicité des NP de TiO_2 mentionnent toutes le fait que l'inflammation fait partie des principaux effets rapportés (Boland et al., 2014; Chang et al., 2013; Johnston et al., 2009; Landsiedel et al., 2014; Shi et al., 2013; Skocaj et al., 2011). Nous nous focaliserons dans ce paragraphe sur les principales preuves de l'induction de phénomènes inflammatoires dans le cadre de modèles pulmonaires (animaux exposés aux NP de TiO_2 par inhalation ou cellules pulmonaires exposées *in vitro*).

D'une manière générale, les expositions pulmonaires *in vivo* sur animaux montrent l'apparition de fibroses, emphysèmes et de phénomènes inflammatoires se traduisant par une augmentation du nombre de macrophages (souvent chargés de particules) et de neutrophiles polymorphonucléaires dans les lavages broncho-alvéolaires (Johnston et al., 2009; Landsiedel et al., 2014). Cependant ces effets semblent réversibles et ce parfois dès 2-3 semaines post-exposition, sauf dans le cas des expositions les plus longues (13 semaines - 2 ans) où certains effets persistent encore 1 an après la fin de l'exposition (Landsiedel et al., 2014).

Les NP de TiO_2 paraissent induire une plus grande inflammation *in vivo* que les particules micrométriques et ce aussi bien en conditions aigues que subchroniques (13 semaines à 10-250 mg/m^3 de NP de TiO_2 dans l'air inhalé) (Landsiedel et al., 2014). Cela peut être dû au fait que les NP possèdent une plus grande surface spécifique, sont bien moins efficacement phagocytées et éliminées par les macrophages alvéolaires que les particules micrométriques (Geiser et al., 2008) et pénètrent ainsi en plus grande proportion dans les cellules épithéliales, dans l'interstitium et la circulation lymphatique (Johnston et al., 2009; Skocaj et al., 2011). Par ailleurs l'anatase semble induire plus d'effets inflammatoires que le rutile (Skocaj et al., 2011). On note enfin des différences de sensibilité aux effets des NP de TiO_2 entre les différentes espèces animales, le rat apparaissant plus sensible que les souris, elles-mêmes plus sensibles que les hamsters (Johnston et al., 2009).

De nombreuses études *in vitro* mais également *in vivo* ont de plus relevé une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires comme IL-1α, IL-1β, IL-8, IL-6, TNF-α et M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) (Armand et al., 2013; Johnston et al., 2009; Landsiedel et al., 2014; Shi et al., 2013; Val et al., 2009). Des études *in vitro* ont montré que les NP de TiO_2 pouvaient engendrer la maturation de cellules dendritiques (Boland et al., 2014). Cependant certains travaux rapportent une orientation vers un phénotype Th1, tandis que d'autres mentionnent un phénotype Th2. Enfin de nombreuses études *in vivo* ou *in vitro* indiquent des modulations de l'expression de gènes ou de protéines impliqués dans des phénomènes inflammatoires (Halappanavar et al., 2015; Husain et al., 2013; Lamoureux et al., 2010; Li et al., 2013; Park et al., 2009; Skocaj et al., 2011; Thai et al., 2015; Tilton et al., 2014; Tuomela et al., 2013; Ze et al., 2014). Des études sur des animaux exposés une seule fois par instillation intratrachéale à des aérosols de NP de TiO_2 (0,1-50 mg/kg) ont en particulier rapporté des modulations de gènes impliqués dans la synthèse de chimiokines, la chimiotaxie des cellules immunitaires et la présentation des antigènes, notamment par le système du complément

(Skocaj et al., 2011). Parmi les gènes induits, on note entre autres des gènes associés à la mise en place d'emphysèmes pulmonaires et à l'apoptose des cellules alvéolaires épithéliales.

3. Stress oxydant

Le stress oxydant fait partie des principaux effets toxiques des NP de TiO_2 rapportés dans la littérature (Johnston et al., 2009; Shi et al., 2013; Skocaj et al., 2011). Les revues portant sur le sujet le lient intimement avec les dommages oxydatifs à l'ADN (Kermanizadeh et al., 2014; Petersen and Nelson, 2010; Skocaj et al., 2011). Cependant nous traiterons ici la question de ces dommages dans le paragraphe suivant. De même des études mentionnent un lien entre le stress oxydant généré par les NP de TiO_2 et l'initiation de réponses inflammatoires via des cascades de signalisation cellulaires croisées (Johnston et al., 2009; Skocaj et al., 2011). Toutefois ces effets ayant déjà été abordés dans le paragraphe précédent, nous les laisserons ici de côté.

Les preuves du déclenchement d'un stress oxydant par les NP de TiO_2 se traduisent principalement par une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS - Reactive Oxygen Species), une diminution des réserves cellulaires en antioxydants (glutathion, etc.), une oxydation des molécules biologiques (peroxydation des lipides en particulier) et le fait que le prétraitement avec des antioxydants diminue l'amplitude de ces effets (Johnston et al., 2009; Kermanizadeh et al., 2014). Ces phénomènes ont été observés dans de nombreux modèles cellulaires *in vitro*, de cellules épithéliales pulmonaires notamment, mais également après exposition *in vivo* (pulmonaire ou autre) (Johnston et al., 2009; Shi et al., 2013).

Une des difficultés inhérentes à l'étude du pouvoir oxydant des NP de TiO_2 réside dans la maitrise de leur photoactivation (Petersen and Nelson, 2010). En effet lorsque les paires électrons/trous (e^-/h^+) ne se recombinent pas et diffusent à la surface des particules, plusieurs réactions d'oxydo-réduction peuvent avoir lieu. Les trous h^+ chargés positivement peuvent oxyder l'eau ou les ions hydroxyles situés à proximité pour produire des radicaux •OH. Les électrons e^- chargés négativement peuvent également réduire le dioxygène pour produire des radicaux $O_2•^-$, qui peuvent ensuite se dismuter en H_2O_2 et diffuser librement dans la cellule. Au contraire les radicaux, qui sont hautement réactifs, ont une durée de vie faible et sont ainsi moins susceptibles de se déplacer sur de longues distances sans réagir avec d'autres molécules. Or H_2O_2 est un précurseur du cycle réactionnel de Haber-Weiss, qui utilise les ions cellulaires Cu^+ et Fe^{2+} pour catalyser la production de radicaux •OH, via la réaction de Fenton. Par ailleurs les e^- ou $O_2•^-$ peuvent réduire les ions Cu^{2+} en Cu^+, qui peuvent réagir avec H_2O_2 ou •OH pour produire des peroxydes de cuivre. Eux-mêmes peuvent à l'image de H_2O_2 diffuser à travers les membranes cellulaires et attaquer diverses cibles moléculaires et l'ADN en particulier. Il a également été montré que le TiO_2 pouvait générer des radicaux $CO_2•^-$, qui comme les e^- de surface peuvent réagir avec le dioxygène pour produire d'autres radicaux $O_2•^-$ et ainsi alimenter de plus belle les cycles d'oxydo-réduction.

Il semblerait que le rutile conduise principalement à la génération de •OH, tandis que l'anatase produirait plutôt des espèces $O_2•^-$, H_2O_2 et radicaux peroxyles (Petersen and Nelson, 2010). Par ailleurs de nombreuses études ont confirmé que l'anatase possédait un pouvoir photocatalytique et donc oxydant supérieur à celui du rutile (Johnston et al., 2009; Skocaj et al., 2011). Cette plus grande réactivité de l'anatase pourrait être due à une énergie d'activation supérieure et une mobilité plus élevée des porteurs de charges (Skocaj et al., 2011).

Les études *in vitro* ont montré que les NP de TiO_2 étaient capables d'induire un stress oxydant significatif aussi bien en présence qu'en l'absence d'irradiation aux UV ou à la lumière naturelle (Petersen and Nelson, 2010; Skocaj et al., 2011). Cependant des études sur des cellules hépatiques humaines ou des cellules séminales de truites ont permis d'observer que l'effet de l'irradiation semblait masquer celui de la taille des particules et de leur cristallinité (Petersen and Nelson, 2010; Skocaj et al., 2011). En l'absence d'irradiation, ce qui parait être la situation la plus réaliste dans le cadre d'un modèle d'exposition pulmonaire, on constate (sur des macrophages ou des cellules hépatiques) un effet prédominant des particules les plus petites (possédant donc les surfaces spécifiques les plus élevées) (Johnston et al., 2009; Skocaj et al., 2011). Par ailleurs le stress oxydant induit semble être proportionnel à la dose de NP de TiO_2 appliquée (Johnston et al., 2009).

Une étude a observé que la production accrue de ROS dans les cellules exposées s'accompagnait d'une diminution de l'activité d'enzymes antioxydantes comme la catalase dans des cellules alvéolaires pulmonaires A549, ainsi que de la baisse des réserves cellulaires de glutathion réduit (GSH) (Srivastava et al., 2013). Cependant une autre étude ayant utilisé le même modèle cellulaire rapporte très peu d'effets sur les taux de glutathion (réduits ou totaux) et aucune altération de l'activité de la glutathion réductase (GR) ni de la glutathion peroxydase (GPx), alors même que la production de ROS est quant à elle significativement augmentée (Jugan et al., 2012). Ces divergences de résultats peuvent être dues à des différences expérimentales, comme par exemple l'utilisation de sérum dans le milieu d'exposition de la première étude et son absence dans la seconde.

Des études ont également montré que les NP de TiO_2 pouvaient induire un stress nitreux avec la production de NO dans les cellules exposées (Kermanizadeh et al., 2014) et la nitration de protéines (pouvant être contrecarrée par l'ajout d'antioxydants dans le milieu) (Johnston et al., 2009).

Enfin de nombreux travaux rapportent que les NP de TiO_2 induisent une modulation de l'expression de gènes et de protéines impliqués dans la réponse antioxydante et ce aussi bien après des expositions *in vitro* que *in vivo*, dans des modèles d'exposition pulmonaires (Ge et al., 2011; Li et al., 2013; Shi et al., 2013; Thai et al., 2015; Ze et al., 2014) ou autres (Gui et al., 2013a; Sheng et al., 2014; Shi et al., 2013). Plusieurs études en particulier relèvent un impact sur la voie de signalisation contrôlée par NRF2, un important régulateur de la réponse cellulaire antioxydante (Ge et al., 2011; Shi et al., 2013).

4. Génotoxicité

La génotoxicité, prélude d'une potentielle carcinogenèse, est sans doute l'effet toxique des nanomatériaux le plus étudié à l'heure actuelle, mais c'est également un des plus controversés (Golbamaki Bakhtyari et al., 2015; Magdolenova et al., 2014). Dans le cas des NP de TiO_2, tous modèles d'exposition confondus, le nombre d'études rapportant des effets positifs dépasse celui des études rapportant des effets négatifs (i.e. absence de génotoxicité), qui reste cependant non-négligeable (Chen et al., 2014a; Golbamaki Bakhtyari et al., 2015; Shi et al., 2013). En outre d'une manière générale les études *in vitro* génèrent plus de résultats de génotoxicité positifs que les études *in vivo*, ce qui révèle peut-être un biais dans les méthodes d'étude (Chen et al., 2014a).

Les résultats de génotoxicité et de mutagénicité obtenus à la suite d'expositions *in vitro* ou *in vivo* sur des modèles pulmonaires sont ici répertoriés. L'étude a été restreinte aux NP de TiO_2 pures non-irradiées. On dénombre 21 études *in vitro* (Tableau 13) et 6 études *in vivo* (Tableau 14). La majorité d'entre elles rapporte des cassures à l'ADN, cependant rares sont les études ayant caractérisé de

manière précise la nature de ces cassures (simple/double-brin ou sites alkali-labiles). Sur les trois études *in vitro* ayant recherché la présence de cassures doubles-brins, on relève 2 résultats positifs (Kansara et al., 2014; Toyooka et al., 2012) et 1 négatif (Jugan et al., 2012). Parmi les travaux ayant étudié la présence de lésions oxydatives (hors cassures), on dénombre 8 résultats positifs (Bhattacharya et al., 2009; Cowie et al., 2015; Gurr et al., 2005; Jugan et al., 2012; Kansara et al., 2014; Numano et al., 2014; Ursini et al., 2014; Zhang et al., 1998) et 4 négatifs (Karlsson et al., 2008, 2009; Rehn et al., 2003; Vales et al., 2014). Cette présence de lésions oxydatives rejoint le fait qu'un grand nombre d'études parmi celles examinées ici rapportent également une induction de ROS (7 résultats positifs (Bhattacharya et al., 2009; Gurr et al., 2005; Hamzeh and Sunahara, 2013; Jugan et al., 2012; Kansara et al., 2014; Srivastava et al., 2013; Toyooka et al., 2012) contre 2 négatifs (Vales et al., 2014; Wan et al., 2012)), ce qui suggère le rôle du stress oxydant dans l'apparition des dommages à l'ADN. 5 études (dont 4 *in vivo*) ont en outre relevé des effets de type inflammatoire (Driscoll et al., 1997; Lindberg et al., 2012; Naya et al., 2012; Numano et al., 2014; Ursini et al., 2014), seule une étude (in vivo) rapporte leur absence (Rehn et al., 2003). En ce qui concerne les dommages chromosomiques, 7 études en observent (Falck et al., 2009; Gurr et al., 2005; Lan et al., 2014; Prasad et al., 2013; Srivastava et al., 2011, 2013; Wang et al., 2015a) et 3 n'en observent pas (Jugan et al., 2012; Lindberg et al., 2012; Prasad et al., 2014). Enfin seules 2 équipes ont étudié et rapporté des preuves de mutagénicité (Chen et al., 2014b; Driscoll et al., 1997).

Tableau 13 : Etudes *in vitro* rapportant des résultats de génotoxicité, dommages chromosomiques (micronoyaux - "MN") ou mutagénicité sur des modèles pulmonaires exposés à des NP de TiO_2 pures, non-irradiées (UV, lumière visible, etc.).[a]

Référence	Lignée *in-vitro*	Particules de TiO_2 (pures)	Dose	ROS	IF	C-SB/DB	LO	MN	Mut.
(Jugan et al., 2012)	A549	12-142 nm, 10-118 m²/g, 100% anatase, 100% rutile ou mélange	100 µg/mL, 4-48h	oui		oui mais ~~DB~~	oui	non	
(Karlsson et al., 2008)	A549	63 nm, 24 m²/g	1-40 µg/cm², 4h			oui	non		
(Karlsson et al., 2009)	A549	63 nm et 24 m²/g (anatase/rutile), 1 µm et 2,5 m²/g (rutile)	20-40 µg/cm², 4h			oui	non		
(Wan et al., 2012)	A549	28 nm, 45 m²/g, 90% anatase/10% rutile	5-15 µg/mL, 12h	non		non			
(Toyooka et al., 2012)	A549	Anatase 5 nm ou < 5 µm	1-1000 µg/mL	faible		DB			
(Srivastava et al., 2011)	A549	Anatase 5-25 nm, 200-220 m²/g	10-50 µg/mL, 24h					oui	
(Srivastava et al., 2013)	A549	< 25 nm, 200-220 m²/g	10-50 µg/mL, 6-24h	oui				oui	
(Wang et al., 2015)	A549	Anatase < 5 nm, 200 m²/g	50-200 µg/mL, 24-72h			oui		oui	
(Lan et al., 2014)	A549	Anatase	50 µg/mL, 2-24h			oui		oui	
(Kansara et al., 2014)	A549	4-8 nm, 12-15 m²/g	8-32 µg/cm², 6-48h	oui		oui dont DB	oui		
(Ursini et al., 2014)	A549 et BEAS-2B	Anatase 79%/rutile 21%	1-40 µg/mL, 30 min-24h		oui	oui	oui		
(Falck et al., 2009)	BEAS-2B	Anatase < 25 nm, 222 m²/g ; rutile < 5 µm	1-100 µg/cm², 24-72h			oui		oui	
(Gurr et al., 2005)	BEAS-2B	Anatase (10-200 nm) ou rutile (200 nm)	10 µg/mL, 24h	oui			oui	oui	
(Prasad et al., 2013)	BEAS-2B	28 nm, 49 m²/g, 86% anatase/14% rutile ("TiO_2 P25")	Jusqu'à 100 µg/mL, 24h			oui		oui	
(Vales et al., 2014)	BEAS-2B	Anatase 22 nm	1-20 µg/mL, jusqu'à 4 semaines	non		non	non		
(Prasad et al., 2014)	BEAS-2B	"TiO_2 P25", 86% anatase/14% rutile	50 µg/mL, 24h					non	
(Cowie et al., 2015)	16-HBE14o	"TiO_2 P25", 21 nm	≈ 5 µg/cm², 24h			oui	oui		
(Hackenberg et al., 2010)	Cellules épithéliales nasales humaines primaires	Anatase < 25 nm	10-100 µg/mL, 24h			non			
(Bhattacharya et al., 2009)	IMR-90 et BEAS-2B	Anatase < 100 nm, 50 m²/g	2-50 µg/cm², 24h	oui		non	oui		
(Hamzeh and Sunahara, 2013)	V79	6-169 nm, 10-281 m²/g, 100% anatase, 100% rutile ou mélange	100 µg/mL, 24h	oui		oui			
(Chen et al., 2014)	V79	Anatase 75 nm	5-100 µg/mL, 2-48h			oui			oui

[a]ROS : espèces réactives de l'oxygène, IF : inflammation, C-SB/DB : cassures simple/double-brin, LO : lésions oxydatives de l'ADN hors cassures, Mut. : mutagénicité.

Tableau 14 : Etudes *in vivo* rapportant des résultats de génotoxicité, dommages chromosomiques (micronoyaux - "MN") ou mutagénicité sur des animaux exposés par voie pulmonaire à des NP de TiO_2 pures, non-irradiées (UV, lumière visible, etc.).[a]

Référence	Modèle biologique	Particules de TiO_2 (pures)	Dose	ROS	IF	C-SB/DB	LO	MN	Mut.
(Lindberg et al., 2012)	Cellules alvéolaires de type II et cellules Clara de souris après inhalation	Anatase (74%)/brookite(26%), 21 nm	5 jours, 4h/jour, 0,8-25,5 mg/m³		oui	non		non	
(Naya et al., 2012)	Cellules pulmonaires de rat après instillation intratrachéale	5 nm, 316 m²/g	1-5 mg/kg (une seule instillation) ou 0,2-1,0 mg/kg 1 fois/semaine pendant 5 semaines		oui	non			
(Rehn et al., 2003)	Cellules pulmonaires de rats exposés par 1 seule instillation intratrachéale	"TiO_2 P25", 20 nm	0,15-1,2 mg, jusqu'à 90 jours post-exposition		non		non		
(Driscoll et al., 1997)	Cellules alvéolaires de rats exposés par instillation intratrachéale		10-100 mg/kg, 15 mois post-exposition		oui				oui
(Zhang et al., 1998)	Rats exposés par instillation intratrachéale	TiO_2 ultrafin	1 mg			oui	oui		
(Numano et al., 2014)	Rats exposés par instillation pulmonaire	Anatase 25 nm ou rutile 20 nm	500 µg/mL 8 fois sur 2 semaines		oui		oui		

[a]ROS : espèces réactives de l'oxygène, IF : inflammation, C-SB/DB : cassures simple/double-brin, LO : lésions oxydatives de l'ADN hors cassures, Mut. : mutagénicité.

Les dommages à l'ADN mesurés par les tests de génotoxicité peuvent avoir de nombreuses origines, traduisant des effets directs ou indirects des agents génotoxiques (Magdolenova et al., 2014). La génotoxicité directe se traduit par une interaction physique entre l'agent génotoxique et l'ADN. Ce type de génotoxicité semble peu probable dans le cas des NP de TiO_2 dans la mesure où celles-ci pénètrent rarement dans le noyau (Bruinink et al., 2015; Jugan et al., 2012; Shi et al., 2013; Skocaj et al., 2011). La génotoxicité des NP de TiO_2 pourrait en revanche être indirecte et résulter de divers facteurs (Magdolenova et al., 2014) :

- le stress oxydant diffus résultant du métabolisme énergétique normal de la cellule ou engendré par les NP
- une inhibition des défenses antioxydantes de la cellule : baisse des taux de glutathion, inactivation des enzymes antioxydantes, etc.

- une réaction inflammatoire, éventuellement liée au stress oxydant généré par les NP dans les cellules immunitaires activées (neutrophiles, macrophages, etc.)
- une interaction ou un impact des NP sur des protéines nucléaires (impliquées dans la réplication de l'ADN, sa transcription ou sa réparation)
- une interaction ou un impact des NP sur le fuseau mitotique ou ses composants, ce qui peut avoir un effet aneugène, i.e. modification du nombre de chromosomes dans les cellules filles
- une perturbation des fonctions de contrôle du cycle cellulaire, pouvant engendrer des mutations, résultant par exemple de dommages à l'ADN non-réparés ; aneuploïdies ou cellules multi-nucléées.

Face à l'abondance de preuves de l'induction de stress oxydant par les NP de TiO_2, il s'agit du premier mécanisme invoqué pour expliquer leurs effets génotoxiques (Chen et al., 2014a). Les phénomènes inflammatoires sont également probablement en cause. Cependant des études ont en parallèle rapporté des preuves de la plausibilité d'autres mécanismes. On note en particulier un impact des NP de TiO_2 sur les capacités cellulaires de réparation de l'ADN, qui sont diminuées (Jugan et al., 2012), ainsi qu'une perturbation de l'expression de gènes ou de protéines impliqués (Lan et al., 2014; Tilton et al., 2014) et de régulateurs amont comme BCL2 (Shi et al., 2010; Srivastava et al., 2013), inhibiteur de la réparation de l'ADN et activateur de l'apoptose (Laulier and Lopez, 2012). Le groupe de Huang rapporte par ailleurs sur un modèle de fibroblastes un impact sur la progression mitotique, avec la formation de fuseaux mitotiques multipolaires et une mauvaise ségrégation chromosomique au cours de l'anaphase et de la télophase (Huang et al., 2009). Enfin de nombreuses études relèvent une perturbation du cycle cellulaire, notamment dans des modèles pulmonaires (Kansara et al., 2014; Lee et al., 2009; Li et al., 2013; Medina-Reyes et al., 2014; Moe et al., 2013; Prasad et al., 2013), qui se traduit la plupart du temps par une accumulation de cellules en phase S ou G2/M.

5. *Carcinogénicité*

La carcinogénicité fait partie des effets potentiels des NP de TiO_2 (Shi et al., 2013). Même si de nombreuses étapes séparent l'apparition des premiers dommages à l'ADN et le développement d'une tumeur, la génotoxicité n'en demeure pas moins la première étape de la carcinogenèse. Comme évoqué précédemment, les études épidémiologiques chez l'homme suggèrent plutôt une absence de risque des particules de TiO_2 à augmenter la fréquence des cancers chez les personnes exposées. Cependant le faible nombre d'études et le fait que les niveaux d'exposition et la taille des particules soient rarement précisément caractérisés rendent leur interprétation difficile. Toutefois le CIRC a tout de même classé le TiO_2 comme cancérogène possible dans le groupe 2B (Baan, 2007). Cette décision se base sur quelques études *in vivo* ayant en effet relevé l'apparition de tumeurs pulmonaires chez des animaux exposés par inhalation à des doses élevées de (nano)particules de TiO_2 (Shi et al., 2013). C'est le cas par exemple d'études dans lesquelles des rats ont été exposés à 250 mg/m^3 de TiO_2 micrométrique (< 2,5 µm) ou à 10 mg/m^3 de NP de TiO_2 (< 100 nm) pendant 2 ans, éventuellement suivis de 6 mois de récupération post-exposition. Néanmoins des expositions similaires chez la souris ou le hamster n'ont conduit à l'apparition d'aucune tumeur, ce qui peut être dû au fait que le hamster possède des capacités de clairance des particules plus élevées que celles du rat (Skocaj et al., 2011). Les types de tumeurs observés chez le rat incluent des adénomes broncho-alvéolaires, carcinomes de cellules squameuses et épithéliomes cystiques kératinisant (Shi et al., 2013). Par ailleurs à masse égale, il semblerait que les NP de TiO_2 présentent un potentiel carcinogène supérieur à celui des particules de TiO_2 micrométriques. Cependant cette incidence de cancers a été uniquement relevée pour des expositions par inhalation et non dans le cas d'expositions orales ou cutanées. Dans le dernier cas cette

absence d'effet pourrait être liée au fait que le TiO_2 semble incapable de traverser l'épiderme et d'atteindre les structures de peau plus profondes, du moins sur des peaux non-lésées. C'est donc sur la base des études *in vivo* par inhalation que les instances réglementaires (NIOSH et NEDO) ont établi leurs valeurs limites d'exposition recommandées pour les NP de TiO_2. Ces seuils d'exposition sont le fruit d'extrapolations des données animales via des logiciels de modélisation du tractus respiratoire. Il a ainsi été montré qu'une exposition professionnelle sur une carrière entière à 0,07-0,3 mg/m^3 de NP de TiO_2 correspondait à une augmentation de risque de 0,1% de développer un cancer du poumon.

E. Biodistribution et translocation vers d'autres organes

a. Translocation systémique

Comme évoqué précédemment, le principal mécanisme de clairance alvéolaire, à savoir la phagocytose par les macrophages, est très inefficace pour les NP, ce qui accroît les risques de pénétration des NP dans l'épithélium, ainsi que leur translocation possible vers l'interstitium pulmonaire, les circulations sanguines et lymphatiques et par conséquent vers les autres organes (Shi et al., 2013). De nombreuses études *in vivo* sur rongeurs rapportent une translocation des NP de TiO_2 depuis les poumons vers l'interstitium et la circulation systémique. Les taux de translocation semblent dépendre de la dose appliquée, de la vitesse de délivrance de cette dose et de la taille des particules inoculées, la translocation étant plus importante à masse égale pour les nano que pour les microparticules de TiO_2. Toutefois la fraction transloquée reste faible, environ 1% de la quantité inhalée après 1 semaine de récupération post-exposition. La majorité des NP parvenues au niveau alvéolaire y restent donc accumulées. La translocation semble pouvoir passer à la fois par des voies trans-cellulaires (impliquant une internalisation dans les cellules épithéliales, par endocytose ou diffusion membranaire) ou intercellulaires (via une désorganisation des jonctions intercellulaires et donc une augmentation de la perméabilité épithéliale) (Boland et al., 2014). Par ailleurs les rares NP évacuées via l'escalator mucociliaire peuvent également se retrouver dans le système gastro-intestinal et être évacuées dans les fèces (Shi et al., 2013).

Des expositions d'animaux par injection intraveineuse ou intrapéritonéale ont montré qu'une fois parvenues dans la circulation systémique, les NP de TiO_2 se retrouvent principalement dans le foie, la rate, les reins, les poumons et parfois dans les noyaux lymphatiques et le cerveau (Shi et al., 2013). Les particules accumulées dans les poumons et les reins tendent à être éliminées au bout de quelques semaines. On observe également une légère décroissance des taux accumulés dans la rate. En revanche il semblerait que les NP parvenues au foie s'y accumulent durablement. La Figure 29 résume les relations de biodistribution des NP de TiO_2 dans l'organisme.

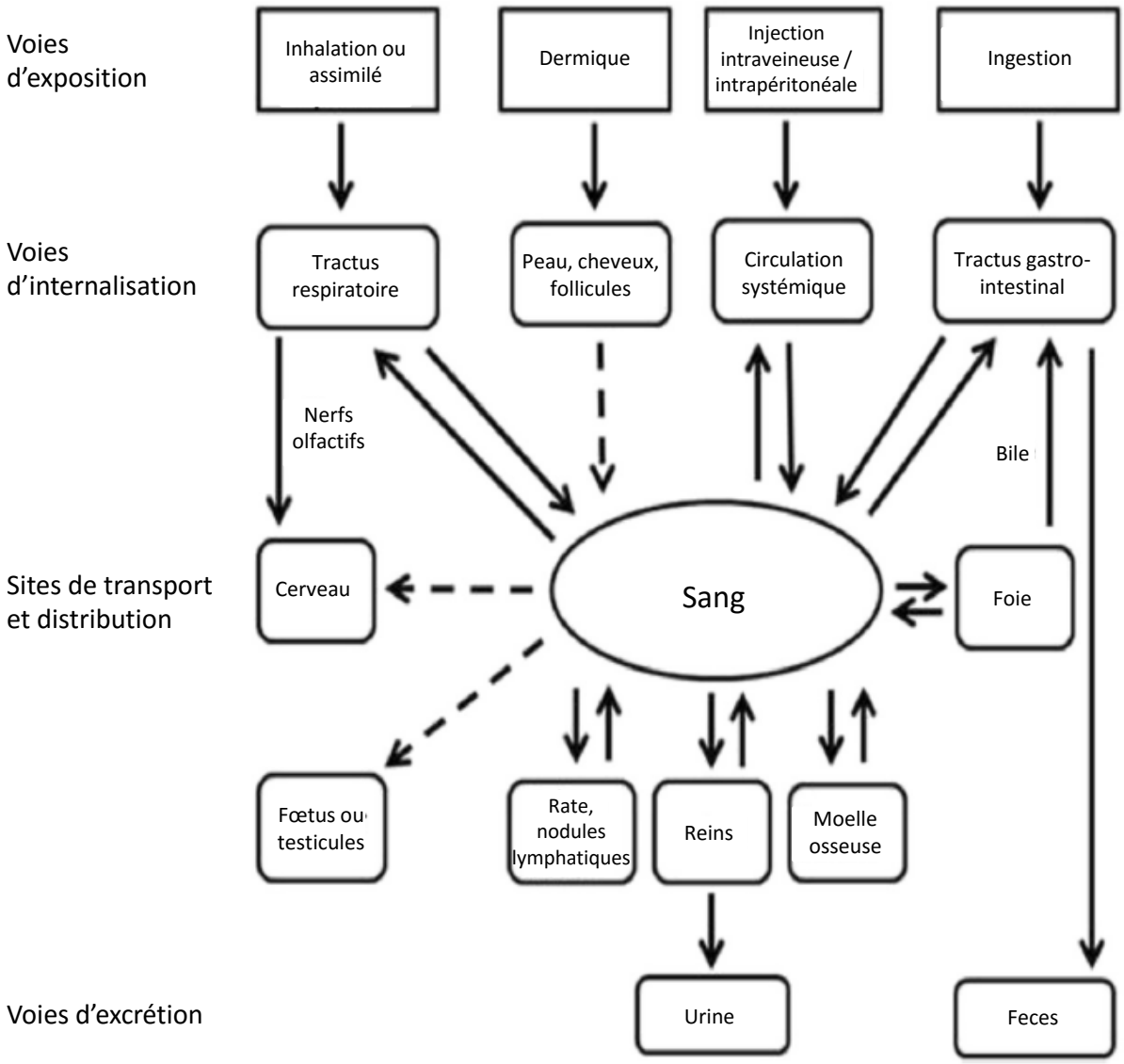


Figure 29 : Biodistribution des NP de TiO_2 dans l'organisme (Shi et al., 2013). Les flèches en pointillés indiquent des relations incertaines, tandis que les flèches pleines représentent les relations démontrées expérimentalement.

b. Translocation via le nerf olfactif

Il a été montré que les NP de TiO_2 inhalées pouvaient être transportées vers le système nerveux central via les nerfs olfactifs et causer des dommages cérébraux notamment au niveau de l'hippocampe (Czajka et al., 2015; Shi et al., 2013). Cependant le passage de ces NP à travers la barrière hémato-encéphalique fait encore débat. Des études *in vitro* ont montré que les NP de TiO_2 pouvaient endommager cette barrière (Brun et al., 2012). Par ailleurs des expositions intranasales, intrapéritonéales ou intraveineuses ont mené à une translocation des NP vers le cerveau, et y ont engendré du stress oxydant, causé des lésions (notamment à l'ADN), induit une surprolifération des cellules gliales, une nécrose tissulaire, des phénomènes inflammatoires, de l'apoptose, perturbé les niveaux de mélatonine, d'acide glutamique et l'activité acétylcholinestérase, ainsi que les niveaux d'expression de nombreux gènes, dont des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Meena et al., 2015; Shi et al., 2013; Ze et al., 2013, 2014). En revanche d'autres études *in vivo* comparables n'ont pas observé de translocation vers le cerveau (Shi et al., 2013). En parallèle une exposition par inhalation chez des rats nouveau-nés a conduit à la perturbation de l'expression d'un certain nombre de gènes

impliqués dans le développement neuronal (dans des cellules pulmonaires), ce qui constitue un autre effet indirect des NP de TiO_2 sur la neurotoxicité (Skocaj et al., 2011).

c. Translocation vers le fœtus et le nouveau-né

Des étude sur des rats ont montré que les NP de TiO_2 pouvaient traverser la barrière placentaire et atteindre le fœtus et qu'une exposition des mères par diverses voies (inhalation incluse) pouvait perturber l'expression de gènes, entrainer un dysfonctionnement micro-vasculaire, altérer le développement et induire de la neuro- et reprotoxicité chez leur progéniture (Celá et al., 2014; Kubo-Irie et al., 2014; Li et al., 2014; Mohammadipour et al., 2014; Shi et al., 2013; Stapleton et al., 2013). Des NP de TiO_2 injectées par voie intraveineuse peuvent également traverser la barrière sang-lait et être ainsi transférées aux nouveau-nés (Zhang et al., 2015).

d. Impact sur les organes secondaires après translocation

Quelques indices laissent également penser que les NP de TiO_2 pourraient avoir un impact, (inflammation, stress oxydant, mort cellulaire, etc.) sur le système cardio-vasculaire (Boland et al., 2014; Husain et al., 2015; Johnston et al., 2009; Shi et al., 2013), le foie (Alarifi et al., 2013; Azim et al., 2015; Cui et al., 2010; Abu-Dief et al., 2015; González-Esquivel et al., 2015; Husain et al., 2015; Johnston et al., 2009; Jovanović, 2015; Sha et al., 2013; Shrivastava et al., 2014; Shukla et al., 2014), la rate et les reins (González-Esquivel et al., 2015; Gui et al., 2013a, 2013b; Helmy et al., 2015; Hong et al., 2015; Huang et al., 2014; Johnston et al., 2009; Jovanović, 2015; Al-Rasheed et al., 2013). Par ailleurs les NP de TiO_2 peuvent également perturber le niveau hormonal (œstradiol et progestérone) et endommager les ovaires (avec notamment une perturbation de l'expression de gènes ovariens) (Iavicoli et al., 2013; Tassinari et al., 2014). Enfin on note qu'outre induire des pathologies, les NP de TiO_2 pourraient aggraver des affections déjà existantes comme l'asthme par exemple (Li et al., 2014; Shi et al., 2013).

F. Conclusion sur les mécanismes de toxicité et lien avec la couronne protéique

D'une manière générale, les mécanismes de toxicité évoqués dans les paragraphes précédents (inflammation, stress oxydant, génotoxicité, altération du cycle cellulaire, mort cellulaire notamment par apoptose) ont été observés dans divers types cellulaires et ne semblent donc pas spécifiques du poumon ou d'un autre organe (Boland et al., 2014; Chen et al., 2014a; Huang et al., 2009; Johnston et al., 2009; Saquib et al., 2012; Setyawati et al., 2015; Shi et al., 2013; Skocaj et al., 2011; Wang et al., 2011; Wu et al., 2010). Par ailleurs de plus en plus de preuves majoritairement obtenues dans des modèles non-pulmonaires indiquent que les NP de TiO_2 pourraient également perturber et désorganiser le cytosquelette des cellules exposées (Bernier et al., 2012; Gheshlaghi et al., 2008; Hou et al., 2014; Huang et al., 2009; Li et al., 2013; Mao et al., 2015; Marquez-Ramirez et al., 2012; Sheng et al., 2014; Sund et al., 2014; Tay et al., 2014; Tilton et al., 2014). Les processus d'échange d'ions, d'exocytose et plus généralement de transport moléculaire pourraient également être perturbés (Dorier et al., 2015; Ge et al., 2011; Gou et al., 2010; Halappanavar et al., 2011; Husain et al., 2013; Kim et al., 2013; Sheng et al., 2014; Tilton et al., 2014; Wang et al., 2015b).

Les mécanismes de toxicité des NP de TiO_2 pourraient être intimement liés à l'interaction directe et à l'adsorption de protéines sur ces NP, formant ce que l'on appelle une « couronne protéique » (Boland et al., 2014; Lundqvist, 2013; Lynch et al., 2013). Il a en effet été montré pour de nombreux types de nanomatériaux que cette couronne, qui se forme dès la première interaction avec une matrice biologique et peut avoir une composition quantitative et qualitative dynamique (Sund et al., 2011), pouvait influencer leur état d'agglomération, biodistribution, internalisation dans les cellules, réactivité et toxicité (Boland et al., 2014; Lundqvist, 2013; Lynch et al., 2013). Par ailleurs l'interaction

directe protéine-NP peut conduire à l'inactivation des protéines concernées par changement conformationnel ou dénaturation. On observe que les NP de TiO_2 interagissent avec des protéines de jonction intercellulaires, des enzymes métaboliques, des protéines du cytosquelette, des protéines membranaires et des cytokines. En outre les protéines plasmatiques (contenues par exemple dans le sérum de veau fœtal utilisé couramment dans les milieux de culture *in vitro*), qui sont toutes glycosylées, se lient également fortement à ces NP, ainsi que quelques protéines contenues dans des lysats cellulaires de macrophages ou de cellules alvéolaires A549 (Sund et al., 2011). L'adjonction de surfactant pulmonaire perturbe légèrement la quantité de protéines adsorbées, mais peu leur nature. Enfin le TiO_2 étant connu depuis longtemps pour sa forte affinité pour les groupements phosphates (Imamura et al., 2012), il parait légitime de supposer que les NP de TiO_2 internalisées dans les cellules puissent interagir avec les phosphoprotéines, ce qui pourrait perturber les processus de signalisation cellulaire par phosphorylation. Une perturbation du niveau de phosphorylation de plusieurs kinases a d'ailleurs été observée dans des cellules bronchiques BEAS-2B (Ge et al., 2011). Cependant aucune étude n'a à ce jour étudié la composition de la couronne protéique de NP de TiO_2 extraites de cellules exposées.

L'ensemble des études expérimentales *in vitro* et *in vivo* examinées ici et dans les paragraphes précédents nous renseigne sur les dangers et les mécanismes de toxicité des NP de TiO_2. Cependant il convient de prendre garde au fait que la majorité d'entre elles a été réalisée à des doses très élevées comparées aux doses d'expositions humaines réalistes et à des temps d'exposition très courts. Par conséquent il parait pour l'instant délicat d'extrapoler ces données aux risques réels pour la santé humaine.

Objectif, hypothèses et stratégie :

Nous avons pu constater au cours de cette introduction que compte tenu du fort développement des applications des NP de TiO_2, l'homme risquait de plus en plus d'y être exposé, notamment par inhalation dans le cadre professionnel. Le compartiment du tractus respiratoire le plus concerné par le dépôt de NP est la zone alvéolaire. Notre équipe a précédemment montré que les NP de TiO_2 pouvaient induire dans des cellules alvéolaires divers effets toxiques, dont des dommages à l'ADN et une diminution des capacités cellulaires de réparation de l'ADN. Par ailleurs, le TiO_2 ayant une forte affinité pour les groupements phosphates, les NP de TiO_2 internalisées dans les cellules pourraient perturber les voies de signalisation cellulaires par phosphorylation, qui jouent notamment un rôle important dans la régulation de la réparation de l'ADN.

L'objectif ici est d'étudier les mécanismes menant à la diminution des capacités cellulaires de réparation de l'ADN par les NP de TiO_2. Ce projet a été réalisé sur le modèle *in vitro* de cellules alvéolaires pulmonaires A549, dans des conditions d'exposition similaires à celles des études antérieures réalisées au laboratoire et en ciblant une des références commerciales de NP de TiO_2 les plus étudiées à l'heure actuelle, tant pour ses applications que pour sa toxicité, à savoir les TiO_2 Aeroxide® P25, commercialisées par Evonik.

Les hypothèses pouvant expliquer la diminution de l'activité de réparation de l'ADN consécutive à une exposition aux NP de TiO_2 sont résumées dans la Figure 30. Ces NP pourraient tout d'abord engendrer une diminution de l'expression des gènes et des protéines de réparation de l'ADN, ce qui aurait pour conséquence de diminuer le renouvellement des réserves cellulaires en protéines de réparation. Les NP de TiO_2 internalisées dans les cellules et stockées dans le cytoplasme pourraient en outre perturber le phosphoprotéome. Cette perturbation pourrait impacter la réparation de l'ADN de plusieurs manières : via un impact sur les kinases/phosphatases régulatrices de la réparation ou à travers une séquestration des phosphoprotéines (dont une grande partie des protéines de réparation de l'ADN font partie) à la surface des NP. Les protéines ainsi adsorbées à la surface des NP pourraient en conséquence subir des dommages (par exemple conformationnels ou oxydant) menant à leur inactivation. Enfin leur séquestration pourrait les empêcher de rejoindre leur lieu d'action (i.e. le noyau dans le cas de protéines de réparation de l'ADN) et ainsi de remplir leur rôle.

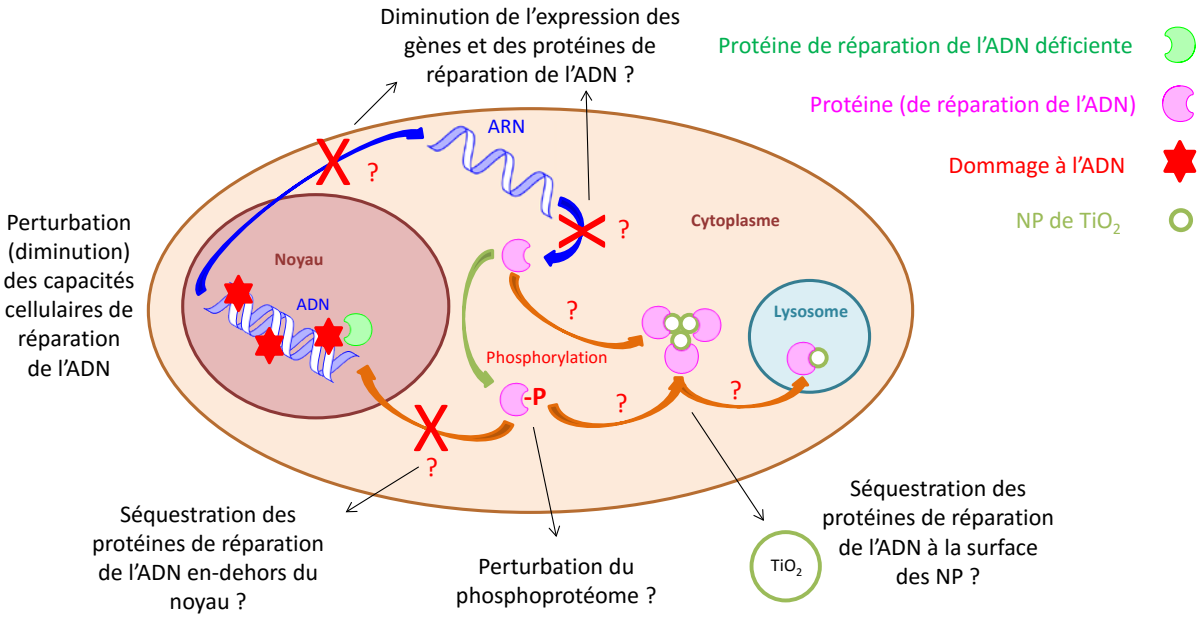


Figure 30 : Représentation schématique des hypothèses pouvant expliquer la diminution des capacités cellulaires de réparation de l'ADN consécutives à une exposition de cellules pulmonaires à des NP de TiO_2.

Pour étudier ces hypothèses nous avons établi une stratégie en trois axes. Nous avons premièrement étudié l'impact des NP de TiO_2 sur l'expression des gènes et des protéines de réparation d'ADN, ainsi que sur les régulateurs amont de cette expression (méthylation des promoteurs des gènes, expression de régulateurs transcriptionnels, activité du protéasome). Puis nous avons étudié l'influence de ces NP sur le phosphoprotéome des cellules exposées. Enfin nous avons validé une partie des résultats obtenus sur la lignée cellulaire pulmonaire non-cancéreuse BEAS-2B.

Matériels et méthodes :

I. Dispersion par sonication et caractérisation des suspensions de nanoparticules par DLS

Les NP utilisées ici sont des NP de TiO_2 commerciales (Aeroxide ® P25, Evonik). Leur caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes : forme sphérique, 86% anatase, diamètre de 24 nm, surface spécifique de 46 m²/g, point isoélectrique de 7,0 (Jugan et al., 2012).

A. Dispersion par sonication

Les NP sont dispersées dans de l'eau ultrapure stérile par 30 min de sonication à 4°C en mode pulsé 1 s on / 1 s off, à la concentration de 10 mg/mL, selon une méthode précédemment mise au point au laboratoire (Simon-Deckers et al., 2008). L'appareil utilisé est un sonicateur Autotune 750 W, Bioblock Scientific, réglé à 30% d'amplitude, ce qui correspond d'après la méthode calorimétrique à 19,82 W (Taurozzi et al., 2011). Ce sonicateur est muni d'une sonde plongée dans la suspension de NP soniquée. Les suspensions de NP sont diluées dans le milieu d'exposition juste avant exposition des cellules.

B. Mesure du diamètre hydrodynamique par DLS

Le diamètre hydrodynamique des NP en suspension est mesuré par Dynamic Light Scattering (DLS) grâce à un ZetaSizer nano ZS (Malvern) avant chaque exposition de cellules (paramètres : viscosité de l'eau 0,8872 cP, indice de réfraction du matériau 2,70, absorption du matériau 0,010, indice de réfraction de l'eau 1,330, concentration de la suspension 10 µg/mL). La diffusion dynamique de la lumière, aussi appelée spectroscopie par corrélation de photons, est une technique permettant la mesure du diamètre hydrodynamique de particules en suspension, c'est-à-dire du diamètre réel des particules auquel on ajoute la correction due à la couche de solvatation[8]. La zone de précision de cette méthode s'étend environ de 1 à 1000 nm. La suspension de particules est traversée par un faisceau de lumière, qui est dévié au contact des particules et cette déviation fluctue en fonction du mouvement brownien des particules. Ces fluctuations sont détectées par un photomultiplicateur et analysées, afin de remonter à la vitesse du mouvement brownien des particules, et par là-même via l'équation de Stokes-Einstein, à leur diamètre en solution (en fonction de la viscosité du solvant).

II. Modèles cellulaires, culture et exposition des cellules aux nanoparticules

A. Modèles cellulaires

1. La lignée cellulaire alvéolaire A549

La lignée cellulaire A549 est constituée de cellules alvéolaires de type II, isolées en 1972 d'un adénocarcinome chez un homme de 58 ans de type caucasien (cf. fiche ATCC_A549)[9] (Giard et al., 1973). Il s'agit à ce jour de la seule lignée cellulaire alvéolaire disponible commercialement.

En condition de culture submergée classique, elles ne forment pas de jonctions serrées (BéruBé et al., 2009; Winton et al., 1998), mais il a tout de même été montré qu'elles présentaient une structure

[8] http://www.malvern.com/fr/products/technology/dynamic-light-scattering/, consulté le 09/06/2015
[9] http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx?geo_country=fr, consulté le 18/05/2015

polarisée (Foster et al., 1998). Pour qu'elles forment des jonctions serrées, il semblerait qu'il faille les cultiver à l'interface air-liquide (BéruBé et al., 2009).

Tout comme les cellules alvéolaires de type II natives, les cellules A549 présentent des corps lamellaires (Foster et al., 1998), en revanche la composition du surfactant qu'elles sécrètent est légèrement différente de celle du surfactant pulmonaire sécrété *in vivo* (BéruBé et al., 2009). Les cellules A549 sont capables de synthétiser des phosphatidylcholines via la voie cytidine diphosphocholine, tout comme les cellules alvéolaires de type II primaires. Elles expriment également le récepteur de la SP-A. Cependant elles ne synthétisent pas les protéines SP-A et SP-C. Par ailleurs elles sont inaptes à se différencier en cellules alvéolaires de type I (Foster et al., 1998).

A la différence des cellules somatiques humaines, qui présentent un caryotype diploïde (i.e. chacun des 23 chromosomes est présent en 2 exemplaires (respectivement maternel et paternel), ce qui représente 46 chromosomes au total), les cellules A549 ont un caryotype hypotriploïde : 24% des cellules possèdent 66 chromosomes, 22% en possèdent 64, de larges proportions également en ont 65 ou 67, mais moins de 0,4% en présentent davantage (cf. fiche ATCC_A549). La plupart des cellules possèdent 2 chromosomes X et 2 chromosomes Y. Toutefois 40% d'entre elles ne possèdent que 1 ou 0 chromosome Y. Les chromosomes N2 et N6 sont majoritairement présents en 1 seul exemplaire par cellule, tandis que N12 et N17 le sont généralement en 4 exemplaires.

Malgré son caryotype modifié, cette lignée cellulaire présente un statut p53 natif (cf. fiche ATCC_A549). En revanche une perte d'hétérozygotie couplée à une mutation sur l'allèle restant du gène *KEAP1* ont été rapportées (Singh et al., 2006). La protéine KEAP1 exerce normalement une activité menant à la séquestration cytoplasmique et à la dégradation de NRF2 par le protéasome (Niture and Jaiswal, 2012; Singh et al., 2006). NRF2 est un activateur transcriptionnel d'une multitude de gènes intervenant dans la réponse cellulaire au stress oxydant. La mutation de la lignée A549 sur le gène *KEAP1* aurait pour effet de supprimer la séquestration cytoplasmique de NRF2 par KEAP1 (Singh et al., 2006). En d'autres termes, cela signifie que les cellules A549 présenteraient une réponse antioxydante locale plus forte que la normale. Cependant la base de données COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), qui répertorie entre autres les mutations somatiques des différentes lignées cellulaires cancéreuses, ne mentionne aucunement cette mutation[10].

[10] http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/sample/overview?id=905949, consulté le 08/06/2015

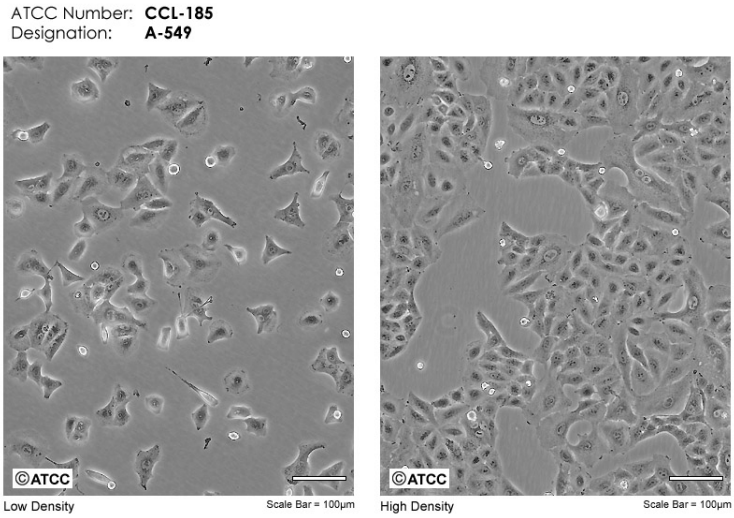


Figure 31 : Morphologie vue de dessus des cellules A549 en culture (cf. fiche ATCC_A549).

2. *La lignée cellulaire bronchique BEAS-2B*

La lignée cellulaire BEAS-2B est constituée de cellules épithéliales bronchiques. A la différence des cellules A549, les BEAS-2B ne sont pas issues d'une tumeur, mais d'une immortalisation par transfection d'un adénovirus 12-SV40 (cf. fiche ATCC_BEAS-2B)[11]. Leur caryotype est diploïde et leur gène *KEAP1* non-muté, ce qui leur confère un statut NRF2 natif et donc une réponse antioxydante associée "normale" (Singh et al., 2006).

Sur le plan morphologique, les cellules BEAS-2B sont non-ciliées, ne sécrètent pas de mucus ni de surfactant et forment à l'image des A549 un épithélium non-jointif (caractérisé par l'absence de jonctions serrées entre les cellules) (BéruBé et al., 2009).

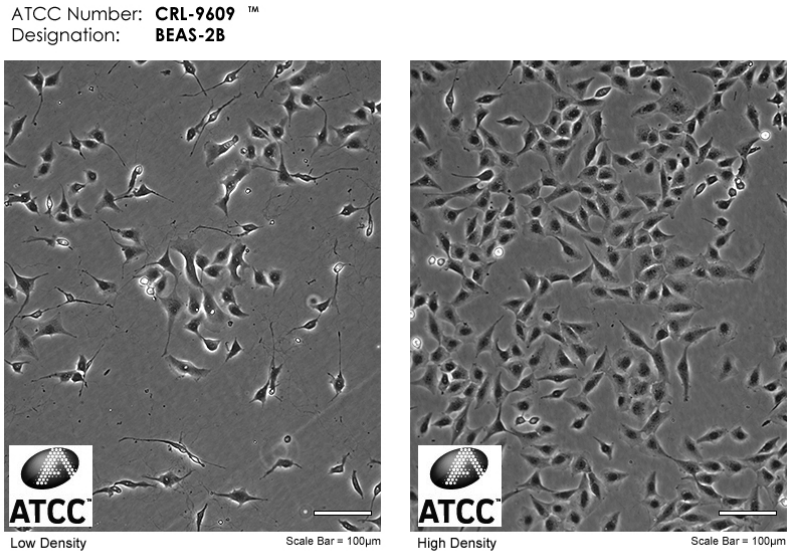


Figure 32 : Morphologie vue de dessus des cellules BEAS-2B (cf. fiche ATCC_BEAS-2B).

[11] http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9609.aspx, consulté le 18/05/2015

B. Culture et exposition des cellules aux nanoparticules

La lignée de cellules épithéliales alvéolaires A549 (ATCC, CCL-185), ainsi que la lignée de cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B (ATCC, CRL-9609) sont cultivées dans du DMEM (Gibco, 11960-044), dans des conditions précédemment décrites (Jugan et al., 2012), c'est-à-dire avec ajout de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 50 IU/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère à 37°C, contenant 5% de CO_2, à saturation d'humidité et sont repiquées par trypsination deux fois par semaine. Les cellules sont ensemencées 3 jours avant exposition aux NP, de manière à ce qu'elles soient confluentes le jour de l'exposition. L'exposition a lieu dans du milieu de culture sans SVF. Le schéma expérimental se compose systématiquement d'au moins 3 flasques/puits par condition. La manipulation des NP avant et après exposition des cellules est réalisée avec le moins de lumière naturelle ou artificielle possible, afin de limiter au maximum la photo-activation des NP. Après exposition aux NP, les tapis cellulaires sont rincés trois fois au PBS (Gibco, 14190-094) et sauf indication contraire les cellules sont récoltées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA 0,05% (Gibco, 25300-062), additionnée de 0,5% de polyvinylpyrrolidone (PVP) dans le cas des cellules BEAS-2B.

III. Etude de l'expression des gènes par RT-qPCR

A. Principe de la méthode

L'étude de l'expression des gènes par RT-qPCR (Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction) débute par l'extraction de l'ARN des cellules et la dégradation de l'ADN génomique. Cet ARN est ensuite rétro-transcrit en ADN complémentaire à l'aide d'une transcriptase inverse. L'ADN complémentaire (constitué uniquement d'exons) est enfin amplifié par qPCR. Cette amplification est réalisée grâce à une polymérase à ADN stable et active à température élevée (72°C). L'enzyme est tout d'abord activée par incubation de 5 min à 95°C, puis 40 cycles de température (95°C pendant 15 s, 55°C pendant 20 s et 72°C pendant 40 s) sont effectués. Le temps d'incubation à 72°C est optimisé pour que chaque cycle laisse le temps à la polymérase de répliquer entièrement le segment d'ADN désiré. La délimitation de ce segment passe par l'ajout en large excès dans le mélange réactionnel de deux amorces (directe et indirecte). Chacune de ces amorces est complémentaire d'une extrémité différente et d'un brin différent du segment d'ADN double-brin à amplifier. La conception de ces amorces se doit de répondre à un certain nombre de critères. Le risque d'auto-appariement des amorces doit par exemple être réduit. Par ailleurs il est préférable qu'au moins l'une des deux amorces soit située à cheval sur la jonction entre deux exons et ce afin de réduire le risque d'amplification d'ADN génomique résiduel contenu dans les échantillons. L'efficacité d'un couple d'amorces se mesure par le coefficient multiplicateur par lequel la quantité d'ADN (du segment d'intérêt) est multipliée à chaque cycle. L'efficacité théorique est de 2 (il s'agit de la valeur expérimentale à atteindre idéalement). L'intérêt de la PCR quantitative par rapport à la PCR en point final est que la qPCR est réalisée dans un appareil capable d'effectuer une lecture de fluorescence de chaque puits à chaque cycle. La méthode la plus courante consiste à ajouter dans le milieu réactionnel un intercalant (fluorophore) de l'ADN double-brin comme par exemple le Sybr Green. Il est ainsi possible de suivre précisément l'évolution de l'amplification, qui se traduit par une augmentation de la fluorescence au cours du temps. L'étude de cette courbe permet la comparaison relative des quantités d'ADN matrice présentes au départ dans chacun des échantillons. Cette quantification relative nécessite la définition d'un seuil de fluorescence et la mesure du temps (mesuré en nombre de cycles et noté "Cq") à partir duquel chaque courbe d'amplification franchit ce seuil. La quantité d'ADN matrice présente au départ dans un échantillon A est égale à celle présente dans tout échantillon B modulo le facteur multiplicateur $E^{Cq_B - Cq_A}$ où E est

l'efficacité de la réaction. La spécificité de l'amplification peut être vérifiée par l'établissement d'une courbe de fusion (i.e. mesure de la fluorescence sur une rampe de température allant de 55 à 95°C en fin d'amplification). En effet à chaque produit d'amplification (caractérisé par son nombre de paires de bases et sa composition nucléotidique) correspond une température de fusion à laquelle l'ADN double-brin se dissocie en deux ADN simples-brins. Cette fusion se traduit par une disparition de la fluorescence associée à l'appariement des deux brins, d'où l'observation d'un maximum sur l'opposé de la dérivée de la courbe de fusion. Lorsque l'on utilise la qPCR pour étudier l'expression relative de gènes entre différentes conditions, il est nécessaire de normaliser les résultats par rapport à des gènes de référence dont le taux d'expression ne varie pas entre les conditions d'étude. L'aptitude d'un gène à servir de gène de référence peut être étudiée grâce à des méthodes statistiques comme par exemple la méthode BestKeeper (Pfaffl et al., 2004). Celle-ci analyse les variations d'expression des gènes candidats dans les différentes conditions expérimentales, en comparant en particulier chacun des gènes à un gène modèle appelé index BestKeeper, dont les Cq sont définis comme la moyenne géométrique des Cq des gènes candidats. La déviation standard de chacun des gènes doit être la plus faible possible et impérativement inférieure à 1, tandis que le coefficient de corrélation avec l'index Bestkeeper doit quant à lui être le plus élevé possible.

B. Détails expérimentaux

Notre analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR est basée sur un protocole précédemment décrit (Forestier et al., 2012). L'ARN est extrait de culots cellulaires (congelés à -80°C après récolte) grâce au kit GenElute™ mammalian total RNA miniprep kit (Sigma) selon les recommandations du fournisseur et avec l'étape optionnelle de traitement à la DNase (Sigma, on-column DNase I digestion set). La concentration et la pureté de l'ARN (rapports d'absorbance A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230}) sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific).
La transcription inverse en ADN complémentaire (ADNc) et la qPCR sont respectivement réalisées grâce au kit SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Life Technologies) et via un thermocycleur MX3005P (Stratagene), dans des plaques 96 puits. Chacun des trois échantillons biologiques de chaque condition d'exposition y est déposé en duplica. Le mélange réactionnel est composé de 5 µL d'ADNc dilué 25 fois dans de l'eau ultrapure après transcription inverse, 12,5 µL de Mesa Blue qPCR™ Mastermix Plus for Sybr® Assay Low ROX (Eurogentec, RT-SY2X-03+WOULRB), 2,5 µL d'amorce directe à 2 µM, 2,5 µL d'amorce indirecte à 2 µM et 2,5 µL d'eau ultrapure sans nucléase. Les amorces purifiées par cartouche RP sont achetées à Eurogentec (

Tableau 15). La qPCR est réalisée selon le programme de température suivant : 5 min à 95°C, puis 40 cycles d'amplification (95°C pendant 15 s, 55°C pendant 20 s et 72°C pendant 40 s) et la courbe de fusion est enfin tracée selon les recommandations de Stratagene (1 min à 95°C, 30 s à 55°C et 30 s à 95°C). La spécificité d'amplification est vérifiée par la présence d'un seul pic de fusion par produit. Par ailleurs la taille du segment amplifié est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium. Le seuil de Cq est fixé d'après les paramètres par défaut du logiciel Mx-Pro 3.20 (Stratagene). Des puits « blancs » sans matrice sont réservés sur chaque plaque PCR afin de confirmer l'absence de contamination du milieu réactionnel et/ou d'auto-appariement des amorces. Conformément aux recommandations MIQE pour la qPCR (Bustin et al., 2009), les données ne sont considérées satisfaisantes que lorsque la différence de Cq entre le blanc et le Cq d'échantillon le plus élevé est au moins supérieure à 5. Le même critère de qualité est appliqué aux contrôles ARN (i.e. ARN non rétro-transcrit et dilué 25 fois pour être en concentration comparable avec les échantillons d'ADNc et constituer un contrôle de l'absence d'amplification aspécifique d'ADN génomique). Les données sont normalisées grâce à trois gènes de référence : GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), S18 (18S ribosomal 1) et CYCLOB (cyclophiline B). Ces gènes ont été choisis à l'aide de l'outil Excel de corrélation par paires BestKeeper (Pfaffl et al., 2004). Ces trois gènes de référence présentent dans les conditions d'étude des déviations standard inférieures à 1 et un fort degré de corrélation avec l'index BestKeeper. La normalisation de l'expression des ARNm et l'analyse statistique sont réalisés avec le logiciel REST 2009 (Qiagen, (Pfaffl, 2001)), d'après la méthode des ΔΔCq et un test de randomisation par réallocation fixe de paires. Les efficacités de PCR sont vérifiées expérimentalement à l'aide d'un mélange de l'ensemble des échantillons, avec un critère de qualité de 2 ± 0,3, satisfait pour l'intégralité des amorces utilisées et la valeur théorique de 2 est utilisée pour les calculs.

Tableau 15 : Informations détaillées sur chaque couple d'amorces qPCR utilisé.[a]

Symbole du gène	NCBI	Amorce directe (5'->3')	Amorce indirecte (5'->3')	Taille du produit (pb)
APE1/Ref1	NM_001641.2	gctgcctggactctctcatc	gctgttaccagcacaaacga	180
APTX	NM_175073.1	cagcgaatcagacttccaca	gagtcaatgctggtgggatt	167
Artemis	NM_001033858.1	tgttgtctctggcattcagc	attgaggccagaggaagtga	167
ATM	NM_000051.3	ggacagtggaggcacaaaat	gtgtcgaagacagctggtga	187
BCL2	NM_000633.2	gaactgggggaggattgtgg	catcccagcctccgttatcc	164
BRCA1	NM_007294.3	ctgcttgaagtctcccttgg	actctgtgcttccagcccta	176
BRCA2	NM_000059.3	taggaggccaagttccctct	ggtatgagccatccaccatc	187
CSA	NM_000082.3	cggtgtgaggacacgatatg	cacaccatctgaaccacctg	218
CSB	NM_000124.2	gaaacggcagaagaaagtgc	aatcgtcctccagcttcaga	224
CycloB	NM_000942.4	gcaagatcgaggtggagaag	ctgtggaatgtgaggggagt	171
DDB1 (XPE)	NM_001923.3	aacagagtggcgagagcatt	tcaatgacatgcagctcctc	223
DDB2 (XPE)	NM_000107.2	tcaaggacaaacccaccttc	gtgaccaccattcggctact	226
DNAPKcs	NM_006904.6	catggaagaagatccccaga	tgggcacaccactttaacaa	198
E2F1	NM_005225.2	acaaggcccgatcgatgttt	gttcttgctccaggctgagt	185
ERCC1	NM_202001.1	ttgtccaggtggatgtgaaa	gctggtttctgctcataggc	151
GAPDH	NM_002046.3	gagtcaacggatttggtcgt	ttgattttggagggatctcg	238
hHR23B / Rad23 (B)	NM_002874.4	gtgaccaaacccaaagcagt	ggtgtctctgctggcttttc	248
Ku70/XRCC6	NM_001469.3	agaggagctgaagacccaca	cctctggtcagtcctggaag	155
Ku80/XRCC5	NM_021141.3	ccccaattcagcagcatatt	ccttcagccagactggagac	235
LIG1	NM_000234.1	aggagtggaatggagtggtg	aggtgtcagagagggaagca	207
LIG3	NM_013975.2	gctcagcaggagatggtttc	tctaggtcccgtgccatatc	160
LIG4	NM_002312.3	ggacgatttctcccgtttttt	gcggtgatgaatcttctcgt	186
MGMT	NM_002412.3	tggagctgtctggttgtgag	ctggtgaacgactcttgctg	232
MLH1	NM_000249.2	gtgctggcaatcagggaccc	cacggttgaggcattgggtag	215
PMS1	NM_000534.4	gcggcaacagttcgactcctt	agccttgataccctccccgtt	174
MRE11	NM_005591.3	cccagaggagcttgactgac	ttcattttcctgggcaagtc	180
MSH3	NM_002439.2	gagagtaatgataattaccg	aggcaatggcaattccatca	305
MSH6/GTPB	NM_000179.2	ccctcagccaccaaagaagca	ctgccaccacttcctcatccc	288
Nbs1	NM_002485.4	ttggttgcatgctcttcttg	ggctgcttcttggactcaac	233
NRF2	NM_006164.4 ; NM_001145413.2 ; NM_001145412.2	cagtcagcgacggaaagagt	acctgggagtagttggcaga	198
NTH1	NM_002528.5	cagcaacagctggtcaacat	cgtcacctggtctttggttt	165
OGG1	NM_002542.5	tggaagaacagggcgggcta	atggacatccacgggcacag	164
PARP1	NM_001618.3	gctcctgaacaatgcagaca	cattgtgtgtggttgcatga	233
PCNA	NM_002592.2	ggctctagcctgacaaatgc	gcctccaacaccttcttgag	224
POLα1	NM_016937.3	ctcattgcaacgtggttggg	gggctccatatctgttcccg	216
POLβ	NM_002690.1	gagaagaacgtgagccaagc	cgtatcatcctgccgaatct	204
POLε	NM_006231.2	gtcacaggctctcggaactc	cctcaggaagcacgtaggag	247
RAD50	NM_005732.2	cttggatatgcgaggacgat	ccagaagctggaagttacgc	215
RAD54	NM_003579.3	ccatcgagccctgactttgt	tttgaccatctcgccagacc	154
S18	NR_003286.2	aacgtctgccctatcaacttt	tggatgtggtagccgttttct	117
UNG	NM_080911.1	aatggcagctgtatccaacc	caccccaacatctgtcactg	247
XPA	NM_000380.3	gcagccccaaagataattga	tggcaaatcaaagtggttca	183
XPB/ERCC3	NM_000122.1	gcggcagagattcttggtag	ggccccagacatagaactca	235
XPC	NM_004628.4	ccatgaggacacacacaagg	tccaatgaaccacttcacca	187
XPD/ERCC2	NM_000400.3	gctggacatctaccccaaga	ccggatcacagcaatatcct	166
XRCC1	NM_006297.2	cagccctacagcaaggactc	gctgtgactggggatgtctt	209
XRCC4	NM_003401.3	cattgttgtcaggagcagga	tctgcaggtgctcatttttg	219

[a]Symbole du gène, numéro d'identification NCBI (National Center or Biotechnology Information), séquence 5'->3' des amorces directes et indirectes et taille du produit amplifié en paires de bases (pb).

IV. Etude de l'expression des protéines par Western-Blot

A. Principe de la méthode

Le western-blot est une technique très utilisée en biologie moléculaire pour la détection et la quantification relative de protéines. Après récolte des cellules, une extraction protéique totale est réalisée (en présence d'antiprotéases) et la concentration totale en protéines est mesurée. Cette mesure s'effectue par comparaison avec une gamme de concentration connue d'une protéine donnée (généralement l'albumine de sérum bovin), à l'aide par exemple du réactif de Bradford dont l'absorbance en solution varie linéairement avec la concentration protéique (dans une certaine gamme). Les échantillons protéiques sont ensuite dénaturés (par voie thermique et chimique), avant d'être déposés en masse égale de protéines totales dans les différents puits d'un gel de polyacrylamide. Une électrophorèse est réalisée, permettant la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire (plus une protéine est petite et légère, plus elle migre vite et donc loin). Une fois la migration achevée, le gel est démoulé et une deuxième électrophorèse est réalisée afin de transférer les protéines séparées depuis le gel vers une membrane (généralement constituée de nitrocellulose). Cette membrane est ensuite incubée dans une solution protéique (d'albumine de sérum bovin ou de lait par exemple), dans le but de bloquer l'ensemble des sites de fixation protéiques. Un anticorps primaire est alors ajouté à la solution. Cet anticorps étant spécifique d'une protéine d'intérêt présente sur la membrane, il remplace peu à peu les protéines bloquantes au niveau de cette protéine d'intérêt. Après rinçages un anticorps secondaire est ajouté. Ce dernier doit être capable de se lier de manière spécifique au premier anticorps (spécificité obtenue en choisissant un anticorps secondaire dirigé vers les immunoglobulines de l'espèce animale ayant servi à la production de l'anticorps primaire). La détection est le plus souvent basée sur le fait que l'anticorps secondaire puisse réagir avec un substrat dans une réaction de chimiluminescence émettrice de lumière. Le recueil de cette lumière et la comparaison de son intensité entre les différents échantillons permet le dosage relatif de la protéine d'intérêt. Cependant la méthode de normalisation basée sur la quantité totale de protéines déposée dans chaque puits n'étant pas parfaite, une normalisation supplémentaire a été employée. Celle-ci est basée sur la technologie Stain-Free™ de BioRad, qui permet la coloration des résidus tryptophanes au sein du gel et sur la membrane. Cette technique fournit ainsi une estimation de la quantité totale de protéines réellement déposée dans chaque puits.

B. Détails expérimentaux

Les extraits protéiques totaux sont obtenus à partir de culots cellulaires (congelés à -80°C après récolte) par 10 min de centrifugation à 16 000 rcf, 4°C, dans du tampon de lyse Cell Lytic Buffer (Sigma, C2978) avec inhibiteurs de protéases (1 pastille pour 10 mL de tampon, Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche, 11 836 153 001) et de phosphatases (100 µL pour 10 mL de tampon, Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail – Life Technologies, 78420). Les échantillons protéiques sont aliquotés et stockés à -80°C. La concentration en protéines totales est déterminée via l'utilisation de réactif de Bradford (Sigma, B6916), par lecture spectrophotométrique à 595 nm. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel (1,0 mm d'épaisseur, 15 puits) de polyacrylamide (7,5% pour la détection des protéines PARP1, LIG1, POLε, BAG3, HNRNPUL2 et SRRM1 et 12% pour PCNA, APE1 et OGG1) en conditions dénaturantes (mélange des échantillons avec 1X de bleu de Laemmli (BioRad, 1610747), chauffage de 10 min à 90°C (sauf pour POLε), puis dépôt sur gels et électrophorèse à 300 V dans un tampon Tris-Glycine à 0,1% de dodécylsulfate de sodium), transférées sur des membranes de nitrocellulose et analysées par western-blot (anticorps primaires : anti-PCNA (Cell Signaling 2586, 1/2000), anti-APE1 (Sigma HPA002564, 1/1000), anti-PARP1 (Cell Signaling 9542, 1/1000), anti-LIG1

(Abcam ab615, 1/1000), anti-POLε (Abcam ab134941, 1/1000), anti-OGG1 (Abcam ab124741, 1/50 000), anti-BAG3 (Abcam ab 92309, 1/5000), anti-HNRNPUL2 (Abcam ab104042, 1/100) and anti-SRRM1 (Santa Cruz SC-28723, 1/200) ; anticorps secondaires : anti-souris (Amersham Biosciences NA931) ou anti-lapin (Amersham Biosciences NA934)). La quantité totale de protéines déposée dans chaque puits (fixée d'après les dosages Bradford à 20 µg, sauf pour la quantification de LIG1 et POLε dans les échantillons 24 h, i.e. 40 et 120 µg respectivement, et 48 h, i.e. 60 et 180 µg respectivement) est vérifiée par l'intensité globale des pistes obtenues grâce à la technologie StainFree (BioRad) à l'aide d'un lecteur Chemidoc XRS+ (BioRad) et est utilisée pour la normalisation des signaux entre échantillons. La détection des bandes protéiques immuno-marquées est effectuée avec le substrat Clarity Western ECL (BioRad, 1705061) et le même lecteur Chemidoc XRS+. L'intensité des bandes est quantifiée grâce au logiciel ImageLab 5.1 (BioRad). Les résultats sont exprimés en facteur d'induction par rapport aux contrôles.

V. Etude du profil de méthylation des promoteurs des gènes

L'ADN est extrait de culots secs de cellules congelés à -80°C, à l'aide du kit d'extraction DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen, 69506), selon les instructions du fabricant et avec une étape de traitement à la RNase après la lyse cellulaire (2 min d'incubation en présence de 400 µg de RNase A, Sigma R5125). L'élution est réalisée dans de l'eau dépourvue de nucléases. La concentration d'ADN et sa pureté (ratios d'absorbance A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230}) sont mesurées grâce à un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) et les échantillons sont stockés à -20°C. Une digestion de cet ADN est ensuite réalisée à l'aide du kit EpiTect® Methyl II DNA Restriction kit (Qiagen, 335452), selon les instructions du fabricant et les échantillons sont stockés à -20°C. Au cours de cette digestion, 1 µg de chaque échantillon est digéré en parallèle de 4 manières différentes : non-digéré, digéré par une enzyme inactive dans les zones méthylées, par une enzyme activée par les zones méthylées, ou digéré par ces deux enzymes à la fois. L'analyse du profil de méthylation des promoteurs est réalisée par qPCR, à l'aide du kit EpiTect® Methyl II Signature PCR Array Human DNA Repair kit (Qiagen, EAHS-421ZA), de Mesa Blue qPCR™ Mastermix Plus for SYBR® Assay Low ROX (Eurogentec, RT-SY2X-03+WOULRB) et d'un thermocycleur Stratagène MX3005P, conformément aux instructions du fabricant du kit EpiTect. Le seuil de Cq est déterminé grâce à l'algorithme par défaut du logiciel MxPro 3.20 (Stratagène) et l'analyse des données est réalisée via le fichier Excel modèle EpiTect Methyl II PCR Array (Qiagen). Les différences de Cq entre ces différents digestats permettent de remonter au % de méthylation du promoteur étudié.

VI. Etude de l'activité du protéasome

L'activité du protéasome est étudiée à l'aide du kit Proteasome Activity Fluorometric Assay kit (UBPBio, J4120), selon les instructions du fabricant. Le principe de cette méthode consiste à extraire le protéome total (en l'absence d'inhibiteurs de protéases) et à incuber ces extraits en présence de substrats fluorogènes du protéasome, avec ou sans inhibiteur du protéasome (i.e. ici 50-100 µM de MG132). La fluorescence des puits avec inhibiteur du protéasome est ensuite déduite de celle des puits sans inhibiteur, afin de s'affranchir d'éventuelles activités enzymatiques aspécifiques. La pente liée à l'augmentation de la fluorescence au cours du temps dans la zone linéaire caractérise l'activité protéasome de l'extrait.

Ici les protéines totales sont extraites de culots secs de cellules congelés à -80°C (9 millions de cellules par échantillon) par sonication (3 fois 20 s, entrecoupées de 2 min à 4°C), puis centrifugation (20 min à 16 000 rcf, 4°C) dans un tampon de lyse constitué de 40 mM de Tris, pH 7,2, 50 mM de NaCl, 2 mM

de β-mercaptoéthanol, 2 mM d'ATP, 5 mM de $MgCl_2$ et 10% de glycérol. La concentration protéique totale est déterminée à l'aide du réactif Bradford (Sigma, B6916), par lecture spectrophotométrique à 595 nm. La quantité totale de protéines par puits réactionnel (1 puits par échantillon) est de 20 µg pour les activités de type chymotrypsine et caspase et de 2 µg pour l'activité de type trypsine. La lecture de la fluorescence est réalisée en mode cinétique pendant 60 min dans une enceinte maintenue à 37°C (1 lecture/min, excitation à 360 nm, émission à 460 nm, auto-cutoff à 455 nm, 3 s de mélange avant chaque lecture), à l'aide d'un spectrophotomètre spectraMax M2 (Molecular Devices), avec une sensibilité moyenne et des paramètres de vitesse normaux, dans des plaques 96 puits noires standard.

VII. Etude du phosphoprotéome

L'analyse phosphoprotéomique de cette étude a été réalisée au laboratoire Innovative technologies for Detection and Diagnostics du CEA Marcoule, avec l'aide de Jean-Charles GAILLARD, sous la supervision de Jean ARMENGAUD.

A. Stratégie expérimentale globale

Les phosphoprotéomes des cellules contrôles et exposées aux NP de TiO_2 sont analysés à l'aide d'une approche de phosphoprotéomique shotgun inspirée d'un protocole précédemment décrit (Villén and Gygi, 2008). La procédure expérimentale est réalisée sur trois réplicas biologiques par condition d'exposition. Chaque échantillon contient environ 12 millions de cellules A549 exposées à 0 ou 100 µg/mL de NP de TiO_2 pendant 24 h. Une extraction protéique totale suivie d'une digestion trypsique sont réalisées. A l'issue de ces étapes, chaque échantillon contient environ 2 mg de peptides. 1 mg de peptides par échantillon est ensuite dessalé et les phosphopeptides sont pré-enrichis par chromatographie d'échange de cations. Ces derniers sont en effet principalement élués d'après la littérature entre les minutes 8 et 16 du gradient utilisé (Villén and Gygi, 2008). Les phosphopeptides sont récoltés en deux fractions de 4 min chacune, dessalés et à nouveau enrichis par chromatographie d'affinité sur métaux immobilisés. Les 12 échantillons ainsi collectés sont analysés par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide (nanoLC-MS/MS). L'interprétation des spectres MS/MS est réalisée par comparaison avec la base de données humaine SwissProt avec des paramètres standard.

Pour l'interprétation des données, les niveaux de phosphorylation à l'échelle de chaque protéine sont étudiés à l'aide de trois critères complémentaires : le nombre de phosphorylations (i.e. nombre de résidus détectés comme phosphorylés sur l'ensemble des peptides attribués à la protéine), le nombre de phosphopeptides (i.e. nombre de phosphopeptides détectés pour la protéine) et le nombre de sites phopshorylés (i.e. nombre de sites phosphorylés uniques observés sur les différents peptides détectés pour la protéine). Un même peptide doublement phosphorylé et détecté trois fois représente par exemple 6 phosphorylations, 3 phosphopeptides et 2 sites phosphorylés. Chacun de ces indicateurs constitue un angle d'observation différent des niveaux de phosphorylation protéiques. La présente analyse ayant été réalisée sur des phosphopeptides enrichis, aucun de ces critères ne représente une observation directe des niveaux d'expression protéiques individuels, mais plutôt une conséquence de modulations de l'expression et/ou de modifications post-traductionnelles de ces protéines. Parmi les trois indicateurs utilisés, le nombre de phosphopeptides est le plus susceptible d'être influencé par des modulations des niveaux d'expression protéiques. L'analyse comparative de ces trois critères permet d'effectuer la distinction entre les protéines sur- ou sous-exprimées et celles subissant une perturbation de leur niveau de phosphorylation.

L'analyse phosphoprotéomique fonctionnelle réalisée ici consiste en une extraction et une comparaison des termes d'ontologie protéique représentés ou enrichis parmi les protéines du jeu de donnée subissant une perturbation de leur niveau de phosphorylation. Cette étude est réalisée grâce à plusieurs outils et logiciels en parallèle, selon deux approches indépendantes : l'une focalisée sur les niveaux de phosphorylation à l'échelle de la protéine entière et l'autre centrée sur les sites individuels de phosphorylation. Cette dernière approche permet par une recherche bibliographique l'identification du rôle biologique précis des sites de phosphorylation dérégulés et permet l'étude des motifs de séquence entourant ces sites. Quelle que soit l'analyse considérée, les critères d'inclusion sont en revanche toujours les mêmes, à savoir une valeur absolue du facteur d'induction supérieure ou égale à 1,5 et une p-value inférieure à 0,05.

En parallèle de cette étude phosphoprotéomique, l'effet des NP de TiO_2 sur le niveau de phosphorylation des protéines est également étudié par coloration des phosphoprotéines totales au sein d'un gel de polyacrylamide et quantification relative de l'intensité de fluorescence associée à chaque échantillon.

B. Traitement des échantillons pour l'analyse phosphoprotéomique

1. Extraction protéique et digestion trypsique

Après récolte, les cellules sont immédiatement congelées en culots secs et stockées à -80°C. Les culots cellulaires sont décongelés par 10 min d'incubation sur la glace en contact direct avec 200 µL de tampon de lyse dénaturant constitué de 50 mM de Tris/HCl, pH 8,2 contenant 8 M d'urée, 75 mM de NaCl et 2X d'inhibiteurs de phosphatases (Thermo Scientific, 88667). Les échantillons sont ensuite soumis à trois cycles de sonication (20 s avec des pulsations de 0,4 s et de 40% d'amplitude) séparés par des pauses de 1 min, à l'aide d'une sonde de sonication plongeant directement dans les échantillons (Hielsher UP50H). Les lysats sont centrifugés à 16 000 rcf pendant 10 min à 4°C, les surnageants sont récoltés et stockés à -80°C. Les concentrations en protéines totales sont mesurées grâce au réactif de Bradford (CooAssay Standard Protein Assay kit, UP36858, Interchim) par lecture spectrophotométrique à 595 nm. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 15 min à 56°C en présence de 5 mM de dithiotréitol sous agitation permanente. Les cystéines ainsi réduites sont alkylées par ajout de 5 mM d'iodoacétamide pendant 15 min à température ambiante sous agitation. Les échantillons sont dilués avec du Tris/HCl 100 mM, pH 8,5 (ajout de 1,380 mL par échantillon) dans le but de réduire la concentration en urée à 1 M. La digestion trypsique est réalisée par ajout de trypsine (Roche 11 047 841 001), à 1 mg/mL dans de l'acide trifluoroacétique à 0,01% en solution aqueuse, en concentration finale équivalente à 2% de la masse protéique totale par échantillon et incubation sur la nuit à 37°C. A l'issue de la digestion, la trypsine est inactivée par ajout de 0,6% (vol/vol) en concentration finale d'acide trifluoroacétique en solution aqueuse. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 1 min à 1 000 rcf, 20°C, afin de récupérer les surnageants dont le stockage est effectué à -80°C. L'efficacité de la protéolyse est vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et coloration au bleu de Coomassie.

2. Enrichissement des phosphopeptides

Les échantillons protéolysés sont dessalés sur des colonnes Harvard Macro Spin C18 (74-4101). La résine est d'abord activée par trois cycles de rinçage avec 500 µL de solution d'activation (80% acétonitrile, 20% eau), puis équilibrée via trois nouveaux rinçages avec 500 µL de solution de lavage (0,5% d'acide trifluoroacétique en solution aqueuse). Les peptides sont ensuite déposés sur les colonnes (250 µg par colonne) et celles-ci sont centrifugées 30 s à 2 000 rcf, 20°C. Les filtrats sont

collectés et redéposés sur les colonnes. La résine est lavée trois fois avec 500 µL de solution de lavage, avant l'élution des peptides dans 100 µL de solution d'élution (acétonitrile/eau 1:1 et 0,1% d'acide trifluoroacétique en solution aqueuse). Les peptides dessalés sont lyophilisés et stockés à -80°C avant d'être séparés par une chromatographie d'échange de cations. Cette chromatographie est réalisée selon un protocole précédemment décrit (Villén and Gygi, 2008). 1 mg de peptides dessalés est dissout dans 65 µL de tampon A (7 mM de KH_2PO_4, pH 2,65 et 30% d'acétonitrile (vol/vol)), puis 60 µL sont injectés sur une colonne polySULOETHYL A™ (PolyLC, Columbia, US) à phase inverse de diamètre interne 3,2 mm, de longueur 200 mm, contenant des particules de 5 µm de diamètre et des pores de 200 Å et utilisée à un débit de 400 µL/min à l'aide d'un système HPLC Agilent 1100 équipé d'un détecteur à diode G1315B, d'un dégazeur G1322A, d'une pompe quaternaire G1311A, d'un injecteur automatique G1329A et d'une unité de refroidissement des échantillons tel que décrit précédemment (Armengaud et al., 2003). Les chambres d'injection et de collecte sont toutes deux maintenues à 5°C. La séparation est réalisée avec un gradient de tampons A (décrit ci-dessus), B (7 mM de KH_2PO_4, 350 mM de KCl, pH 2,65 et 30% d'acétonitrile (vol/vol)), C (50 mM de K_2HPO_4 et 500 mM de NaCl, pH 7,5) et d'eau ultrapure. Ce gradient est constitué de 100% de tampon A pendant les 34 premières minutes, puis de 75% de tampon A et 25% de tampon B pendant la minute 35, 100% de tampon B de 36 à 41 min, 100% d'eau ultrapure de 42 à 48 min, 100% de tampon C de 49 à 60 min, 100% d'eau ultrapure de 61 à 67 min et enfin 100% de tampon A de la minute 68 jusqu'à la fin de l'élution (à 120 min). Les deux fractions de 4 min contenant le plus de phosphopeptides sont éluées entre 8 et 16 min (dans 100% de tampon A) (Villén and Gygi, 2008). Ces deux fractions séparées sont lyophilisées pour réduire leur volume à 150 µL. 350 µL d'acide trifluoroacétique à 0,1% en solution aqueuse sont ensuite ajoutés à chaque échantillon. Ces derniers sont une nouvelle fois dessalés comme décrit ci-dessus. Les phosphopeptides sont ensuite à nouveau enrichis par chromatographie d'affinité sur métaux immobilisés à l'aide de résine PhosSelect Iron Affinity Gel (Sigma, P9740) et de colonnes Harvard Micro Spin C18 (74-4601) pour le dessalage simultané des peptides élués. La résine enrobée de phosphopeptides est transférée sur une colonne de dessalage activée et équilibrée selon le protocole décrit ci-dessus. Le dessalage est effectué comme précédemment (avec des étapes de rinçages utilisant 200 µL au lieu de 500 µL de solutions). La bicouche de résine résultante est rincée deux fois avec 100 µL de tampon de liaison (40% d'acétonitrile et 60% d'acide formique à 25 mM dans l'eau), puis une fois avec 200 µL de solution de lavage C18. Les phosphopeptides sont ainsi simultanément élués de la résine PhosSelect et retenus par la résine C18 située en-dessous à l'aide de trois cycles de rinçage avec 100 µL de tampon d'élution (500 mM de K_2HPO_4, pH7). A l'issue de quatre rinçages avec 200 µL de solution de lavage C18, les phosphopeptides sont élués de la résine C18 par 2 x 50 µL de solution d'élution C18. Les échantillons sont lyophilisés et stockés à -80°C jusqu'à leur analyse par spectrométrie de masse en tandem (nanoLC-MS/MS).

3. Analyse par nanoLC-MS/MS

Les phosphopeptides enrichis sont dissouts dans 30 µL d'acide trifluoroacétique 0,1% en solution aqueuse et 10 µL de chaque échantillon sont injectés dans le système nanoLC-MS/MS. Ces analyses sont réalisées à l'aide d'un spectromètre LTQ Orbitrap XL hybride (ThermoFisher) couplé à un dispositif de chromatographie liquide Ultimate 3 000 (Dionex), dans des conditions précédemment décrites (Dedieu et al., 2011). Les spectres de masse sont mesurés de m/z 300 à 1 800 avec le spectromètre LTQ Orbitrap XL selon un protocole dépendant des données utilisant une stratégie TOP3 consistant en un cycle initial d'analyse de haute précision sur la masse dans l'Orbitrap (résolution de 30 000, calibration interne), suivi en parallèle d'analyses en mode normal dans la trappe à ions linéaire des

trois ions précurseurs les plus abondants. Les paramètres utilisés sont les suivants : signal minimal requis de 15 000, états de charge possibles 2+ et 3+ et exclusion dynamique des ions précédemment sélectionnés pendant 60 s. Le mode d'activation en plusieurs étapes (pseudo MS3) est activé avec une liste de pertes neutres de masses 32,6590 (phosphate sur ion à triple charge positive) et 48,9890 (phosphate sur ion à double charge positive). L'option de fixation de la masse est activée en mode MS sur le spectromètre LTQ Orbitrap XL et les ions polydiméthylcyclosiloxanes générés à partir de l'air ambiant au cours du processus d'électrospray (protonés $[(CH_3)_2SIO)]_6$ avec un m/z à 445,12002) sont utilisés pour la re-calibration interne en temps réel.

C. Traitement des données de l'analyse phosphoprotéomique

Les listes de pics sont générées par le logiciel MASCOT DAEMON 2.3.2 (Matrix Science) à l'aide du filtre d'importation extract_msn.exe du pack de logiciels Xcalibur FT 2.0.7 (ThermoFisher). Les options d'importation sont les suivantes : masse comprise entre 400 et 5 000, tolérance de groupement de 0, 0 analyse intermédiaire, 10 pics minimum par spectre MS^2, analyse limitée aux spectres MS^2 et intensité minimale des ions fixée à 1 000, tel que décrit précédemment (Clair et al., 2012). Pour l'identification des peptides, les spectres MS/MS sont comparés à la base de données SwissProt avec le logiciel MASCOT 2.3.02 (Matrix Science). Les paramètres de recherche sont : SwissProt_2012_02 (534 695 séquences rassemblant 189 667 883 résidus) restreinte à la taxonomie des mammifères (65 476 séquences), nombre maximal de coupures aspécifiques de 2, tolérance de 5 ppm sur la masse de l'ion parent et de 0,5 Da pour la MS/MS, modification fixe pour les cystéines carbamidométhylées et modification variable pour les méthionines oxydées et les sérines, thréonines et tyrosines phosphorylées. Les résultats MASCOT sont analysés à l'aide du logiciel IRMA 1.30.4 (Dupierris et al., 2009) en sélectionnant uniquement les peptides associés à une p-value inférieure à 0,01 et à un rang de 1. Les facteurs d'induction sont calculés comme le rapport entre les valeurs obtenues dans les échantillons exposés aux NP de TiO_2 et celles obtenues dans les contrôles et sont basés sur le dénombrement spectral effectué après normalisation standard. La normalisation et l'analyse de la significativité statistique sont réalisées grâce au logiciel PatternLab (Carvalho et al., 2008). Les résultats ne sont considérés statistiquement significatifs que lorsque la p-value est inférieure à 0,05 et la valeur absolue du facteur d'induction est supérieure ou égale à 1,5.

Des analyses d'ontologie protéique sont réalisées à partir des données obtenues à l'aide de plusieurs outils et logiciels. Une première analyse est menée avec la plateforme logicielle IPA® (Ingenuity® Pathway Analysis – 23814503, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity), avec un niveau de confiance sur les données sources fixé à « observé expérimentalement » et en considérant uniquement les protéines humaines. Les analyses statistiques d'enrichissement correspondantes sont réalisées via IPA® selon des tests de Fisher. En parallèle, les données sont également soumises à l'analyse descriptive de la plateforme GO term mapper (http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermMapper, avec le fichier d'annotations goa_human (GOA GO slim)) et aux analyses d'enrichissement des plateformes GO term finder (Boyle et al., 2004) (http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder, sans code d'exclusion de type de preuve et avec le fichier d'annotations gene_association.goa_human_hgnc), Babelomics 4.3.0 (http://babelomics.bioinfo.cipf.es/ avec le module FatiGO (Al-Shahrour et al., 2004, 2007)) et GOrilla (Eden et al., 2007, 2009). D'une manière générale, quel que soit le logiciel d'ontologie protéique utilisé, les enrichissements ne sont considérés comme statistiquement significatifs que lorsque la p-value associée est inférieure à 0,05 (ou 0,01 dans le cas de l'analyse GOrilla).

D. Etude du niveau de phosphorylation global par des techniques de coloration en gel

1. Principe de la méthode

Le principe de l'étude du niveau de phosphorylation des protéines par des techniques de coloration en gel consiste à extraire le protéome cellulaire total, à séparer les protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis à colorer successivement les phosphoprotéines et l'ensemble des protéines avec des fluorophores, en analysant après chaque coloration l'intensité de fluorescence résultante pour chaque échantillon. On obtient ainsi une estimation relative de la quantité de phosphoprotéines dans les différents échantillons, normalisée par rapport à la quantité totale de protéines.

2. Détails expérimentaux

Les extraits protéiques totaux sont obtenus à partir de culots cellulaires (congelés à -80°C après récolte et contenant chacun 12 million de cellules) par 10 min de centrifugation à 16 000 rcf, 4°C, dans du tampon de lyse Cell Lytic Buffer (Sigma, C2978) contenant des inhibiteurs de protéases (1 pastille pour 10 mL de tampon, Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche, 11 836 153 001) et de phosphatases (100 µL pour 10 mL de tampon, Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail – Perbio 78420, Pierce). Les échantillons protéiques sont aliquotés et stockés à -80°C. La concentration totale en protéines est déterminée via l'utilisation de réactif de Bradford (Sigma, B6916), par lecture spectrophotométrique à 595 nm. Les protéines sont ensuite déposées sur gel de polyacrylamide (10%, 1,0 mm d'épaisseur, 15 puits, 20 µg de protéines totales par puits), puis séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes (mélange des échantillons avec 1X de bleu de Laemmli (BioRad, 1610747), chauffage de 10 min à 90°C, puis dépôt sur gels et électrophorèse à 100 V dans un tampon Tris-Glycine à 0,1% de dodécylsulfate de sodium). Les phosphoprotéines, puis les protéines totales sont colorées au sein du gel à l'aide des marqueurs fluorescents Pro-Q® Diamond (Invitrogen, P-33300) et SYPRO® Ruby (Invitrogen, S-12000) respectivement, selon les recommandations du fournisseur (solutions de marquage non-diluées). La détection des bandes protéiques à l'issue de chaque coloration est réalisée à l'aide d'un détecteur Gel Doc XR+ (BioRad). L'intensité de fluorescence totale des pistes est analysée grâce au logiciel ImageLab 5.1 (BioRad). Les résultats sont exprimés en facteur d'induction par rapport aux contrôles.

VIII. Etude du cycle cellulaire

Le principe de l'analyse repose sur le marquage des cellules par l'iodure de propidium, qui s'intercale dans l'ADN des cellules marquées. Ces dernières deviennent ainsi fluorescentes. L'intensité de fluorescence d'une cellule est alors proportionnelle à la quantité d'ADN contenue dans la cellule. La détection par cytométrie en flux de cette intensité de fluorescence, associée à la granulométrie et à la taille des cellules concernées permet de différencier les cellules en G0/G1, S et G2/M, ainsi que les débris cellulaires et les agglomérats de cellules. Les cellules sur le point de se diviser (G2/M) contiennent en effet 2 fois plus d'ADN que les cellules en G0/G1, tandis que les cellules en phase S sont dans un état intermédiaire. Les débris cellulaires (petits et très granuleux) et les agglomérats de cellules (grands et également très granuleux) sont quant à eux exclus de l'analyse.

Les cellules exposées sont récoltées et rincées 1 fois dans 1 mL de PBS-EDTA (2mM), puis fixées par re-suspension dans 500 µL d'éthanol à -20°C et laissées ainsi à température ambiante pendant 30 min avant leur stockage à -20°C. Préalablement à l'analyse, les suspensions cellulaires sont diluées dans 1 mL de PBS-EDTA (2 mM), centrifugées (5 min à 250 rcf, 22°C) puis re-suspendues dans le tampon

d'analyse (200 µL pour les échantillons témoins et 600 µL pour les échantillons exposés, composés de 25 µg/mL de RNase A (Sigma, R5125) et 25 µg/mL d'iodure de propidium (Sigma, P4864) dans du PBS-EDTA 2 mM) et laissées à l'obscurité et à température ambiante pendant 45 min. L'analyse par cytométrie en flux est réalisée à l'aide d'un cytomètre FACS Calibur (Becton Dickinson) et les données collectées sont analysées grâce au logiciel Flowing Software 2.5.1.

IX. Etude de la prolifération cellulaire

A. Principe de la méthode

La prolifération cellulaire est ici étudiée via une coloration de l'ADN nouvellement synthétisé dans les cellules à l'aide de la base modifiée BrdU, qui s'incorpore dans l'ADN lors de sa réplication à la place de la thymine[12]. L'usage d'un anticorps anti-BrdU marqué permet la quantification relative (par mesure spectrophotométrique de l'absorbance en solution) de la prolifération cellulaire entre des échantillons contenant initialement le même nombre de cellules. Dans le cadre de cette étude, les cellules ensemencées en quantités égales ne sont mises en présence de BrdU qu'à l'issue de l'exposition aux NP. La prolifération cellulaire mesurée correspond donc au potentiel de prolifération après exposition et non en cours d'exposition.

B. Détails expérimentaux

La prolifération cellulaire est étudiée à l'aide d'un kit de colorimétrie au BrdU (Roche, 11 647 229 001), selon les instructions du fabricant. Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits (30 000 cellules par puits) avec 6 puits par condition d'exposition et exposées à 0, 1, 10 ou 100 µg/mL de NP de TiO_2 (50 µL par puits) pendant 4, 24 ou 48h. Chaque condition d'exposition aux NP est doublée d'une condition miroir sans BrdU, afin de tenir compte de l'interférence possible des NP avec la lecture finale de l'absorbance. 3 puits « blancs » sans cellule (mais traités au BrdU et à l'anticorps anti-BrdU) sont également inclus sur chaque plaque. Après exposition aux NP, les puits sont rincés 3 fois avec 200 µL de PBS, 50 µL de solution de marquage (préparée dans du milieu de culture contenant 10% de sérum de veau fœtal, avec ou sans 10 µM de BrdU) sont ajoutés à chacun d'entre eux et les cellules sont incubées dans ces conditions pendant 2h à 37°C, 5% de CO_2. La lecture finale de l'absorbance en solution à 370 nm est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre SpectraMax M2 (Molecular Devices) et normalisée par l'absorbance à 492 nm. La prolifération cellulaire est calculée à l'aide de la formule suivante, où « PC » = prolifération cellulaire, « b » = blanc, « BF » fait référence aux échantillons contrôles pour le bruit de fond dû aux NP et A_x représente l'absorbance à la longeur d'onde x nm :

$$PC_i = \overline{\left(A_{370} - \overline{A_{370_b}}\right) - \left(A_{492} - \overline{A_{492_b}}\right) - \overline{\left(A_{370} - \overline{A_{370_b}}\right)_{BF} - \left(A_{492} - \overline{A_{492_b}}\right)_{BF}}}$$

X. Test de cytotoxicité (MTT)

A. Principe de la méthode

Le test de cytotoxicité MTT (bromure de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium) est un test de viabilité cellulaire basé sur la mesure de l'activité enzymatique mitochondriale déshydrogénase succinique (Mosmann, 1983). Dans les cellules viables et actives, cette enzyme réduit le MTT en formazan insoluble dans l'eau, conduisant à la formation de cristaux (violets). Le remplacement du milieu de culture par du DMSO permet la solubilisation de ce formazan. La viabilité cellulaire,

[12] https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/B23151, consulté le 04/06/2015

proportionnelle à l'absorbance de la solution à 570 nm, est alors calculée en pourcentage de celle des contrôles.

B. Détails expérimentaux

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits (8 puits par condition, 40 000 cellules par puits) et exposées à 50 µL de suspension de NP de TiO_2 à 0, 10, 50, 100 ou 200 µg/mL pendant 4, 24 ou 48 h. Après exposition et rinçages des tapis cellulaires (3 fois 200 µL de PBS 1X), le milieu d'exposition est remplacé par 110 µL d'une solution de MTT à 0,2 mg/mL dans du milieu de culture sans sérum, avec lequel les cellules sont incubées pendant 2h à 37°C, 5% de CO_2. Le MTT est alors éliminé et les cristaux de formazan sont solubilisés à l'aide de 100 µL de DMSO. Dans le but de s'affranchir des interférences possibles des NP avec la lecture de l'absorbance, les plaques sont laissées immobiles pendant 1h à température ambiante, afin de permettre aux NP de sédimenter. Elles sont ensuite de plus centrifugées (5 min à 3 200 rcf, 22°C) et le surnageant (50 µL sur 100 µL) est transféré dans une nouvelle plaque pour la lecture spectrophotométrique.

XI. Tests de génotoxicité

A. Test des comètes alcalines

1. Principe de la méthode

Le test des comètes dans sa version alcaline permet la détection des cassures simples/doubles-brins de l'ADN ainsi que des sites alcali-labiles (Hillegass et al., 2010; Ostling and Johanson, 1984). Les cellules sont fixées sur des lames de verre au sein d'une matrice d'agarose. Une incubation des lames dans un tampon de lyse permet la déstructuration des membranes cellulaires et la libération de l'ADN. Une électrophorèse est ensuite réalisée dans un tampon alcalin, d'où l'apparition de cassures à l'ADN sur le lieu des sites alcali-labiles. L'ADN présentant des cassures migrant plus rapidement que l'ADN intact, sa coloration à l'aide d'agents intercalants comme le BET (bromure d'éthidium) conduit à l'observation de structures en forme de comètes. L'absence de cassures se traduit par l'observation de pelotes d'ADN sphériques, sans "queue". Le taux de cassures est défini par le % d'ADN dans la queue. Ce pourcentage est calculé à l'aide de logiciels de traitement d'images.

2. Détails expérimentaux

Les lésions de l'ADN de type cassures simples/doubles-brins ou sites alcali-labiles sont mesurées à l'aide du test des comètes en conditions alcalines, selon un protocole précédemment décrit (Jugan et al., 2012). Environ 20 000 cellules de chaque échantillon sont déposées sur chaque lame et trois lames sont préparées pour chaque échantillon. La lyse cellulaire est effectuée sur la nuit à 4°C (dans un tampon composé de 2,5 M de NaCl, 100 mM d'EDTA, 10 mM de Tris, 10% de DMSO et 1% de Triton X-100) et l'électrophorèse est réalisée à 25 V (300 mA) pendant 30 min (dans un tampon contenant 300 mM de NaOH et 1 mM d'EDTA, pH > 13). L'ADN est marqué à l'aide de BET et le % d'ADN dans la queue est analysé à l'aide du logiciel Comet IV 4.2 (Perceptive Instruments).

B. Quantification des lésions 8oxodG par LC-MS/MS

Les lésions oxydatives de l'ADN de type 8oxodGuanine (8oxodG) sont ici dosées par HPLC-MS/MS. L'ADN est extrait de culots cellulaires congelés à -80°C après récolte (contenant chacun 5 millions de cellules BEAS-2B) à l'aide du kit DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur et avec une étape de traitement à la RNase après la lyse cellulaire (2 min d'incubation avec 400 µg de RNase A – Sigma, R5125). L'élution est réalisée dans 100 µL d'une solution aqueuse de

déferoxamine 0,1 mM (afin d'éviter l'oxydation de l'ADN au cours du traitement des échantillons). L'ADN contenu dans 50 µL de chaque échantillon ainsi obtenu est digéré via deux étapes d'incubation successives de 2h chacune, à 37°C. La première incubation est précédée par l'ajout de 0,025 U de phosphodiesterase II (Sigma, P9041), 2,5 U de DNAse II (Sigma, D4138), 0,5U de nucléase P1 (Sigma, N8630 – dans 300 mM d'acétate d'ammonium et 1 mM de $ZnSO_4$, pH 5,3), 0,5 µmol d'acide succinique et 0,25 µmol de $CaCl_2$, pH 6. Les échantillons sont vortexés 30 min après le début de l'incubation. La deuxième incubation débute par l'addition de 0,015 U de phosphodiestérase I (Worthington, LS003926), 2 U de phosphatase alcaline (Sigma, P6774), 3 µmol de Tris et 6 nmol d'acide éthylène diamine tétra-acétique, pH 8. La digestion est arrêtée par l'ajout de 3,5 µL d'HCl 0,1M. L'analyse HPLC-MS/MS est réalisée selon un protocole précédemment décrit (Frelon et al., 2000; Jugan et al., 2012). Le nombre de bases 8oxodG est rapporté au nombre de bases non-lésées.

XII. Statistiques

Les expériences sont réalisées sur au moins trois échantillons biologiques par condition. Sauf indication contraire, la significativité statistique est analysée selon des tests non-paramétriques : à la fois analyse de la variance d'ordre 1 sur les rangs (test de Kruskal-Wallis) et comparaisons par paires (tests « U » de Mann-Whitney) à l'aide du logiciel Statistica 8.0 (Statsoft). Les résultats sont considérés statistiquement significatifs lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

Résultats :

Article 1: TiO_2 nanoparticles globally down-regulate the expression of DNA repair genes and proteins in A549 cells

Ce premier article a pour principal objet l'exploration de l'hypothèse selon laquelle la perturbation des capacités cellulaires de réparation de l'ADN engendrée par les NP de TiO_2 serait due à une modification de l'expression des gènes et/ou de la concentration des protéines correspondantes dans les cellules. Pour cela, nous avons commencé par analyser par RT-qPCR l'expression d'une quarantaine de gènes appartenant aux différentes voies de réparation de l'ADN. Ayant constaté une nette modification de cette expression après exposition aux NP, nous avons exploré l'impact des NP sur divers régulateurs transcriptionnels de la réparation, dont par exemple la méthylation des promoteurs des gènes ou encore l'activité du protéasome, afin de tenter d'élucider le mécanisme responsable des profils d'expression observés. Enfin nous avons cherché à déterminer par western-blot si les modulations d'expression constatées au niveau des gènes se répercutaient au niveau des protéines. L'impact des NP de TiO_2 sur les capacités cellulaires d'excision par le BER a également été étudié grâce à des puces porteuses d'oligonucléotides fluorescents mimant différentes lésions de l'ADN, dont des 8oxodG appariées à des thymines, adénines ou cytosines.

Les résultats montrent une diminution quasi globale de l'expression des gènes appartenant aux différentes voies de réparation de l'ADN, i.e. BER, NER, HR, NHEJ et MMR. Cet effet est particulièrement net après 4-24 h d'exposition à 100 µg/mL de NP de TiO_2, soit la concentration maximale considérée dans cette étude. Les concentrations cellulaires des protéines correspondantes suivent une tendance similaire. Cependant les effets notés au niveau protéique s'étendent à des concentrations plus faibles, i.e. 1-10 µg/mL et à des temps d'exposition plus longs, i.e. jusqu'à 48 h. La preuve de l'impact des NP de TiO_2 sur le BER est renforcée par l'observation, après 24 h d'exposition à 10-100 µg/mL, d'une diminution de l'activité d'excision des bases modifiées éthéno-adénines et 8oxodG, lorsque celles-ci sont respectivement appariées à des thymines et des adénines. Les NP de TiO_2 induisent par ailleurs la répression des régulateurs transcriptionnels BCL2, BRCA1 et NRF2, l'hyperméthylation des promoteurs de plusieurs gènes de réparation de l'ADN et l'augmentation de l'activité de type caspase du protéasome.

Ces différents facteurs pourraient expliquer les baisses d'expression et de concentration constatées au niveau des gènes et des protéines de réparation de l'ADN, qui elles-mêmes pourraient expliquer la chute des capacités cellulaires de réparation de l'ADN observée précédemment au laboratoire. Cependant les résultats suggèrent l'implication d'autres mécanismes. On observe en effet que la répression des gènes de réparation de l'ADN ne se répercute pas forcément au niveau protéique, que ce soit du point de vue de la concentration cellulaire ou de l'activité. De même la diminution du contenu cellulaire en protéine OGG1 n'affecte que partiellement l'activité de cette enzyme, qui reste intacte lorsque les bases 8oxodG sont appariées à des cytosines. Ces observations pourraient être expliquées par un éventuel impact stimulateur des NP de TiO_2 sur les complexes de traduction ou par une interférence des NP avec la signalisation de la réparation de l'ADN. Ces hypothèses seront étudiées plus en détail dans la suite de ce manuscrit et en particulier dans le deuxième article présenté.

Ce premier article a été soumis début juillet 2015 au comité de lecture du journal *Nanotoxicology*.

TiO_2 nanoparticles globally down-regulate the expression of DNA repair genes and proteins in A549 cells

Mathilde BIOLA-CLIER[1,2], Lucie ARMAND[1,2], Sylvain CAILLAT[1,2], Nathalie HERLIN-BOIME[3], Sylvie SAUVAIGO[4], Thierry DOUKI[1,2], Marie CARRIERE[1,2,*]

[1]Univ. Grenoble Alpes, INAC, SCIB, F-38000 Grenoble, France ; [2]CEA, INAC, SCIB, F-38054 Grenoble, France ; [3]UMR 3685 IRAMIS NIMBE LEDNA, bât. 522, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France ; [4]LXRepair, 7 parvis Louis Néel, 38040 Grenoble cedex 9, France

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 38 78 03 28; E-mail: marie.carriere@cea.fr

Keywords:

Genotoxicity, titanium dioxide, gene promoter hypermethylation, proteasome activity

Abstract:

The global demand for TiO_2 nanoparticles (NPs) is large and rocketing, which raises concerns about their impact on human health. Previous studies showed that these NPs could exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in pulmonary cells. Here the aim is to shed light on the mechanisms underlying this impairment of DNA repair activity, by focusing on A549 alveolar pulmonary cells. The expression of DNA repair genes and proteins was studied by RT-qPCR and western blot, as well as the methylation status of corresponding gene promoters and proteasome activity. We show that exposure of A549 cells to 1-100 µg/ml TiO_2 NPs during 4-48 h induces global repression of DNA repair genes and proteins belonging to all DNA repair pathways. At gene level this trend is mainly observed at 100 µg/ml and at 4-24 h, whereas it is observed at lower concentration and longer exposure time at protein level. Gene expression of transcriptional regulators BCL2, BRCA1 and NRF2 is also down-regulated in some exposure conditions. Several DNA repair gene promoters are simultaneously hypermethylated and caspase-like proteasome activity is increased. Together these factors could explain the global down-regulation of DNA repair genes and proteins.

Introduction:

TiO_2 is a whitening agent that is extensively used in a wide range of everyday life products including cosmetics, food, paints and pharmaceuticals. Its annual production approximately amounts to four million tons worldwide and is steeply increasing, particularly nanoscale TiO_2 which exhibits additional catalysis properties (Shi, 2013). These large amounts raise concerns about the impact of this material on human health. Numerous studies were published in the last ten years regarding the toxicological impact of TiO_2 nanoparticles (NPs), through inhalation in particular, as it is the main human exposure route in occupational settings (Shi, 2013). Overall conclusions are that these NPs do not cause severe lethality, but generate oxidative stress and inflammation in the lung. These effects seem to be inversely correlated with particle size (Shi, 2013). Most studies that addressed genotoxicological endpoints conclude in a significant effect, however genotoxicity results are contradictory and largely depend on the NPs' physico-chemical characteristics and on exposure conditions (Golbamaki Bakhtyari, 2015).

In vitro, TiO_2 NPs are internalized in most cell types, mainly through endocytosis (Bruinink, 2015). They accumulate in the cytoplasm, either in cytoplasmic vesicles or as free particles (Bruinink, 2015; Simon-Deckers, 2008). Very few studies report the presence of TiO_2 NPs inside the nucleus and it was consequently concluded that NPs do not directly interact with DNA (Ahlinder, 2013; Geiser, 2005; Jugan, 2012; Li, 2010; Shukla, 2011). This suggests that the mechanisms of TiO_2 NP-induced

genotoxicity are likely indirect (Chen, 2014). NP-induced indirect genotoxicity could result from several phenomena. Among them, the accumulation of DNA damage can be linked to reduced DNA repair ability (Magdolenova, 2014). Indeed, we previously reported that TiO_2 NPs induce DNA damage and impair DNA repair activity in A549 cells, through inactivation of both Base Excision Repair (BER) and Nucleotide Excision Repair (NER) pathways (Jugan, 2012). More generally other engineered nanomaterials also induce dysregulation of the expression of a few DNA repair genes, including carbon nanotubes (Cao, 2014; Folkmann, 2009), graphene (Chatterjee, 2014), silver NPs (Ahamed, 2008; AshaRani, 2012; Mei, 2012; Piao, 2011), gold NPs (Li, 2011), CuO NPs (Hanagata, 2011) and ultrafine particles from ambient air pollution (Mroz, 2008). This was also shown on a variety of cells lines, exposed to a panel of NPs (Lan, 2014).

DNA repair occurs through six main pathways: BER, NER, homologous recombination (HR), non-homologous recombination (NHEJ), mismatch repair (MMR) and direct reversal (DR). These pathways have been extensively described (Hoeijmakers, 2001). The BER pathway specializes in the repair of non-helix distorting lesions affecting only one DNA strand (Hegde, 2008). The NER pathway deals with large helix-distorting lesions that affect only one DNA strand (Fousteri, 2008; Hoeijmakers, 2001). The repair of double-strand breaks (DSBs) is achieved either by HR or by NHEJ, both of which are regulated by ATM-mediated phosphorylation (Hoeijmakers, 2001). HR is the most accurate pathway; it mediates repair through the use of the sister chromatide as a model template, in the G2/S stages of the cell cycle (Bernstein, 2002). During the G0/G1 stages of the cell cycle DSB repair is mediated by NHEJ. MMR specializes in the repair of mispaired nucleotides and insertion/deletion loops that occur during DNA replication or recombination (Hoeijmakers, 2001; Kunkel, 2005). Finally DR uses single enzymes to repair specific DNA lesions (Hoeijmakers, 2001). For instance O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is in charge of O^6-methyl guanine repair.

In order to uncover the mechanisms underlying the previously reported impairment of DNA repair activity (Jugan, 2012), we analyzed the effect of TiO_2 NPs on the DNA repair capacity of A549 human pulmonary alveolar epithelial cells, by addressing its impact on the expression of 44 DNA repair genes belonging to all DNA repair pathways. The correlation with DNA repair protein content was studied for six central DNA repair proteins. Then, focusing on transcriptional regulators, we assessed the methylation profile of DNA repair gene promoters since promoter hypermethylation reduces the expression of corresponding genes (Lahtz, 2011). Finally we evaluated TiO_2-NP impact on the expression of several transcription factors that are known to regulate the expression of DNA repair genes, as well as on proteasome activity which is another DNA repair regulator (Kouranti, 2012). To do so, we focused on the commercial P25 TiO_2 NPs from Evonik®, named A25 in our previous study (Jugan, 2012). These NPs are also part of the NP library of the Joint Research Center of the European Commission under the reference NM105.

Methods:

Chemicals and nanoparticles:

Unless indicated otherwise, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and were >99% pure. TiO_2 NPs (Aeroxide® P25) were obtained from Evonik. Their physico-chemical characteristics were previously determined to be as follows: spherical shape, 86% anatase, diameter of 24 nm, specific surface area of 46 m^2/g and point of zero charge of 7.0 (Simon-Deckers, 2008). They were dispersed in ultrapure sterile water by sonication for 30 min at 4°C, in pulsed mode (1 s on / 1 s off) at the concentration of 10 mg/ml (Autotune 750 W sonicator, Bioblock Scientific, operated at 30% of

amplitude, corresponding to 19.82 W according to the calorimetric procedure (Taurozzi, 2011)) (Brun, 2014; Simon-Deckers, 2008). Just before cell exposure, suspensions were diluted in serum-free cell culture medium. The hydrodynamic diameter was measured on a ZetaSizer nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK) before and after dilution in the exposure medium. After dispersion in water, a hydrodynamic diameter was measured at 70 ± 20 nm, with a polydispersity index (PDI) of 0.18 ± 0.04. It shifted to 720 ± 20 nm (0.50 ± 0.02 PDI) after dilution in the exposure medium.

Cell culture and exposure conditions:

Human epithelial lung A549 alveolar carcinoma cells (CCL-185) were purchased from ATCC. This cell line was selected because the alveolar area is the most vulnerable pulmonary region towards NPs, with a high deposition rate and ineffective clearance (Geiser, 2010; Paur, 2011). Cells were cultured in DMEM (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin and glutamine. They were exposed to NPs in FBS-free cell culture medium. Exposure doses were 0; 1; 10 or 100 µg/ml (i.e. 0.17-17 µg/cm² = 1.1 pg – 0.11 ng/cell) of TiO_2 NPs, during 4; 24 or 48 h. The lower end of this dose-range roughly corresponds to the alveolar deposition theoretically obtained after 24 h of exposure to an aerosol of 1 mg/m^3 of TiO_2 NPs (Gangwal, 2011). This equivalent aerosol concentration stands between the maximum exposure concentrations recommended by the NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) and NEDO (New Energy and industrial technology Development Organization) for TiO_2 NPs (0.3 and 1.2 mg/m^3 respectively). We consider the highest end of our dose-range to be a worst case scenario. The highest cytotoxicity rate was obtained after 48 h at 100 µg/ml and did not exceed 25% (Jugan et al., 2012). When in contact with TiO_2 NPs, cell handling was carried out in the dark in order to avoid possible photoactivation of TiO_2-NPs. After NP exposure, cell layers were rinsed three times in PBS and harvested with trypsin-EDTA 0.25%.

RT-qPCR:

Gene expression was quantified by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) using a previously described protocol (Forestier, 2012). RNA concentration and purity (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} absorbance ratios) were assessed using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Each of the three biological replicates for each exposure condition was loaded in duplicate. Primer sequences are described in Table S1. The following thermal cycling steps were used: 95°C for 5 min, then 95°C for 15 s, 55°C for 20 s and 72°C for 40 s 40 times and finally 95°C for 1 min, 55°C for 30 s and 95°C for 30 s for the dissociation curve. Cq threshold was determined using the Mx-Pro 3.20 software with default settings (Stratagene). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 18S ribosomal 1 (S18) and cyclophilin B (CycloB) were chosen as reference genes for normalization using BestKeeper (Pfaffl, 2004). All three reference genes showed standard deviations of less than 1 and a strong correlation with the BestKeeper Index. mRNA expression analysis, normalization and statistical analysis were performed with REST 2009 software (Qiagen, (Pfaffl, 2001)) using the ΔΔCq method and a pair-wise fixed reallocation randomization test. PCR efficiencies were experimentally checked for compliance using a mix of all samples, with a quality criterion of 2 ± 0.3, and a theoretical value of 2 was used for calculations.

Gene promoter methylation analysis:

DNA from frozen pellets (-80°C) was extracted using the DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol with an extra RNase treatment step after cell lysis (2 min of incubation with 400 µg of RNase A, Sigma) and DNA elution was performed using nuclease-free water. DNA concentration and purity (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} absorbance ratios) were assessed using a

Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). DNA digestion was then carried out using the EpiTect® Methyl II DNA Restriction Kit (Qiagen, 335452) according to the manufacturer's recommendations and samples were stored at -20°C. The qPCR-based methylation profile analysis was performed using the EpiTect® Methyl II Signature PCR Array Human DNA Repair kit (Qiagen) with MESA Blue qPCR™ Mastermix Plus for SYBR® Assay Low ROX (Eurogentec) and a MX3005P Stratagene thermocycler, according to the manufacturer's protocol for the EpiTect® kit. Cq threshold was determined using Mx-Pro 3.20 software default settings (Stratagene) and data analysis was carried out with the EpiTect Methyl II PCR Array Excel-based data analysis template 2.0 (Qiagen).

Western blot analysis:

Total cell lysates were obtained from frozen cell pellets by centrifugation for 10 min at 16000 rcf, 4°C, in Cell Lytic™ M buffer (Sigma) containing 1X protease and phosphatase inhibitors (Roche and Life Technologies respectively). Protein samples were stored at -80°C. Total protein concentration was assessed using Bradford reagent. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and analyzed by western blot (primary antibodies: anti-PCNA (Cell Signaling 2586, 1/2000), anti-APE1 (Sigma HPA002564, 1/1000), anti-PARP1 (Cell Signaling 9542, 1/1000), anti-LIG1 (Abcam ab615, 1/1000), anti-POLε (Abcam ab134941, 1/1000), and anti-OGG1 (Abcam ab124741, 1/50 000); secondary antibodies: anti-mouse (Amersham Biosciences NA931) or anti-rabbit (Amersham Biosciences NA934)). Total protein lane intensity was assessed using the Stain Free technology (BioRad) with a Chemidoc XRS+ imager (BioRad) and was used for signal normalization between samples. Band detection was performed using the Clarity Western ECL substrate (BioRad) and the same Chemidoc XRS+ imager. Band intensities were quantified with ImageLab 5.1 software (BioRad).

Proteasome activity analysis:

Proteasome activity was assessed using the Proteasome Activity Fluorometric Assay Kit II (UBPBio), according to the manufacturer's protocol. Total cell lysates were obtained from frozen cell pellets by sonication, three times 20 s, separated by 2 min on ice, followed by centrifugation for 20 min at 16 000 rcf, 4°C, in protease inhibitor-free lysis buffer (40 mM Tris, pH 7.2, 50 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 2 mM adenosine triphosphate, 5 mM $MgCl_2$, 10% glycerol). Total protein concentration was assessed using Bradford reagent. Chymotrypsin and caspase-like activities were assessed on 20 µg of total protein per well and 2 µg for trypsin-like activity. Fluorescence was read kinetically during 60 min (excitation at 360 nm, emission at 460 nm, auto-cutoff at 455 nm) at 37°C using a SpectraMax M2 plate reader (Molecular Devices). Proteasome activity was determined as the linear regression slope between raw fluorescence and time in the linear range, after substraction of raw fluorescence from blank-wells and wells containing proteasome inhibitors (50-100 µM MG132).

Statistical analyses:

Statistical analyses were performed on at least three biological replicates. Unless indicated otherwise, statistical significance was assessed with both non-parametric one-way analysis of variance on ranks (Kruskal-Wallis) and paired comparison Mann-Whitney u-tests using Statistica 8.0 software (Statsoft). Results were considered statistically significant when p-value was < 0.05.

Results:

TiO_2 nanoparticles globally down-regulate DNA repair genes expression:

The expression of 44 DNA repair genes was analyzed by RT-qPCR in A549 cells exposed to 1, 10 or 100 µg/ml TiO_2 NPs during 4 h, 24 h or 48 h. The focus genes were selected for their central role in DNA

repair pathways BER, NER, HR, NHEJ, MMR and DR. Among the differentially expressed genes, only two were up-regulated: *XPA* and *XPE (DDB2)* at 10 and 100 µg/ml respectively, both of them at 48 h of exposure. All other significantly deregulated genes were down-regulated, especially after 4 h or 24 h of exposure at the highest concentration of NPs, i.e. 100 µg/ml. Very few genes were differentially expressed at 48 h, by comparison to 4 h and 24 h. Similarly very few genes were significantly dysregulated at 1 or 10 µg/ml as compared to 100 µg/ml (Figure 1). For this reason we focus our description thereafter on the results obtained on cells exposed to 100 µg/ml TiO_2 NPs. Schematic representations of DNA repair pathways, showing a summary of our RT-qPCR results (proteins whose encoding genes are down-regulated are depicted in blue), are shown in Figure 2.

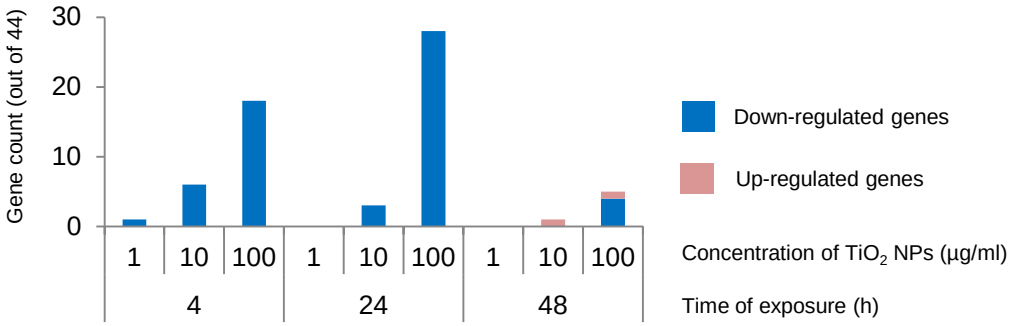


Figure 1: Global analysis of gene expression results. Number of differentially expressed DNA repair genes in the different TiO_2-NP cell exposure conditions.

With respect to our previously reported results (Jugan et al., 2012) the DNA repair pathways most susceptible to be impacted by TiO_2-NPs were the BER and the NER. Here we studied the expression of three BER glycosylases: OGG1, UNG and NTH1, which respectively deal with 8oxodG and formamidopyridine-G, uracil incorporations in DNA and thymine glycol and 5-formylU (Hegde, 2008). Out of the three corresponding genes, only *UNG* was down-regulated at 4-24 h (Figures 2 & 3). The same down-regulation trend was observed for the rest of short-patch BER genes *APE1, POLβ, XRCC1* and *LIG3*. In the long-patch BER, *PARP1, XRCC1* and *PCNA* appeared down-regulated at different time points. However *APTX*, *POLε* and *LIG1* were not differentially expressed. At 48 h, among the 11 genes analyzed in the BER pathways, only *PARP1* was down-regulated (Figures 2 & 3).

This impact on BER was further confirmed by the analysis of DNA excision activity, using a multiplexed assay (Candéias, 2010). This assay showed that excision of etheno-adenine (EthA-T) and A-8oxoG BER lesions was impaired after 24 h of TiO_2-NP exposure (Figure S1).

In the NER pathways, all genes in charge of the damage recognition and helicase activity step were down-regulated at least at 24 h, regardless of the sub-pathway, i.e. *hHR23B, XPC, XPE (DDB1/2), CSA,* and *CSB*, (Figures 2 & 3). Only *XPE (DDB2)* was up-regulated at 48 h. *XPD/ERCC2, XPA* and *XPC*, which contribute to the helix opening and damage verification step, were all down-regulated at 24 h. *ERCC1* which is involved in the strand-incision step was not affected. However gap-filling factors *PCNA, XRCC1* and *LIG3* (for non-dividing cells) were down-regulated at 4 h and/or 24 h (Figures 2 & 3).

Regarding the HR pathway, *ATM,* whose encoded protein is involved in the activation of BRCA1 and the MRN complex, was down-regulated at 4-24 h (Figures 2 & 3). Out of the three MRN complex subunits MRE11, RAD50 and NBS1, responsible for the 5'-3' exonuclease activity, only *RAD50* and *NBS1* were differentially expressed in a strongly down-regulated way at 4-24 h. HR requires the simultaneous action of large numbers of the same proteins such as RAD51. This depends on *BRCA1* and *BRCA2*, which

were also strongly down-regulated at 24 h. However *RAD54*, which is involved in the strand invasion, was not differentially expressed.

Likewise HR, NHEJ activation, regardless of the sub-pathway, largely depends on the ATM kinase and the MRN complex. As aforementioned *ATM* and *MRN* were down-regulated after 4-24 h of exposure, except *MRE11* which was not affected (Figures 2 & 3). In c-NHEJ DSB recognition is carried out by KU70 and KU80/XRCC5, whose genes were both down-regulated at various time-points. *DNA-Pkcs* and *Artemis,* which contribute to end binding and processing, were both down-regulated at 24 h. Ligation through *XRCC4* and *LIG4* was not affected. In a-NHEJ DSB recognition is performed by PARP1, whose gene expression was reduced at 24-48 h. The precise mechanisms underlying the following a-NHEJ steps are still unclear, but are supposed to involve *XRCC1, LIG3* and *LIG1*, which as mentioned before were all down-regulated at 4-24 h except *LIG1*.

Among the seven MMR genes whose expression was studied, i.e. *MSH6, MLH1, PMS1, MSH3, PCNA, POLε* and *POLα1*, all except *POLε* were down-regulated at least at 4 h (Figures 2 & 3). Many of them were also down-regulated at 24 h and only for *MLH1* did the effect carry on until 48 h.
Finally *MGMT* gene expression was unaffected by TiO_2 NPs exposure (Figure 3).
In summary we observed a global down-regulation of DNA repair genes. We thus looked for upstream factors that may explain this trend.

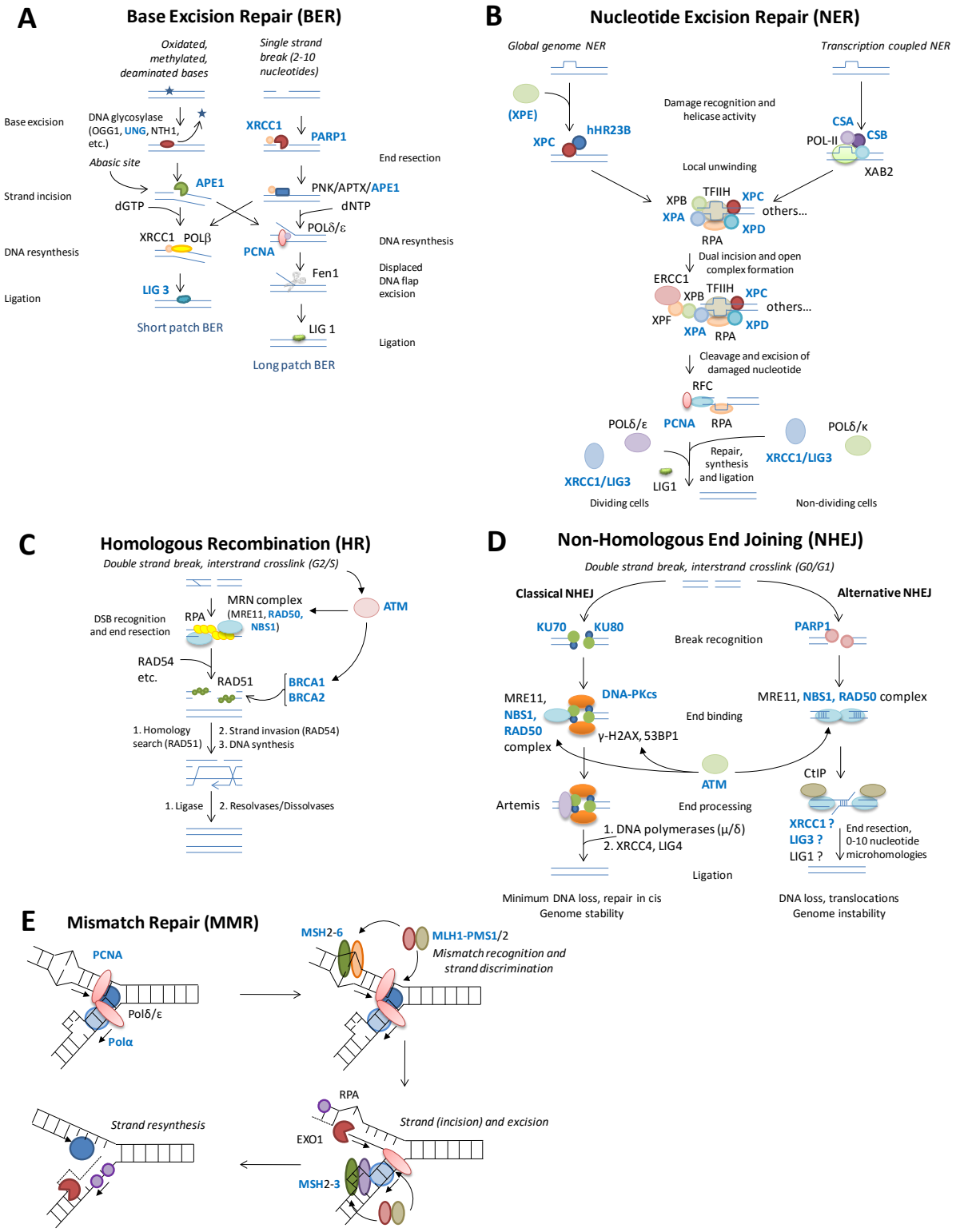


Figure 2: Schematic representation of BER, NER, HR, NHEJ and MMR pathways. Adapted from (Bak et al., 2014; Bernstein et al., 2002; Daley et al., 2013; Deriano and Roth, 2013; Fousteri and Mullenders, 2008; Hegde et al., 2008; Hoeijmakers, 2001; Peña-Diaz and Jiricny, 2012). Proteins with blue names correspond to genes that we observe significantly down-regulated after exposure to 100 μg/ml TiO_2 NPs.

Genes	4h			24h			48h		
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
OGG1									
UNG			0,44 ± 0,10			0,36 ± 0,16			
NTH1									
APE1						0,48 ± 0,16			
PARP1						0,72 ± 0,09			0,55 ± 0,11
APTX									
POLβ						0,56 ± 0,06			
XRCC1			0,81 ± 0,07						
PCNA	0,87 ± 0,06		0,64 ± 0,08			0,54 ± 0,08			
LIG3			0,75 ± 0,11			0,62 ± 0,12			
POLε									
LIG1									
hHR23B						0,70 ± 0,07			
XPC		0,67 ± 0,07	0,54 ± 0,05		0,84 ± 0,06	0,48 ± 0,06			
XPE (DDB1)			0,66 ± 0,18			0,59 ± 0,15			
XPE (DDB2)			0,66 ± 0,09			0,46 ± 0,13			1,10 ± 0,07
CSA						0,59 ± 0,08			
CSB			0,49 ± 0,14			0,47 ± 0,13			
XPB/ERCC3									
XPD/ERCC2						0,65 ± 0,10			0,75 ± 0,07
XPA						0,60 ± 0,13		1,43 ± 0,60	
ERCC1									
ATM			0,68 ± 0,07			0,64 ± 0,14			
MRE11									
RAD50			0,69 ± 0,13			0,40 ± 0,10			
NBS1		0,77 ± 0,14	0,67 ± 0,04			0,45 ± 0,07			
BRCA1						0,49 ± 0,21			
BRCA2						0,48 ± 0,15			
RAD54									
Ku70		0,82 ± 0,07	0,69 ± 0,09		0,86 ± 0,07	0,57 ± 0,11			
Ku80/XRCC5		0,71 ± 0,08				0,62 ± 0,06			0,61 ± 0,1
DNA-PKcs						0,52 ± 0,12			
Artemis						0,59 ± 0,17			
XRCC4									
LIG4									
MSH6/GTPB			0,49 ± 0,04			0,49 ± 0,06			
MLH1		0,78 ± 0,09	0,71 ± 0,03			0,64 ± 0,09			0,78 ± 0,10
PMS1			0,67 ± 0,04						
MSH3			0,68 ± 0,07		0,82 ± 0,10	0,48 ± 0,04			
POLα1			0,69 ± 0,06			0,59 ± 0,13			
MGMT									
NRF2						0,61 ± 0,11			
BCL2		0,90 ± 0,10	0,64 ± 0,07						
E2F1									

Figure 3: DNA repair genes differentially expressed in TiO_2-NP exposed cells. These results were obtained by RT-qPCR of mRNA from cells exposed for 4, 24 or 48 h to 1, 10 or 100 µg/mL TiO_2 NPs and are expressed in terms of fold-change versus controls (without NPs) ± standard deviation. Only genes with statistically-significant modulation of expression are shown, i.e. $p<0.05$. The color scale reflects the intensity of gene expression change, from light to dark blue (down-regulation) or red (up-regulation) as intensity increases.

TiO_2 nanoparticles increase the methylation rate of DNA repair gene promoters:

Since gene promoter hypermethylation can cause gene expression decrease, we assessed the methylation profile of 20 DNA repair gene promoters. Investigated genes included *APE1, ATM, BRCA1, LIG3, MLH1, MRE11, MSH2, PMS2, POLβ, RAD50, UNG, XPC* and *XRCC1*. Results show that exposure to

100 µg/ml TiO_2 NPs during 4-24 h leads to an increased methylation rate of the gene promoters of *APE1* at 4 and 24 h, *POLδ3* at 4 h, *MRE11A* at 24 h and *PMS2* at 24 h (Figure 4).

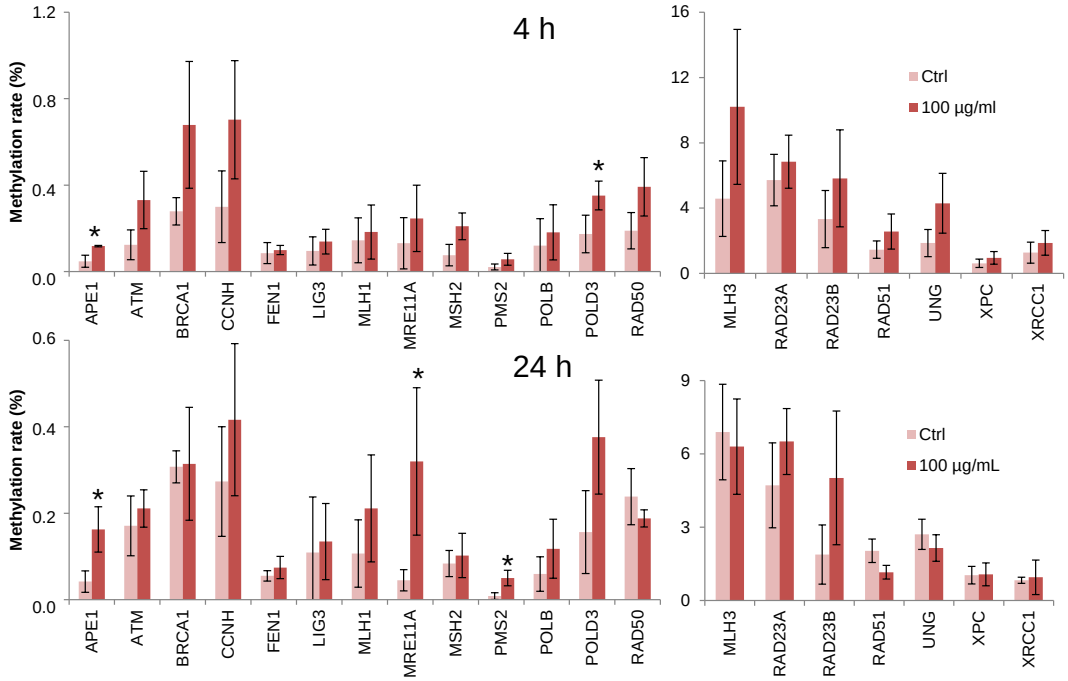


Figure 4: Methylation rate of DNA repair gene promoters. Gene promoter methylation was assessed in A549 cells after 4-24 h of exposure to 0 (Ctrl) or 100 µg/ml TiO_2 NPs. Statistical significance, exposed vs. Ctrl, (*): $p < 0.05$.

TiO_2-NP exposure down-regulates gene expression of upstream DNA repair regulators:

In order to explain the observed DNA repair gene expression patterns, the expression of four DNA repair transcriptional regulators, BCL2, E2F1, BRCA1 and NRF2, was investigated by RT-qPCR. Again the trend here shows that when these genes are differentially expressed, their expression is down-regulated (Figure 3).

TiO_2-NP exposure increases caspase-like proteasome activity:

Proteasome activity, another DNA repair regulator, was assessed using fluorogenic substrates specific for chymotrypsin (Suc-LLVY-AMC), caspase (Z-LLE-AMC) and trypsin-like (Boc-LRR-AMC) activities, respectively representing cleavage after hydrophobic, acidic and basic residues (Schmidt, 2014). Results show that 24 h of exposure to 100 µg/ml TiO_2 NPs increases caspase-like activity (Figure 5). However this effect is no longer significant at 48 h. No effect was observed at 10 µg/ml. Moreover chymotrypsin and trypsin-like activities were unaffected in all exposure conditions.

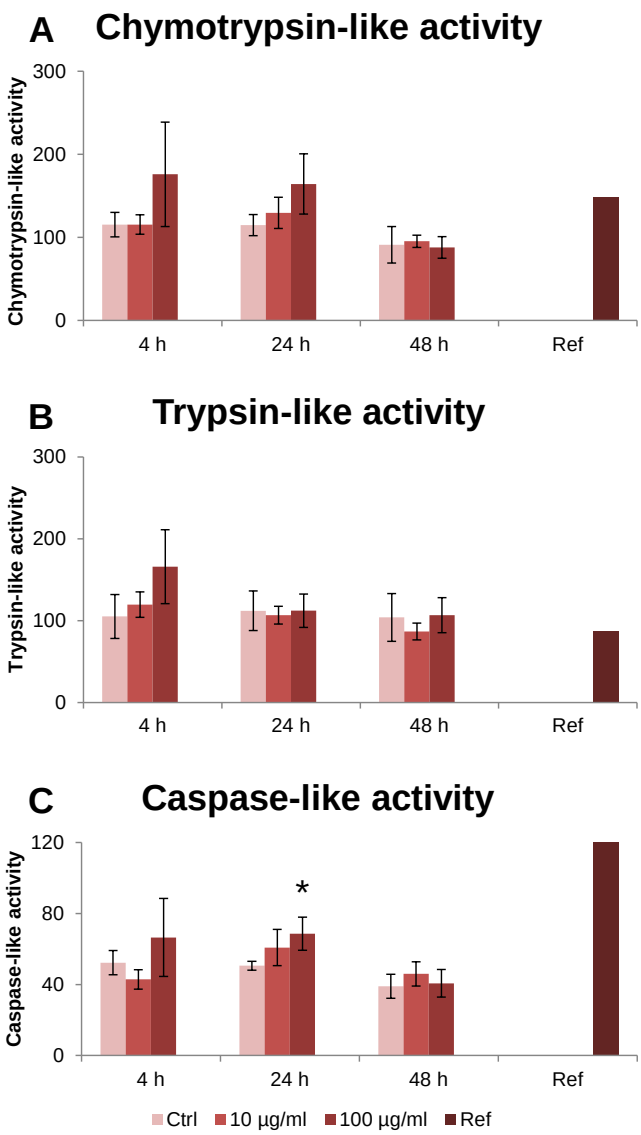


Figure 5: Proteasome activity of A549 cells exposed to TiO_2 NPs. Proteasome activity was measured in cells exposed for 4-24 h to 0 (Ctrl), 10 or 100 µg/mL TiO_2 NPs. Ref: 1.5 pmol of 20S bovine proteasome. Results are expressed in terms of fold-change versus controls (without NPs) ± standard deviation. Statistical significance, exposed vs. Ctrl, (*): $p < 0.05$.

TiO_2 NPs down-regulate the expression of DNA repair proteins:

The expression of six central DNA repair proteins was assessed by western-blot, in order to probe if the trend observed at gene level was also reflected after translation into proteins. The analysis was carried out using total protein extracts from A549 cells exposed to TiO_2 NPs, in the same exposure conditions as before. Among the list of central DNA repair proteins, we selected three proteins which were down-regulated at gene level, APE1, PARP1 and PCNA, as well as three proteins whose gene expression was unaffected, OGG1, POLε and LIG1. Most statistically significant data points indicated a down-regulation of protein expression levels (Figure 6). Down-regulation was not only observed after exposure to 100 µg/ml TiO_2-NPs, but also at 1 and 10 µg/ml TiO_2-NPs and the affected proteins seemed as much deregulated at 4-24 h as at 48 h, except PCNA. PARP1 was the only protein whose expression was up-regulated after 48 h of exposure at 10 µg/ml TiO_2-NPs. However after 48 h of exposure to 1 and 100 µg/ml TiO_2-NPs, PARP1 was also down-regulated.

	kDa	APE1 36	PARP1 116	PCNA 36	OGG1 39	POLE 261	LIG1 125
	µg/ml						
4 h	1				0,85 ± 0,09		
	10			0,73 ± 0,10	0,78 ± 0,15		0,60 ± 0,22
	100		0,26 ± 0,19	0,78 ± 0,13			0,43 ± 0,16
24 h	1				0,79 ± 0,14		
	10				0,87 ± 0,08		
	100		0,33 ± 0,24	0,69 ± 0,18	0,64 ± 0,12		0,22 ± 0,18
48 h	1		0,69 ± 0,25				0,70 ± 0,17
	10		1,56 ± 0,37				0,62 ± 0,26
	100		0,54 ± 0,30		0,68 ± 0,10		0,29 ± 0,17

Down-regulated at gene level Non-affected at gene level

Figure 6: Modulation of DNA repair protein abundance in TiO_2-NP exposed cells. These results were obtained by western-blot of protein extracts from cells exposed for 4, 24 h or 48 h to 1, 10 or 100 µg/mL TiO_2 NPs and are expressed in terms of fold-change versus controls (without NPs). Only proteins with statistically-significant modulation of abundance are shown, i.e. $p<0.05$. The color scale reflects the intensity of gene expression change, from light to dark blue (down-regulation) or red (up-regulation) as intensity increases.

Discussion:

In this article we report expression patterns of DNA repair genes and proteins in A549 cells exposed to 1-100 µg/ml TiO_2 NPs during 4-48 h. Our results show that most DNA repair genes, regardless of the pathway, are down-regulated after 4-24 h of exposure to 100 µg/ml NPs. At protein level the trend is globally the same, with the difference that down-regulation carries on until 48 h and is observed not only at high TiO_2-NP concentrations, but also at 1-10 µg/ml TiO_2 NPs. These results may explain our previously published data, which show a reduction of DNA repair activity through the BER and NER pathways after 48 h of exposure to 100 µg/ml TiO_2 NPs (Jugan, 2012).

The present results are in good correlation with other findings on silver NPs, which show a similar global down-regulation of DNA repair genes expression following exposure of lung cells (AshaRani, 2012). The same trend is also observed in liver and lymphoma cells, where Ag NPs exposure leads to reduced expression of OGG1 at gene and protein levels and to reduced gene expression of *NRF2, XPA* and *ERCC2* (Mei, 2012; Piao, 2011). A recent study also compares DNA repair gene and protein expression profiles after exposure of different species to different types of nanomaterials (Lan, 2014). A549 cells exposed to 50 µg/ml TiO_2 NPs during 24 h exhibit a down-regulation of five out of six DNA repair genes, which is consistent with our present results, and the same trend is observed with other nanomaterials (carbon black, single-wall carbon nanotubes and fullerenes). However their results differ from ours at early time points (2-4 h) where their observed trend is an up-regulation of DNA repair genes. This discrepancy may be attributed to differences in the experimental process such as the type of TiO_2 NP, the dispersion method and the exposure medium.

We show that the expression patterns of DNA repair genes and proteins may be linked with the methylation status of DNA repair gene promoters, as well as with the gene expression of some DNA repair transcription factors and an increase of caspase-like proteasome activity. Regarding the methylation status of DNA repair gene promoters, we show that the promoters of APE1, POLδ3, MRE11A and PMS2 are hypermethylated in TiO_2 NP-exposed cells. This could explain the dysregulated

expression of some DNA repair genes reported here, particularly APE1. The only engineered nanomaterials (apart from fine and ultrafine air pollution particles) whose impact on DNA methylation was investigated are SiO_2 NPs (Stoccoro, 2013). These SiO_2 NPs induce hypermethylation of *PARP1* promoter and subsequent *PARP1* gene repression in HaCaT cells (Gong, 2012). However in a previous study the authors also show that they induce global genome hypomethylation and *DNMT1, DNMT3a* and *MBD2* gene repression (Gong, 2010). This alteration of DNA methylation patterns could result from an altered activity of DNA methyl-transferases (Smolkova, 2014). However it should be pointed out that the methylation rates observed here are rather low compared to those found in some cancer cells (Lahtz, 2011), which means that it is probably not the only factor explaining the global gene repression that we observe.

Regarding the expression of upstream transcription factors, we report here some dysregulations that could explain down-regulation of DNA repair genes. Consistently with other studies (Shi, 2010; Srivastava, 2013), *BCL2* is down-regulated after 4 h of exposure. Since BCL2 indirectly up-regulates *NRF2* gene expression through the action of c-Myc, it could explain the down-regulation of *NRF2* observed here after 24 h of exposure (Niture, 2012). Besides BCL2 is a known anti-apoptotic and DNA repair repressor protein (Laulier, 2012). Its gene-level down-regulation thus suggests that DNA repair is stimulated at early time points. This correlates well with the fact that DNA repair activity slightly increases at 24 h and then decreases at 48 h of P25 TiO_2 NP exposure (Jugan, 2012). Moreover the down-regulation of *APE1* and *XPE (DDB1/2)* at 24 h could be at least partly explained by the down-regulation of BRCA1 also occurring at 24 h. Nevertheless this cannot be the only factor responsible for the repression of XPE, because *XPE* was also down-regulated at 4 h while *BRCA1* was not.

Moreover our results, showing increased caspase-like proteasome activity in TiO_2 NP-exposed cells, are consistent with those of the only related study. This latter work showed that TiO_2 nanorods increase all three components of proteasome activity when incubated *in vitro* with 20S proteasome in an acellular context (Falaschetti, 2013). Additionally and consistently with our observations, caspase-like activity fold-increase was rather higher than that of chymotrypsin and trypsin-like activities. Impact of TiO_2 NPs on proteasome activity could therefore also be an explanation to the down-regulation of DNA repair genes reported here.

This global reduction in the expression of DNA repair genes and proteins could explain the decreased excision activity of EthA-T and A-8oxoG BER lesions observed here after 24 h of TiO_2-NP exposure.
Finally it should be pointed out that even if the global trend in expression patterns was similar, there was no clear correlation between the list of affected DNA repair genes and the list of affected proteins. Indeed APE1 was down-regulated at gene level, but not after translation and it was the opposite for OGG1 and LIG1. This suggests the existence of other mechanisms taking place between transcription and translation.

The increase of caspase-like proteasome activity at 24 h could explain some of the differences between gene and protein expression patterns. Indeed it was shown for instance that heat-induced inactivation of OGG1 leads to its degradation through the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Fantini, 2013). TiO_2-NP exposure could lead to a similar inactivation of OGG1, thus triggering UPS-mediated degradation of the protein. This could explain why the corresponding gene expression is not modulated whereas the protein expression is down-regulated.

Another hypothesis may be the interaction of TiO_2 NPs with translation complexes, either inactivating or stimulating them. TiO_2 NPs may also affect cellular signaling through post-translational

modifications. Indeed TiO_2 is known for its strong affinity towards phosphate groups (Imamura, 2012). It could thus trap phosphoproteins, kinases or phosphatases in particular, either permanently or transiently. This could result in the degradation of these proteins or in the dysregulation of the cellular phosphoproteome. This hypothesis is supported by a study showing a TiO_2 NP-induced increase in phosphorylation levels of several central kinases in BEAS-2B cells (Ge, 2011).

Conclusion:

In this article we show that exposure of A549 cells to 100 µg/ml TiO_2 NPs during 4-24 h induces global repression of DNA repair genes and proteins belonging to all DNA repair pathways. We explain this down-regulation by the combination of decreased expression of upstream factors, increased methylation of some of their promoters, as well as increased caspase-like proteasome activity. Taken together these results may explain our previously published data which show that TiO_2 NPs reduce the ability of A549 cells to repair DNA. They more generally provide novel insights into TiO_2-NP toxicity mechanisms.

Acknowledgments:

This work was funded by CEA through the Toxicology research program, and via the European Commission's 7th Framework Programme project NanoMILE (Contract No. NMP4-LA-2013-310451). It is a contribution to the Labex Serenade (n° ANR-11-LABX-0064) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program of the French National Research Agency (ANR) through the A*MIDEX project (n° ANR-11-IDEX-0001-02).

Declaration of interest:

The authors report no conflict of interest.

References:

Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, Hong Y. 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. Toxicology and Applied Pharmacology 233(3): 404-410.

Ahlinder L, Ekstrand-Hammarström B, Geladi P, Ã-sterlund L. 2013. Large Uptake of Titania and Iron Oxide Nanoparticles in the Nucleus of Lung Epithelial Cells as Measured by Raman Imaging and Multivariate Classification. Biophysical Journal 105(2): 310-319.

AshaRani PV, Sethu S, Lim H, Balaji G, Valiyaveettil S, Hande MP. 2012. Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. Genome Integrity 3(1).

Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. 2002. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 511(2): 145-178.

Bruinink A, Wang J, Wick P. 2015. Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. Archives of Toxicology.

Brun E, Barreau F, Veronesi G, Fayard B, Sorieul S, Chaneac C, Carapito C, Rabilloud T, Mabondzo A, Herlin-Boime N, Carriere M. 2014. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. Particle and fibre toxicology 11(1).

Candéias S, Pons B, Viau M, Caillat S, Sauvaigo S. 2010. Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: Analysis on dedicated biochips. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 694(1-2): 53-59.

Cao Y, Jacobsen NR, Danielsen PHg, Lenz AG, Stoeger T, Loft S, Wallin Hk, Roursgaard M, Mikkelsen L, MÃ¸ller P. 2014. Vascular effects of multiwalled carbon nanotubes in dyslipidemic ApoE-/- mice and cultured endothelial cells. Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology 138(1): 104-116.

Chatterjee N, Eom H-J, Choi J. 2014. A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions. Biomaterials 35(4): 1109-1127.

Chen T, Yan J, Li Y. 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. Journal of Food and Drug Analysis(0).

Falaschetti CA, Paunesku T, Kurepa J, Nanavati D, Chou SS, De M, Song M, Jang J-t, Wu A, Dravid VP, Cheon J, Smalle J, Woloschak GE. 2013. Negatively Charged Metal Oxide Nanoparticles Interact with the 20S Proteasome and Differentially Modulate Its Biologic Functional Effects. ACS Nano 7(9): 7759-7772.

Fantini D, Moritz E, Auvré F, Amouroux R, Campalans A, Epe B, Bravard A, Radicella JP. 2013. Rapid inactivation and proteasome-mediated degradation of OGG1 contribute to the synergistic effect of hyperthermia on genotoxic treatments. DNA Repair 12(3): 227-237.

Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, Wallin H, Loft S, Moller P. 2009. Oxidatively Damaged DNA in Rats Exposed by Oral Gavage to C-60 Fullerenes and Single-Walled Carbon Nanotubes. Environmental Health Perspectives 117(5): 703-708.

Forestier A, Douki T, Sauvaigo S, De Rosa V, Demeilliers C, Rachidi W. 2012. Alzheimer's Disease-Associated Neurotoxic Peptide Amyloid-Î' Impairs Base Excision Repair in Human Neuroblastoma Cells. International Journal of Molecular Sciences 13(12): 14766-14787.

Fousteri M, Mullenders LHF. 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. Cell Research 18(1): 73-84.

Gangwal S, Brown JS, Wang A, Houck KA, Dix DJ, Kavlock RJ, Hubal EAC. 2011. Informing Selection of Nanomaterial Concentrations for ToxCast in Vitro Testing Based on Occupational Exposure Potential. Environmental Health Perspectives 119(11): 1539-1546.

Ge Y, Bruno M, Wallace K, Winnik W, Prasad RY. 2011. Proteome profiling reveals potential toxicity and detoxification pathways following exposure of BEAS-2B cells to engineered nanoparticle titanium dioxide. PROTEOMICS 11(12): 2406-2422.

Geiser M, Kreyling W. 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. Particle and Fibre Toxicology C7 - 2 7(1): 1-17.

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Hof VI, Heyder J, Gehr P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. Environmental Health Perspectives 113(11): 1555-1560.

Golbamaki Bakhtyari N, Rasulev B, Cassano A, Marchese Robinson RL, Leszczynski J, Benfenati E, Cronin MTD. 2015. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: Review of Recent data and discussion of possible mechanisms. Nanoscale 7: 2154-2198.

Gong C, Tao G, Yang L, Liu J, Liu Q, Li W, Zhuang Z. 2012. Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of nano-SiO2-induced decrease of PARP-1 mRNA expression. Toxicology Letters 209(3): 264-269.

Gong C, Tao G, Yang L, Liu J, Liu Q, Zhuang Z. 2010. SiO2 nanoparticles induce global genomic hypomethylation in HaCaT cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 397(3): 397-400.

Hanagata N, Zhuang F, Connolly S, Li J, Ogawa N, Xu M. 2011. Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis. ACS nano 5(12): 9326-9338.

Hegde ML, Hazra TK, Mitra S. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. Cell Research 18(1): 27-47.

Hoeijmakers JHJ. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411(6835): 366-374.

Imamura H, Wakabayashi M, Ishihama Y. 2012. Analytical strategies for shotgun phosphoproteomics: Status and prospects. Seminars in Cell & Developmental Biology 23(8): 836-842.

Jugan M-L, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M. 2012. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. Nanotoxicology 6(5): 501-513.

Kouranti I, Peyroche A. 2012. Protein degradation in DNA damage response. Seminars in Cell & Developmental Biology 23(5): 538-545.

Kunkel TA, Erie DA. 2005. DNA MISMATCH REPAIR. Annual Review of Biochemistry 74(1): 681-710.

Lahtz C, Pfeifer GP. 2011. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. Journal of Molecular Cell Biology 3(1): 51-58.

Lan J, Gou N, Gao C, He M, Gu AZ. 2014. Comparative and Mechanistic Genotoxicity Assessment of Nanomaterials via a Quantitative Toxicogenomics Approach across Multiple Species. Environmental Science & Technology 48(21): 12937-12945.

Laulier C, Lopez BS. 2012. The secret life of Bcl-2: Apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 751(2): 247-257.

Li JJ, Lo S-L, Ng C-T, Gurung RL, Hartono D, Hande MP, Ong C-N, Bay B-H, Yung L-YL. 2011. Genomic instability of gold nanoparticle treated human lung fibroblast cells. Biomaterials 32(23): 5515-5523.

Li N, Ma L, Wang J, Zheng L, Liu J, Duan Y, Liu H, Zhao X, Wang S, Wang H, Hong F, Xie Y. 2010. Interaction Between Nano-Anatase TiO2 and Liver DNA from Mice In Vivo. Nanoscale Research Letters 5(1): 108-115.

Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. Nanotoxicology 8(3): 233-278.

Mei N, Zhang Y, Chen Y, Guo X, Ding W, Ali SF, Biris AS, Rice P, Moore MM, Chen T. 2012. Silver nanoparticle-induced mutations and oxidative stress in mouse lymphoma cells. Environmental and Molecular Mutagenesis 53(6): 409-419.

Mroz RM, Schins RPF, Li H, Jimenez LA, Drost EM, Holownia A, MacNee W, Donaldson K. 2008. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. European Respiratory Journal 31(2): 241-251.

Niture SK, Jaiswal AK. 2012. Nrf2 Protein Up-regulates Antiapoptotic Protein Bcl-2 and Prevents Cellular Apoptosis. Journal of Biological Chemistry 287(13): 9873-9886.

Paur H-R, Cassee FR, Teeguarden J, Fissan H, Diabate S, Aufderheide M, Kreyling WG, Hänninen O, Kasper G, Riediker M, Rothen-Rutishauser B, Schmid O. 2011. In vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung - A dialog between aerosol science and biology. Journal of Aerosol Science 42(10): 668-692.

Pfaffl M, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 26(6): 509-515.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29(9).

Piao MJ, Kim KC, Choi J-Y, Choi J, Hyun JW. 2011. Silver nanoparticles down-regulate Nrf2-mediated 8oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human Chang liver cells. Toxicology Letters 207(2): 143-148.

Schmidt M, Finley D. 2014. Regulation of proteasome activity in health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1843(1): 13-25.

Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and fibre toxicology 10(1).

Shi YL, Wang F, He JB, Yadav S, Wang H. 2010. Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. Toxicology Letters 196(1): 21-27.

Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicology in Vitro 25(1): 231-241.

Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'Hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carriere M. 2008. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. Toxicology 253(1-3): 137-146.

Smolkova B, El Yamani N, Collins AR, Gutleb AC, Dusinska M. 2014. Nanoparticles in food. epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. Food and Chemical Toxicology.

Srivastava RK, Rahman Q, Kashyap MP, Singh AK, Jain G, Jahan S, Lohani M, Lantow M, Pant AB. 2013. Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. Human & Experimental Toxicology 32(2): 153-166.

Stoccoro A, Karlsson HL, Coppedè F, Migliore L. 2013. Epigenetic effects of nano-sized materials. Toxicology 313(1): 3-14.

Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR. 2011. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment - issues and recommendations. Nanotoxicology 5(4): 711-729.

Supplementary materials:

Table S1: Primer sequences and information used here for DNA repair genes.

Gene symbol	NCBI accession number	Forward primer (5'->3')	Reverse primer (5'->3')	Amplicon size (bp)
APE1/Ref1	NM_001641.2	gctgcctggactctctcatc	gctgttaccagcacaaacga	180
APTX	NM_175073.1	cagcgaatcagacttccaca	gagtcaatgctggtgggatt	167
Artemis	NM_001033858.1	tgttgtctctggcattcagc	attgaggccagaggaagtga	167
ATM	NM_000051.3	ggacagtggaggcacaaaat	gtgtcgaagacagctggtga	187
BCL2	NM_000633.2	gaactgggggaggattgtgg	catcccagcctccgttatcc	164
BRCA1	NM_007294.3	ctgcttgaagtctcccttgg	actctgtgcttccagcccta	176
BRCA2	NM_000059.3	taggaggccaagttccctct	ggtatgagccatccaccatc	187
CSA	NM_000082.3	cggtgtgaggacacgatatg	cacaccatctgaaccacctg	218
CSB	NM_000124.2	gaaacggcagaagaaagtgc	aatcgtcctccagcttcaga	224
CycloB	NM_000942.4	gcaagatcgaggtggagaag	ctgtggaatgtgaggggagt	171
DDB1 (XPE)	NM_001923.3	aacagagtggcgagagcatt	tcaatgacatgcagctcctc	223
DDB2 (XPE)	NM_000107.2	tcaaggacaaacccaccttc	gtgaccaccattcggctact	226
DNAPKcs	NM_006904.6	catggaagaagatccccaga	tgggcacaccactttaacaa	198
E2F1	NM_005225.2	acaaggcccgatcgatgttt	gttcttgctccaggctgagt	185
ERCC1	NM_202001.1	ttgtccaggtggatgtgaaa	gctggtttctgctcataggc	151
GAPDH	NM_002046.3	gagtcaacggatttggtcgt	ttgattttggagggatctcg	238
hHR23B / Rad23 (B)	NM_002874.4	gtgaccaaacccaaagcagt	ggtgtctctgctggcttttc	248
Ku70/XRCC6	NM_001469.3	agaggagctgaagacccaca	cctctggtcagtcctggaag	155
Ku80/XRCC5	NM_021141.3	ccccaattcagcagcatatt	ccttcagccagactggagac	235
LIG1	NM_000234.1	aggagtggaatggagtggtg	aggtgtcagagagggaagca	207
LIG3	NM_013975.2	gctcagcaggagatggtttc	tctaggtcccgtgccatatc	160
LIG4	NM_002312.3	ggacgatttctcccgttttt	gcggtgatgaatcttctcgt	186
MGMT	NM_002412.3	tggagctgtctggttgtgag	ctggtgaacgactcttgctg	232
MLH1	NM_000249.2	gtgctggcaatcagggaccc	cacggttgaggcattgggtag	215
PMS1	NM_000534.4	gcggcaacagttcgactcctt	agccttgataccctccccgtt	174
MRE11	NM_005591.3	cccagaggagcttgactgac	ttcattttcctgggcaagtc	180
MSH3	NM_002439.2	gagagtaatgataattaccg	aggcaatggcaattccatca	305
MSH6/GTPB	NM_000179.2	ccctcagccaccaaagaagca	ctgccaccacttcctcatccc	288
Nbs1	NM_002485.4	ttggttgcatgctcttcttg	ggctgcttcttggactcaac	233
NRF2	NM_006164.4 ; NM_001145413.2 ; NM_001145412.2	cagtcagcgacggaaagagt	acctgggagtagttggcaga	198
NTH1	NM_002528.5	cagcaacagctggtcaacat	cgtcacctggtctttggttt	165
OGG1	NM_002542.5	tggaagaacagggcgggcta	atggacatccacgggcacag	164
PARP1	NM_001618.3	gctcctgaacaatgcagaca	cattgtgtgtggttgcatga	233
PCNA	NM_002592.2	ggctctagcctgacaaatgc	gcctccaacaccttcttgag	224
POLα1	NM_016937.3	ctcattgcaacgtggttggg	gggctccatatctgttcccg	216
POLβ	NM_002690.1	gagaagaacgtgagccaagc	cgtatcatcctgccgaatct	204
POLε	NM_006231.2	gtcacaggctctcggaactc	cctcaggaagcacgtaggag	247
RAD50	NM_005732.2	cttggatatgcgaggacgat	ccagaagctggaagttacgc	215
RAD54	NM_003579.3	ccatcgagccctgactttgt	tttgaccatctcgccagacc	154
S18	NR_003286.2	aacgtctgccctatcaacttt	tggatgtggtagccgttttct	117
UNG	NM_080911.1	aatggcagctgtatccaacc	caccccaacatctgtcactg	247
XPA	NM_000380.3	gcagccccaaagataattga	tggcaaatcaaagtggttca	183
XPB/ERCC3	NM_000122.1	gcggcagagattcttggtag	ggccccagacatagaactca	235
XPC	NM_004628.4	ccatgaggacacacacaagg	tccaatgaaccacttcacca	187
XPD/ERCC2	NM_000400.3	gctggacatctaccccaaga	ccggatcacagcaatatcct	166
XRCC1	NM_006297.2	cagccctacagcaaggactc	gctgtgactggggatgtctt	209
XRCC4	NM_003401.3	cattgttgtcaggagcagga	tctgcaggtgctcatttttg	219

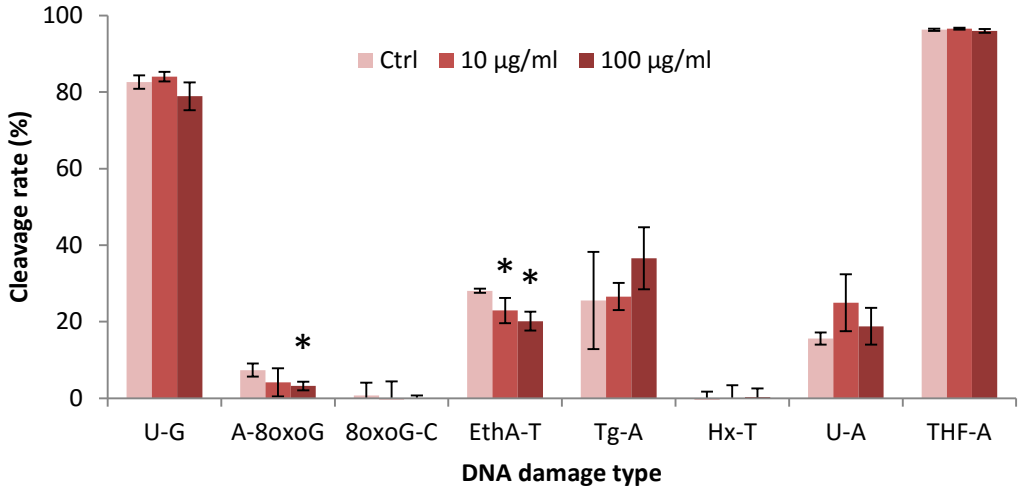


Figure S1: Excision rates for eight DNA lesion substrates for BER. These lesions include uracile opposite guanine "U-G", adenine opposite 8oxo guanine "A-8oxoG", 8oxo guanine opposite cytosine "8oxoG-C", etheno-adenine opposite thymine "EthA-T", thymine glycol opposite adenine "Tg-A", hypoxanthine opposite thymine "Hx-T", uracile opposite adenine "U-A" and tetrahydrofuran (equivalent to an abasic site) opposite adenine "THF-A". Excision rates were assessed in A549 cells following 24 h exposure to 0 (Ctrl), 10 or 100 µg/ml TiO2 NPs. Statistical significance, exposed vs. Ctrl, (*): $p < 0.05$.

Supplementary methods:

Method S1: BER excision activity analysis

After 24 h NP exposure cells were harvested, re-suspended in culture medium containing additional 10% FBS and 10% dimethylsulfoxide and frozen in liquid nitrogen. Nuclear extracts were prepared (Millau, 2008) and DNA glycosylase and AP-endonuclease excision activity was analyzed as previously described (Candéias, 2010). Statistical analyses were performed on 3 biological replicates and significance was assessed with both non-parametric one-way analysis of variance on ranks (Kruskal-Wallis) and paired comparison Mann-Whitney u-tests using Statistica 8.0 software (Statsoft). Results were considered statistically significant when p-value was < 0.05.

Supplementary references:

Candéias S, Pons B, Viau M, Caillat S, Sauvaigo S. 2010. Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: Analysis on dedicated biochips. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 694(1-2): 53-59.

Millau JF, Raffin AL, Caillat S, Claudet C, Arras G, Ugolin N, Douki T, Ravanat JL, Breton J, Oddos T, Dumontet C, Sarasin A, Chevillard S, Favier A, Sauvaigo S. 2008. A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates. Lab on a Chip 8(10): 1713-1722.

Discussion complémentaire à l'article 1

Cette étude indique que les NP de TiO_2 induisent une répression globale des gènes de réparation de l'ADN aux temps d'exposition courts de 4 et 24 h. Les données suggèrent que cette répression pourrait être expliquée au moins en partie par la répression de régulateurs transcriptionnels, ainsi que par l'augmentation de l'activité caspase du protéasome et de la méthylation des promoteurs de certains de ces gènes. Toutefois d'autres hypothèses sont également concevables. Il est en particulier possible que les dommages à l'ADN engendrés par l'exposition aux NP de TiO_2 affectent les régions du génome correspondant aux gènes de réparation et que ces dommages bloquent leur transcription, nécessitant l'intervention de protéines de réparation. Les résultats montrent qu'à 48 h d'exposition les gènes de réparation ne sont à quelques exceptions près plus réprimés, alors que les protéines correspondantes le sont encore. Cela signifierait que 48 h suffisent à réparer les dommages permettant de redémarrer la transcription, mais que ce délai n'est pas encore suffisant pour retrouver des niveaux d'expression protéiques comparables à ceux des contrôles. Cependant les données concernant les cinétiques usuelles de synthèse des protéines de réparation manquent dans la littérature pour étayer ces hypothèses. Il pourrait être intéressant d'analyser la quantité de protéines et l'activité de réparation à des temps d'exposition supérieurs à 48h, afin de déterminer si les cellules réussissent à s'adapter au stress nanoparticulaire. Cependant de telles durées d'exposition nécessiteraient de modifier le modèle d'étude en ajoutant du sérum au milieu de culture, afin d'éviter de sur-stresser les cellules.

Le fait que l'ensemble des voies de réparation de l'ADN soit affecté par cette répression des gènes de réparation est frappant. En effet une précédente étude menée au laboratoire dans les mêmes conditions expérimentales montre que les NP de TiO_2 induisent des dommages à l'ADN, mais pas de cassure double-brin (Jugan et al., 2012). Cependant la présence de telles cassures n'a été étudiée qu'à 24 h d'exposition et il se pourrait que des cassures doubles-brins apparaissent à d'autres temps d'exposition. De plus d'autres études observent ce type de cassures dans divers modèles exposés aux NP de TiO_2 (Kansara et al., 2014; Shi et al., 2013; Toyooka et al., 2012; Zhang et al., 1998). Néanmoins il reste concevable qu'une perturbation des voies de réparation des cassures doubles-brins ait lieu en l'absence de telles cassures. Cela suggèrerait que le mécanisme responsable de cette perturbation est indépendant de la nature des dommages à l'ADN.

Il est également intéressant de constater que l'on observe ici une diminution de l'expression des gènes et des protéines de réparation de l'ADN à 24 h d'exposition, alors qu'une augmentation de l'activité de réparation a été précédemment observée dans ces mêmes conditions (Jugan et al., 2012). Cela pourrait signifier que face à l'accumulation de dommages à l'ADN, les cellules activent leurs systèmes de réparation, jusqu'à leur épuisement en raison du manque de transcription et de traduction de nouvelles protéines fonctionnelles, ce qui pourrait également être lié avec l'augmentation concomitante de l'activité du protéasome. Cette hypothèse serait cohérente avec la chute des capacités cellulaires de réparation de l'ADN observée à 48 h (Jugan et al., 2012). Toutefois la littérature manque d'exemples de telles diminutions de la quantité de protéines de réparation fonctionnelles.

Article 2: TiO_2 nanoparticles alter the cellular phosphoproteome in A549 cells

Ce deuxième article vise à étudier l'hypothèse selon laquelle les NP de TiO_2 pourraient, via leur forte affinité pour les groupements phosphates, perturber le phosphoprotéome des cellules exposées, ce qui pourrait entre autres altérer la signalisation de la réparation de l'ADN, laquelle dépend de nombreux phénomènes de phosphorylation. Nous avons pour cela réalisé une analyse qualitative et quantitative du phosphoprotéome par phosphoprotéomique shotgun, en nous focalisant sur une seule condition d'exposition, i.e. 24 h d'exposition à 100 µg/mL de NP de TiO_2.

Nous avons comparé le niveau de phosphorylation des protéines détectées dans les deux types d'échantillons à l'aide de trois indicateurs complémentaires : le nombre de phosphorylations par protéine, le nombre de phosphopeptides par protéine et le nombre de sites phosphorylés différents par protéine. En parallèle une comparaison du niveau de phosphorylation de chaque site de phosphorylation entre les deux conditions d'exposition a également été réalisée.

On observe qu'à l'échelle globale de l'ensemble des phosphoprotéines détectées, les NP de TiO_2 n'induisent aucune altération significative des niveaux de phosphorylation. Une perturbation significative est en revanche constatée lorsque l'on considère les protéines et les sites de phosphorylation de manière individuelle. Cette perturbation affecte 89 protéines et 139 sites de phosphorylation. A l'échelle des protéines, la tendance est à la hausse du niveau de phosphorylation après exposition des cellules aux NP de TiO_2, tandis qu'à l'échelle des sites de phosphorylation on observe plutôt une diminution de la phosphorylation. Une augmentation du taux de prolines est en outre observée parmi les deux acides aminés encadrant les sites de phosphorylation perturbés.

L'analyse de l'ontologie protéique des protéines phospho-dérégulées indique que celles-ci sont impliquées dans de nombreux processus et mécanismes cellulaires. On note en particulier un impact sur la progression du cycle cellulaire, l'organisation du cytosquelette, les fonctions de maintien de l'intégrité cellulaire, les processus liés à la mort et à la survie cellulaire, le transport moléculaire et les mécanismes inflammatoires. La pertubation du cycle cellulaire est par ailleurs confirmée de manière indépendante par marquage des cellules à l'iodure de propidium et analyse en cytométrie en flux.

D'une manière générale, les processus biologiques révélés ici impactés par l'exposition aux NP de TiO_2 reflètent les effets toxiques rapportés dans la littérature pour ces NP. Cette étude met donc en évidence un nouveau mécanisme amont potentiellement explicatif de la toxicité cellulaire des NP de TiO_2, i.e. la perturbation du phosphoprotéome. Son lien avec la réparation de l'ADN sera examiné plus en détails dans les résultats et la discussion complémentaires à cet article.

L'enrichissement en prolines autour des sites de phosphorylation dérégulés suggère de nouvelles pistes d'étude des mécanismes structuraux ayant lieu à l'interface NP de TiO_2 – milieu intracellulaire. En effet, cela laisse penser que ces NP exercent un impact plus important sur les kinases et phosphatases spécifiques des sites de phosphorylation accolés à des prolines que sur les autres kinases/phosphatases, dont l'activité est à l'inverse majoritairement inhibée par la présence de prolines. Cet impact préférentiel pourrait être lié à une interaction directe entre les NP de TiO_2 et les kinases/phosphatases spécifiques des prolines, dont les NP pourraient mimer les substrats. L'interaction pourrait également être plus indirecte et découler de la présence de nombreuses protéines porteuses de prolines dans la couronne protéique des NP.

Enfin, cette étude présente un intérêt du point de vue méthodologique, dans la mesure où elle décrit une méthode originale d'analyse comparative de données de phosphoprotéomique shotgun, basée entre autres sur différents indicateurs complémentaires du niveau de phosphorylation des protéines. Cette approche pourrait être réutilisée dans de futures études phosphoprotéomiques.

Cet article a été soumis fin juillet 2015 au comité de lecture du journal *Metallomics*.

TiO_2 nanoparticles alter the cellular phosphoproteome in A549 cells

M. Biola-Clier,[a,b] J-C. Gaillard,[c] L. Armand,[a,b] N. Herlin-Boime,[d] T. Douki,[a,b] J. Armengaud[c,†,‡] and M. Carrière[a,b,†,‡]

[a]Univ. Grenoble Alpes, INAC, SCIB, F-38000 Grenoble, France.
[b]CEA, INAC, SCIB, F-38054 Grenoble, France.
[c]CEA, DSV/Li2D, Laboratory "Innovative technologies for Detection and Diagnostics", BP 17171, F-30200 Bagnols-sur-Cèze, France
[d]UMR 3685 IRAMIS NIMBE LEDNA, bât. 522, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

[†]These authors contributed equally to the study as senior authors and should be considered co-last authors.

[‡]Correspondence: Marie Carrière, CEA Grenoble, LAN, Bat C5 pce 362, F-38054 Grenoble, France; Phone: +33 4 38 78 03 28, fax: +33 4 38 78 50 90. Jean Armengaud, CEA Marcoule, Li2D, pce B170 - L2026, F-30200 Bagnols-surCèze, France. Phone : +33 4 66 79 68 02, fax : +33 4 66 79 19 05.

Abstract:

TiO_2 nanoparticles (NPs) are one of the most produced NPs worldwide and are used in numerous consumer products. Their impact on human health, especially through inhalation, is of utmost interest. TiO_2 is known for its strong affinity towards phosphates. However its interaction with the phosphoproteome upon accumulation in cells remains unclear. The present study documents the interaction of a widely used commercial TiO_2 NP with the phosphoproteome from A549 human pulmonary alveolar epithelial cells. We used a label-free shotgun proteomic approach including phosphopeptide enrichment by means of strong cation exchange and immobilized metal affinity chromatographies (SCX-IMAC). The comparative and functional phosphoproteomic analysis shows that TiO_2 NPs induce a cellular phosphoproteome scrambling with changes of phosphorylation status and sites of specific proteins. The main impacted biological functions and processes are cell cycle progression and cytoskeleton integrity. P53 pathway activation, DNA repair and other cell death and survival processes, as well as inflammation, oxidative stress response and molecular transport are also affected. Impact on cell cycle progression was further confirmed by fluorescence activated cell sorting measurements. Together these results confirm the main toxicity mechanisms reported in the literature for TiO_2 NPs and bring novel insights into upstream pathways, suggesting that they may be linked with cellular phosphoproteome scrambling.

Introduction:

Titanium dioxide (TiO_2) is a largely produced white pigment used in a wide range of everyday life products such as food, cosmetics or paints[1]. Additionally it exhibits photocatalytic properties that are exacerbated at the nanometer scale, making it one of the top nanomaterials in the world in terms of production mass. Its annual nanosized production approximately amounts to 3,800-7,800 tons in the US alone and TiO_2 NPs are estimated to be present in about 9% of nanomaterial containing products[2]. These large volumes raise the question of their impact on human health, especially through inhalation, which is the first exposure route in occupational settings[1].

TiO_2 nanoparticles (NPs) were shown to induce cell mortality through apoptosis or necrosis, inflammation, oxidative stress and genotoxicity in various *in vivo* or *in vitro* models[1, 2]. Results from animal inhalation exposures at high doses also led to the classification of TiO_2 by IARC (International

Agency for Research on Cancer) as possibly carcinogenic (2B group). At molecular scale, these effects are reflected by an impact on numerous biological targets. *In vitro* studies showed that TiO_2 NPs are internalized in most cell types, mainly through endocytosis, and accumulate in the cytoplasm either in vesicles or as free particles[3, 4]. TiO_2 NPs induce oxidative stress, mainly through production of reactive oxygen species (ROS) and impairment of the antioxidant cellular response capacity, i.e. depletion of antioxidant glutathione, inhibition of antioxidant enzymes, etc., leading to lipid peroxidation and DNA oxidative damage[5, 6]. Lipid peroxidation as well as disruption of lysosomal membranes are thought to trigger cathepsin release and caspase activation, resulting in apoptosis[2]. Induction of apoptosis could also be linked with altered mitochondrial and/or cytoskeletal integrity. *In vivo* studies showed that TiO_2-NP inhalation can lead to pulmonary fibrosis and emphysema[5, 7]. These inflammatory affections are associated with macrophage and neutrophil activation, as well as secretion of inflammatory cytokines and modulation of inflammation related genes[1, 5, 7, 8]. Finally TiO_2 NPs are able to induce genotoxicity[9], which is primarily reflected by DNA single/double-strand breaks and/or alkali-labile sites, as well as oxidative lesions. Chromosomal damage and mutagenicity are more seldom reported. This genotoxic damage is thought to mainly result from oxidative stress. However it could also be triggered by other phenomena[10]. Indeed it was shown in particular in pulmonary models that TiO_2 NPs could disrupt cell cycle progression[11-16], impair mitotic spindle positioning[17] and decrease DNA repair activity[18], which may amplify the genotoxic response in TiO_2-NP exposed cells.

One hypothesis to explain these effects is alteration of cellular signaling, especially through post-translational modifications such as phosphorylation. Indeed TiO_2 has been known for a long time for its strong affinity towards phosphate groups and is commonly used in phosphoproteomics to purify phosphopeptides[19]. It could thus trap phosphoproteins either permanently or transiently. This could result in the degradation of these proteins or in the dysregulation of the cellular phosphoproteome. This hypothesis is supported by a study which showed a TiO_2-NP induced increase in the phosphorylation level of several central kinases in BEAS-2B cells[20]. A similar induction of acetylation levels in cytoplasmic proteins was observed in macrophages[21]. Such dysregulations could have serious consequences, as these post-translational modifications regulate the activity of proteins involved in almost all cellular processes[22].

Current state of the art large-scale quantitative proteomic methods are based on shotgun approaches, which offer deeper proteome characterization than 2D gel-based techniques[23]. They consist in the digestion of the proteome, followed by a LC-MS/MS analysis of the resulting peptides. Their quantification is achieved either through the use of stable isotope labeling and sample mixing or through label-free approaches and separate sample analysis. Both techniques provide valuable results. However, label-free methods are much more popular because they are less time consuming. They enable protein quantification to be achieved either through LC-MS peak intensity analysis or MS/MS spectral counting. The major drawback of the first approach is that any slight drift in retention time can lead to peptide identification problems, resulting in high variations even for analytical replicates of the same sample. In comparison, spectral counting, which is based on a proportionality assumption between peptide concentration and the number of corresponding MS/MS spectra, was shown to produce reproducible results meanwhile offering a large dynamic range. In addition phosphoproteomic analyses, compared to regular proteomics, need to tackle the issue that phosphopeptides are usually not very abundant[19]. Comprehensive phosphoproteomic studies therefore require phosphopeptide enrichment. The gold-standard for a broad enrichment of peptides containing serine/threonine and tyrosine phosphorylation sites is a two-step process consisting in

phosphopeptide pre-enrichment by strong cation exchange (SCX) or hydrophilic interaction chromatography (HILIC), followed by phosphopeptide affinity enrichment by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) or TiO_2-based metal affinity chromatography (TiO_2-MOAC). These methods all produce similar high quality results, but slightly different types of phosphopeptides may be enriched depending on the experimental set-up. For instance TiO_2-MOAC best enriches mono-phosphorylated peptides whereas IMAC specializes more in the purification of multi-phosphorylated ones. The combination of both approaches in a sequential way leads to the broad enrichment of both types of phosphopeptides. However every additional step in sample preparation increases sample loss, thereby challenging the comprehensiveness of the phosphoproteome analysis.

Here, we aimed at further characterizing the impact of TiO_2-NPs on the cellular phosphoproteome of A549 human pulmonary epithelial alveolar cells, having in mind to identify a possible mode of action of these NPs explaining the functional impact reported by other studies[1]. To achieve this goal, we focused on one type of widely used commercial TiO_2 NPs (P25, Evonik®, named A25 in our previous study[18]) that is part of the NP library of the Joint Research Center of the European Commission under the reference NM105. We used a shotgun phosphoproteomics approach consisting in SCX-IMAC phosphopeptide enrichment followed by nanoLC-MS/MS analysis performed with a high resolution tandem mass spectrometer. Large scale data mining tools then enabled us to conduct both a comparative and functional analysis of the phosphoproteome of TiO_2-NP exposed versus control cells. It is to our knowledge the first time that such an approach with three whole protein phosphorylation indicators and an independent phosphorylation site focused analysis is employed in a comparative phosphoproteomic toxicological study.

Results:

Phosphoproteomic data acquisition and interpretation:

Experimental strategy and set-up:

Phosphoproteomes of control and TiO_2-NP exposed cells were analyzed through a shotgun phosphoproteomics approach inspired by a previously described protocol[24]. Figure 1 shows the experimental procedure performed on three biological replicates per exposure condition. A549 human alveolar pulmonary cells were exposed to 100 µg/ml (i.e. 17 µg/cm² = 0.11 ng/cell) TiO_2 NPs during 24 h. Total proteins were extracted and digested with trypsin, leading to the collection of about 2 mg of peptides per sample. For the six samples, 1 mg of peptides was then desalted and subjected to SCX chromatography to pre-enrich phosphopeptides. These were previously shown to be mainly eluted between minutes 8 to 16 of the designed gradient[24]. Phosphopeptides collected in two separate 4-min fractions were desalted and then further enriched by IMAC. The resulting enriched phosphopeptide samples were analyzed by nanoLC-MS/MS. MS/MS spectra interpretation was carried out using the human SwissProt database with standard parameters. For data interpretation, whole protein phosphorylation levels were studied using three different complementary criteria: the phosphorylation count (i.e. number of detected phosphorylated residues on all peptide sequences of a given protein), the phosphopeptide count (i.e. number of phosphopeptides detected for a given protein) and the phosphorylated sites count (i.e. number of unique phosphorylated sites on the different peptides detected for a given protein). For example, if a twice-phosphorylated peptide was detected three times, it would account for 6 in terms of phosphorylation count, 3 for the phosphopeptide count and 2 for the phosphorylated sites count (Figure S1). Each of these three criteria constitutes a different observation angle on protein phosphorylation levels. Since the present analysis

was conducted on enriched phosphopeptides only, none of these three criteria represents a direct observation of individual protein expression levels, but rather the consequence of expression and post-translational changes. Among the three criteria, the phosphopeptide count is the most prone to be affected by protein expression changes. Therefore, comparison of the three complementary criteria enables distinguishing between over/under-expressed and phospho-dysregulated proteins.

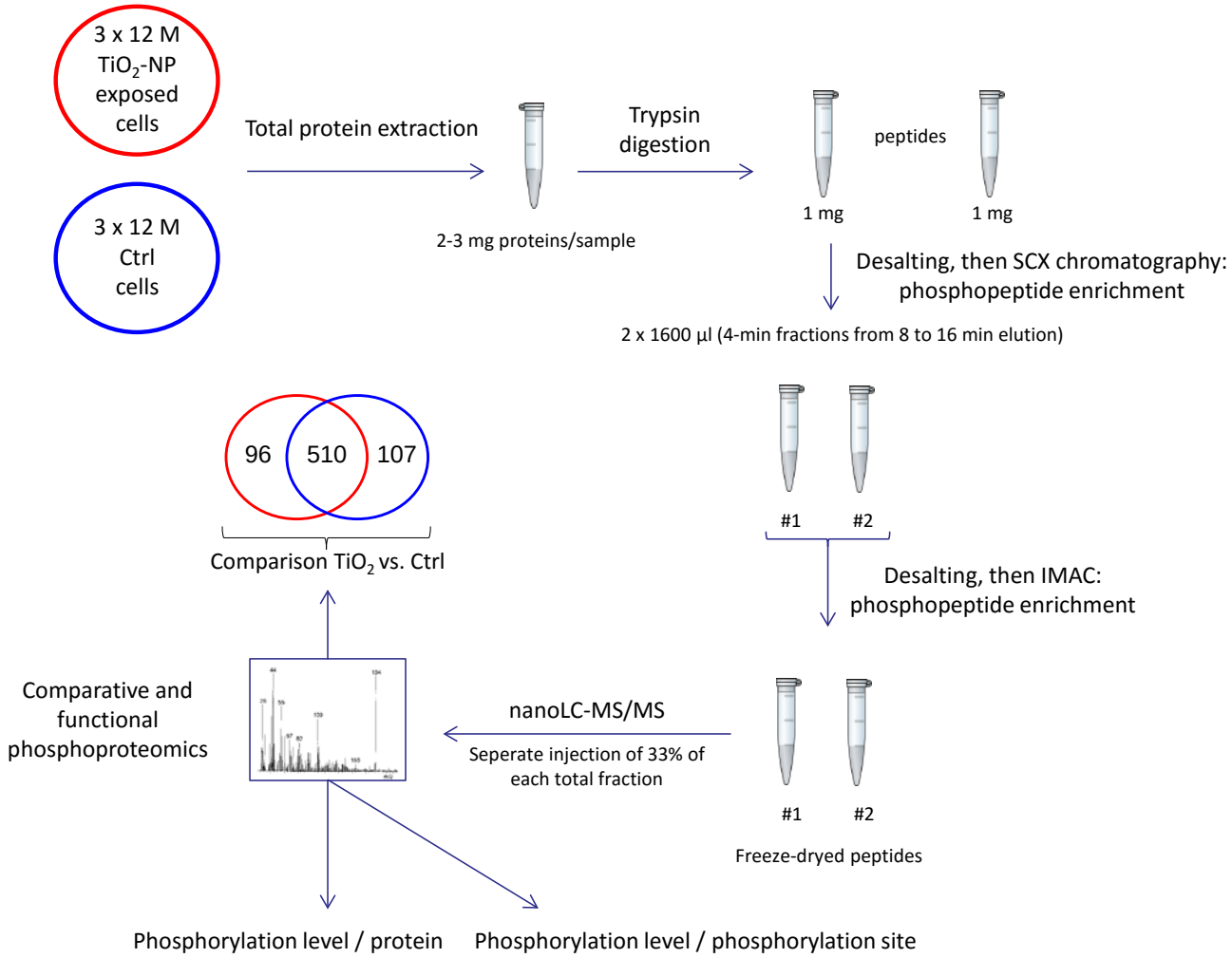


Figure 1. Global experimental strategy for the phosphoproteomic analysis of control (Ctrl) and TiO_2-NP exposed cells (TiO_2). SCX: strong cation exchange (chromatography); IMAC: immobilized metal affinity chromatography.

The functional phosphoproteomic analysis consisted in extracting and comparing protein ontology data using the QIAGEN's Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®). This analysis was performed through two independent approaches: one focused on phosphorylation levels per protein and another focused on phosphorylation sites. The latter approach led to the identification of the precise biological function of dysregulated phosphorylation sites and allowed us to study sequence logos surrounding these sites. In any case, data were considered statistically significant when the absolute fold-change value was ≥ 1.5 and p-value was < 0.05.

Phosphoproteomic global features:

The phosphoproteomes of both control and TiO_2-NP exposed cells were quantitatively compared upon the three criteria defined here above (Table 1). Roughly, 10,000 MS/MS spectra in each group were assigned to human peptides (Table S1). Among them, 88-90% were detected phosphorylated: mainly

once (66-70%), but sometimes twice (18-24%) and seldom three times (0.20%). About 1,300 different peptides (in terms of sequence and/or post-translational modifications) were listed in each group. The average number of phosphorylations per peptide remains similar among all samples, as well as the mean number of MS/MS spectra assigned to the same peptide. The merged datasets correspond to 1,136 unique peptide sequences, including 91% phosphopeptides. A total of 1,606 unique phosphorylation sites were listed (Table S2). In terms of proteins, 713 were determined to be phosphorylated (91%) and 70 were detected un-phosphorylated (Table S3). The two most abundant of the 783 detected proteins in terms of normalized spectral abundance factor (NSAF, i.e. total spectral count of a given protein divided by its molecular weight) are PDCD5 and RPLP1 in both control and TiO_2-NP exposed samples. Most phosphorylated proteins (510 out of 713, i.e. 72%) were detected in both datasets, while 96 and 107 phosphoproteins were only detected in TiO_2-NP exposed samples and control samples, respectively.

Table 1. Quantitative description of the phosphoproteomes of control (Ctrl) and TiO_2-NP exposed cells (TiO_2).[a]

	Ctrl	TiO_2	Ctrl & TiO_2
Number of biological replicates	3	3	6
Number of nanoLC-MS/MS runs	6	6	12
Number of MS/MS spectra	33878	34566	68444
Number of MS/MS spectra assigned to human peptides	10,472	11,754	22,226
Total % of phosphopeptides	90	88	89
% of monophosphorylated peptides	66	70	68
% of biphosphorylated peptides	24	18	21
% of triphosphorylated peptides	< 1%	< 1%	< 1%
Number of unique human peptides (sequence and/or PTMs)	1,310	1,283	1,644
Total % of phosphopeptides	93	93	93
% of monophosphorylated peptides	64	72	73
% of biphosphorylated peptides	29	20	27
% of triphosphorylated peptides	< 1%	< 1%	< 1%
Number of detected proteins	644	649	783
% of phosphoproteins	96	93	91
Phosphorylation count (criterium 1)	11,977	12,592	24,569
Phosphopeptide count (criterium 2)	9,452	10,398	19,850
Phosphorylated site count (criterium 3)	2,628	2,616	5,244

[a]Corresponding phosphoproteins: proteins detected with at least one phosphorylated peptide. PTMs: post-translational modifications.

Comparative phosphoproteomics:

In order to determine if TiO_2-NP exposure induced a strong alteration of global phosphorylation levels, each of the three above described criteria (normalized with respect to individual protein molecular weights) was summed on the 713 phosphoproteins detected in the different samples (Figure 2). These global results did not show any statistically significant difference between control and exposed sample groups. However when conducted at individual protein levels, differences were observed (Figure 3A). A total of 81 phosphoproteins were dysregulated according to the phosphorylation count (group 1), 84 according to the phosphopeptide count (group 2) and 33 according to the phosphorylated sites count (group 3). Protein groups 1 and 2 are closely related, with group 1 being entirely included in group 2. A total of 89 phosphoproteins exhibited an altered phosphorylation level according to at least one of the three criteria (group 4) and 26 of them according to all three criteria (group 5). Both groups exhibit a specific intersection of 55 proteins (group 6) that are unrelated to group 5 and group 3 likewise encompasses 5 proteins (group 7) which are absent from group 5.

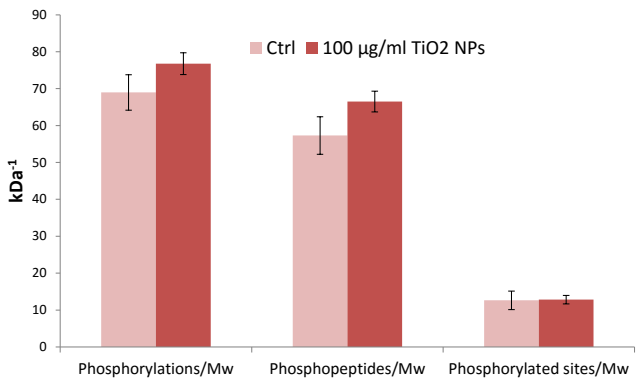
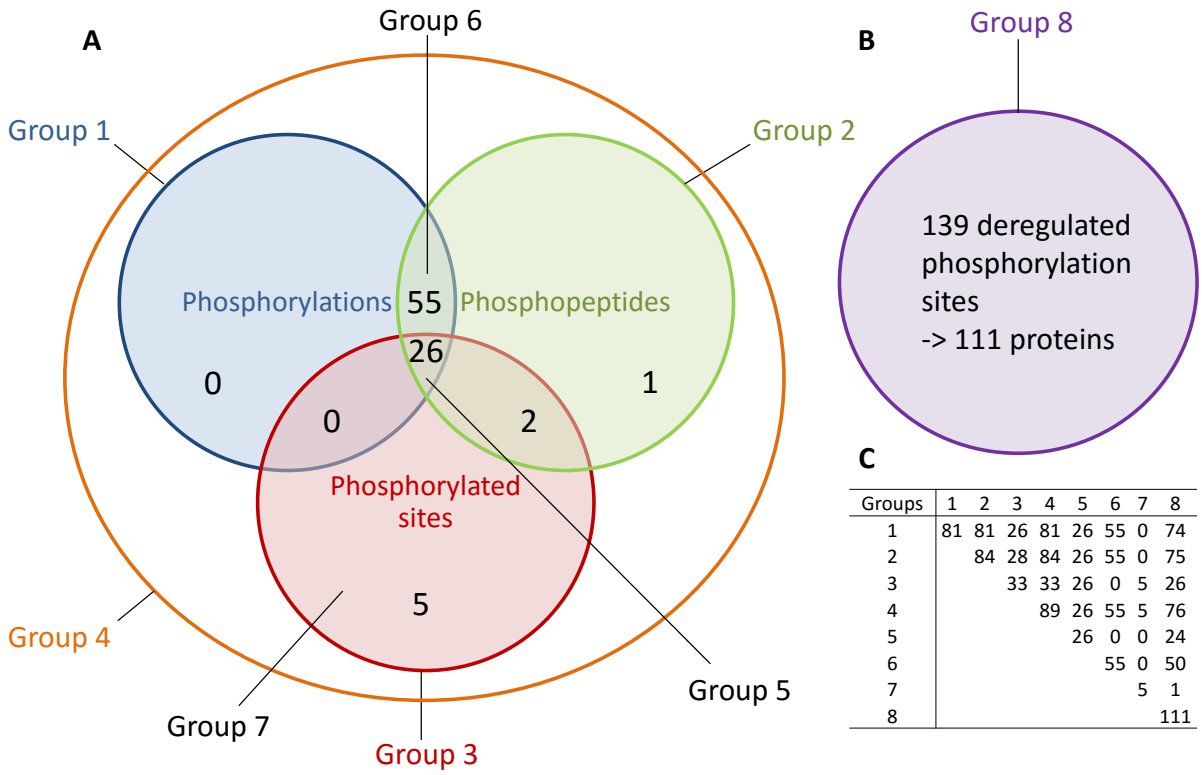


Figure 2. Global phosphorylation levels of phosphoproteins detected in the control (Ctrl) and 100 µg/ml TiO_2-NP exposed datasets. Results are normalized with respect to individual protein molecular weights (Mw).

Within groups 1 to 3, proteins mostly exhibited increased phosphorylation levels: 75% in group 1, 76% in group 2 and 67% in group 3 (Figure S2).

When using the same approach at the individual phosphorylation site scale (Figure 3B), among the 1,606 phosphorylation sites detected across all samples, 139 were found to be significantly dysregulated: 70% were less phosphorylated in the TiO_2 NPs exposed group while the remaining 30% were more phosphorylated, thereby eliciting an opposite trend compared to the whole protein analysis (Figure S2). These 139 dysregulated phosphorylation sites are distributed among 111 proteins (group 8). The intersection of group 8 with groups 1 to 7 comprises: 74, 75, 26, 76, 24, 50 and 1 proteins, respectively (Figure 3C). This underlines a good overlap between both approaches. Still 22 proteins from group 8 (i.e. 20%) are totally absent from other groups.



Groups	1	2	3	4	5	6	7	8
1	81	81	26	81	26	55	0	74
2		84	28	84	26	55	0	75
3			33	33	26	0	5	26
4				89	26	55	5	76
5					26	0	0	24
6						55	0	50
7							5	1
8								111

Figure 3. Distribution of the number of proteins included in the different study groups. Whole-protein analysis groups (1 to 7) (A), phosphorylation sites analysis group 8 (B) and summary of the number of proteins in each group and in intersections between groups (C).

Functional comparative phosphoproteomics:

Protein ontology insights:

Considering that the samples were thoroughly purified and enriched before mass spectrometry detection, the protein ontology enrichment analysis was performed using a reference universe composed of the 783 proteins detected in either control or exposed samples.

Figure 4 shows the result of a first ontology search focused on biofunctions. The mainly enriched categories among the different groups were cellular assembly and organization, cellular function and maintenance, molecular transport, cell cycle, and cell death and survival. The targets implicated in molecular transport are ADAR, CTTN, ENSA, FLVCR1, HTT, IRS1, IRS2, ITGAV, MTDH, NUP214, SEC61B and SQSTM1 (Tables S4). According to IPA® they are more specifically involved in the transport of proteins (ADAR, CTTN, HTT, NUP214 and SEC61B), in and out of the nucleus in particular (ADAR, NUP214 and SEC61B), as well as in the regulation of lactic acid levels (HTT and SQSTM1). The DNA Replication, Recombination, and Repair category was also significantly enriched. All protein groups exhibited similar profiles, except groups 3, 5 and 7; which can be explained by the lower number of total proteins in these groups compared to others. We therefore mainly focused our analyses on groups 4, 5 and 8.

Biofunction categories / Protein group	1	2	3	4	5	6	7	8
Behavior			1		1			
Carbohydrate Metabolism	3	4	4	6	1	2	1	
Cardiovascular System Development and Function			1		1			
Cell Cycle	8	11	3	11	2	7		6
Cell Death and Survival	4	13	5	13	3	6		7
Cell Morphology		3	6	3	5		1	4
Cell Signaling			3		3			
Cell-mediated Immune Response			1					
Cell-To-Cell Signaling and Interaction		2	7	4	2	2	1	
Cellular Assembly and Organization	21	22	6	18	6	12	2	23
Cellular Compromise	2	3	3	3	1		1	2
Cellular Development	4	5	3	5		3	2	5
Cellular Function and Maintenance	18	18	4	19	5	11	1	23
Cellular Growth and Proliferation			2				2	
Cellular Movement		9	4	5	1	2	1	6
Connective Tissue Development and Function	3	3	1	3		2		3
Digestive System Development and Function			1					3
DNA Replication, Recombination, and Repair	4	4	3	4	3	4	1	5
Drug Metabolism			1					
Embryonic Development			4		1		1	2
Energy Production	2	4	1	4	1			2
Hair and Skin Development and Function		3	2	3				5
Hematological System Development and Function		3	1	3		2		2
Hepatic System Development and Function								3
Immune Cell Trafficking		3	1	3		2		2
Inflammatory Response		8	4	8	3	2		5
Lipid Metabolism	4	4	3	4	2		1	4
Molecular Transport	11	12	6	12	6			
Nervous System Development and Function	2	2	2	2	2			
Nucleic Acid Metabolism			3		2			
Organ Development			1				1	3
Organ Morphology			1		1			
Organismal Development			4		2		1	2
Organismal Functions	2	2		2				2
Organismal Survival		4	3					
Post-Translational Modification			3		3			
Protein Degradation	2	2	2	2	2			
Protein Synthesis	2	4	3	4	2		1	2
Protein Trafficking	5	5	3	5	3			2
Renal and Urological System Development and Function			1		1			
Reproductive System Development and Function			2				1	
Respiratory System Development and Function			1		1			
RNA Damage and Repair			1		1			
RNA Post-Transcriptional Modification			1		1			
Skeletal and Muscular System Development and Function			1		1			
Small Molecule Biochemistry	5	5	7	5	4	2	1	4
Tissue Development			3		1		1	4
Tissue Morphology	3	3	3	3	3	2		5
Visual System Development and Function			1		1			
Total number of proteins in each group	81	84	33	89	26	55	5	111

Figure 4. IPA® protein ontology biofunction categories. This figure describes the number of proteins from each group implicated in these categories. The color scale reflects the number of proteins involved, from light to dark red as this number increases.

Ontology searches focusing on canonical pathways and toxicity functions did not reveal any relevant term (Figures S3 and S4). In diseases categories, cancer was the most significant and relevant term (Figure S5). Besides, toxicity activity lists highlighted the term p53 signaling, encompassing PIK3C2A,

FASN and RB1 proteins, as well as mitochondria integrity and activity impairment, comprising HTT, CXADR, IRS1 and KRT8 proteins (Table 2).

Table 2. IPA® protein ontology toxicity activity categories. This table describes the number of proteins from groups 4, 5 and 8 implicated in these categories.[a]

Ingenuity toxicity activity categories / Protein group	Ref	4	5	8
p53 Signaling	7	3		
Biogenesis of Mitochondria	3	2		
FXR/RXR Activation	4		2	
LXR/RXR Activation	5		2	
Negative Acute Phase Response Proteins	1		1	
Anti-Apoptosis	1		1	
Increases Depolarization of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	1		1	
Decreases Respiration of Mitochondria	1		1	
Swelling of Mitochondria	1		1	
Decreases Transmembrane Potential of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	6		2	3
Decreases Permeability Transition of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	2			2
Total number of proteins in each group	783	89	26	111

[a]"Ref" refers to the reference universe.

Regarding the upstream regulator categories, p53, also called TP53, was the regulator bearing the highest number of regulated proteins, i.e. ten: AKAP12, FASN, FUBP1, HTT, IRS1, MTDH, NDRG1, PTPN12, SON and TPX2 (Figure S6). In groups 4, 5 and 8, we additionally identified six kinases and one phosphatase (Table 3).

Table 3. Kinase and phosphatase upstream regulators identified by IPA® in protein groups 4, 5 and 8. This table describes the target proteins and the number of regulated proteins in each of these groups.

Upstream regulator	Molecule Type	Target proteins	4	5	8
Mapk	kinase	IRS1		1	
CDK4	kinase	KIF4A, TPX2, PDCD4	2		3
CDKN1A	kinase	KRT18, RB1			
ERBB2	kinase	FASN, NRBP1		2	
FGFR2	kinase	SPP1			
PIM1	kinase	EPHA2		1	
PTPase	phosphatase	IRS1		1	

Finally several protein networks corresponding to these enriched categories were identified. Figure 5 depicts the two most relevant networks as judged by the number of detected proteins involved and the illustrated biological functions. Figure 5A shows a network containing 35 proteins including 25 from group 4 (which originates from the whole-protein directed analysis). Figure 5B exhibits a network comprising 34 proteins including 11 from group 8 (thus originating from the phosphorylation site directed analysis) as well as one microRNA. The first one primarily illustrates the impact on cellular development, movement and morphology, while the second is focused on cellular assembly and organization, DNA replication, recombination and repair, as well as cancer pathways. Figure 5B additionally highlights the central role of p53 as an upstream transcriptional regulator of several proteins from group 8 (including 3 proteins for which this interaction is direct: SKIV2L, TPX2, SON). Moreover, Figure 5A suggests an interaction of dataset proteins with NFκB, ERK1/2, p38 MAPK, caspases and 26S proteasome complexes. Finally these networks illustrate that detected proteins are mainly cytoplasmic (64% in Figure 5A and 27% in Figure 5B) or nuclear (16% in Figure 5A and 72% in Figure 5B).

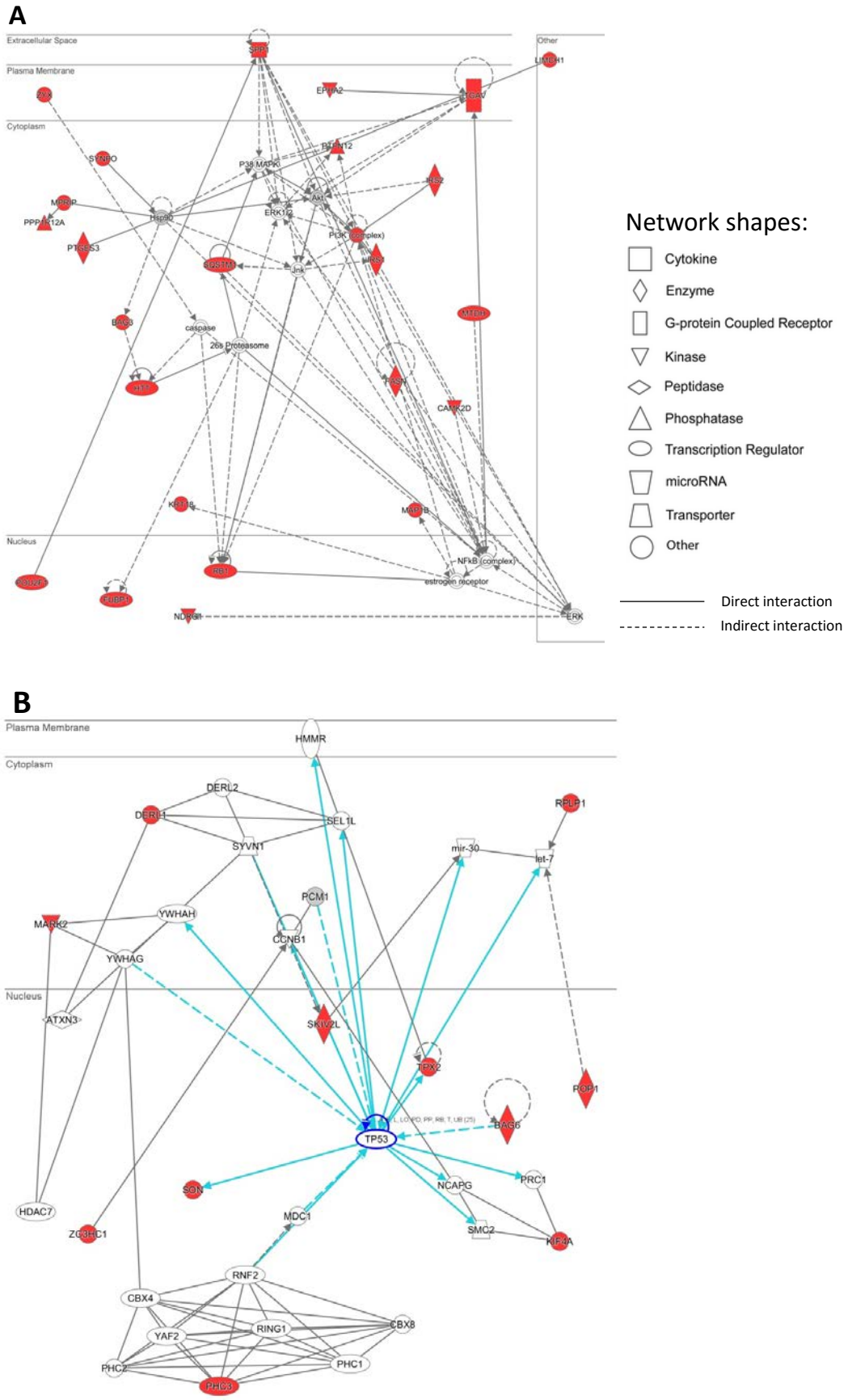


Figure 5. IPA® protein networks. This figure depicts the IPA® protein networks #1 from group 4 (illustrating cellular development, movement, morphology) (A) and #6 from group 8 (focused on cellular assembly and organization, DNA

replication, recombination, and repair and cancer pathways) (B). Proteins in red are included in the study groups and non-colored proteins are not.

Biological activity of dysregulated phosphorylation sites:

A literature survey was carried out for each of the 139 dysregulated phosphorylation sites (P-sites) in order to get more insights into impacted biological activities (Table 4). Among these sites, 14 exhibit known biological functions. The corresponding phosphorylation site kinases were listed, but known phosphatases were seldom reported, except for CTTN[421] and CARHSP[141] which are respectively dephosphorylated by PTP1B and PP2A[25, 26]. Once again the two main functions identified here are cell cycle regulation and cytoskeleton organization. The related proteins and P-sites are RB1[826], ENSA[67], FLNA[1084], MISP[397], ERF[526], KIF4A[801] and AKAP1[151] for cell cycle regulation[27-33], and CTTN[421], HSPB[115], AKAP1[151], FLNA[1084] and VIM[56] for cytoskeleton organization[25, 28, 32, 34-38]. Both functions are sometimes intricated, as exemplified by FLNA[1084] and AKAP1[151]. Additionally other functions such as oxidative stress response (HSPB[115] and CARHSP1[41])[26, 34, 37, 39, 40] and inflammatory processes (VIM[56] and NDRG1[330])[36, 41] were also identified. Besides KIF4A[801] is implicated in KIF4A kinesin motor activity[30] and VIM is involved in the transport of lysosomal vesicles[36], thus highlighting an impact on molecular transport processes. Finally one P-site was also reported to be involved in the synthesis of lipid compounds such as prostaglandin (PTGES3[113])[42].

Table 4. Dysregulated phosphorylation sites with a known biological function.[a]

P-site	FC	Protein activities	Site-specific phosphorylation role	Kinase	References
KIF4A[801]	3	Kinesin motor protein involved in mitosis	Inhibition of PRC1-microtubule overlaps at the central spindle during mitosis	AURORA-B	30
ERF[526]	2,25	Transcriptional repressor with tumor suppressor activity, effector of the receptor tyrosine kinase/RAS/ERK pathway	Promotes RB-mediated G1 cell cycle arrest, regulates ERF cellular localization and decreases its transcriptional repressor activity	ERK	27
MISP[397]	2	Actin-binding protein involved in mitosis	Stabilization of microtubule attachments required for mitotic spindle positioning	PLK1	33
NDRG1[330]	1,7	Stress-inducible protein involved in cell cycle regulation, cell differentiation, apoptosis, hypoxia or metal ion sensing and cell growth	Suppressive action on both NFκB pathway and IκBα-mediated inflammatory and tumor suppressor CXC chemokine expression	SGK1	41
VIM[56]	1,6	Cytoskeletal protein involved in secretion and lysosomal vesicle transport	Promotes granule secretion by neutrophils in response to infection or inflammation	CDK5	36
FLNA[1084]	1,6	Actin-crosslinking protein involved in cell migration, adhesion, signal transduction and plasma membrane	Promotes daughter cell separation and migration at the end of mitosis	CDK1	32
ENSA[67]	1,5	Regulates PP2A phosphatase activity	PP2A phosphatase inhibition required for mitosis	CDK1-activated GWL	29
RB1[826]	1,5	Regulator of cell cycle progression	Promotes G1->S transition by suppressing RB1 inhibition of E2F transcription factors	CDK2-CyclinE/A	31
CARHSP1[41]	-1,6	RNA and single/double-strand DNA binding protein, TNFα mRNA stability enhancer	Inhibition of both single-strand DNA binding and CRHSP1 localization at stress granules following oxidative stress	DYRK isoform or other proline-directed	26, 39, 40
PIK3C2A[259]	-2	Kinase involved in endocytosis, cell survival and response to insulin	PIK3C2A conformation, cellular localization and degradation according to cell cycle phase	CDC2 or UV irradiation + JNK/SAPK	79-81
AKAP1[151]	-2	Scaffold protein for multiple kinases and phosphatases involved in regulation of nuclear envelope integrity	Separation from PP1, leading to lamin dephosphorylation arrest at G1->S transition	PKC	28
PTGES3[113]	-2,1	Cytosolic prostaglandin PGE2 synthase	HSP90-facilitated activation of PTEGS3 enzymatic activity	CK-II	42
HSPB1[15]	-2,3	Molecular chaperone involved in (oxidative) stress resistance and actin organization	Deoligomerization of Hsp complexes leading to decreased Hsp activity	MAPKAP2	34, 37
CTTN[421]	-2,3	Actin interacting protein involved in cell adhesion, migration, endocytosis and tumor invasion	CTTN conformational change promoting cleavage by proteases, possibly decreasing actin binding and cross-linking activity, activating cell motility and S1P-mediated pulmonary endothelial cell barrier	SRC in response to EGFR activation	25, 35, 38

[a]"FC" relates to the fold-change of phosphorylation induction in TiO_2-NP exposed cells.

Sequence logo analysis:

Amino acid information was extracted for each of the 1,606 phosphorylation sites, as well as for the corresponding N-terminal preceding residue (P-1) and 1,603 of the C-terminal following residue (P+1). The three P+1 for which this information could not be obtained correspond to P-sites located at the last C-terminal position. Total P-sites are mainly located on serine (S) residues (83%), rather than threonines (T – 16%) or tyrosines (Y – 1%) (Figure 6-A). Amino acid distribution at P-1, P, and P+1 positions is globally similar in the 1,603 total, 139 dysregulated and 1,464 unaffected P-sites (Figures

6-A, B, C). However differential analysis between dysregulated versus total P-sites reveals an increase in proline (P) residues at P-1 (+6%) and P+1 (+9%) positions and a decrease in serine (S) residues at P+1 position (-5%) among dysregulated sites (Figure 6-D).

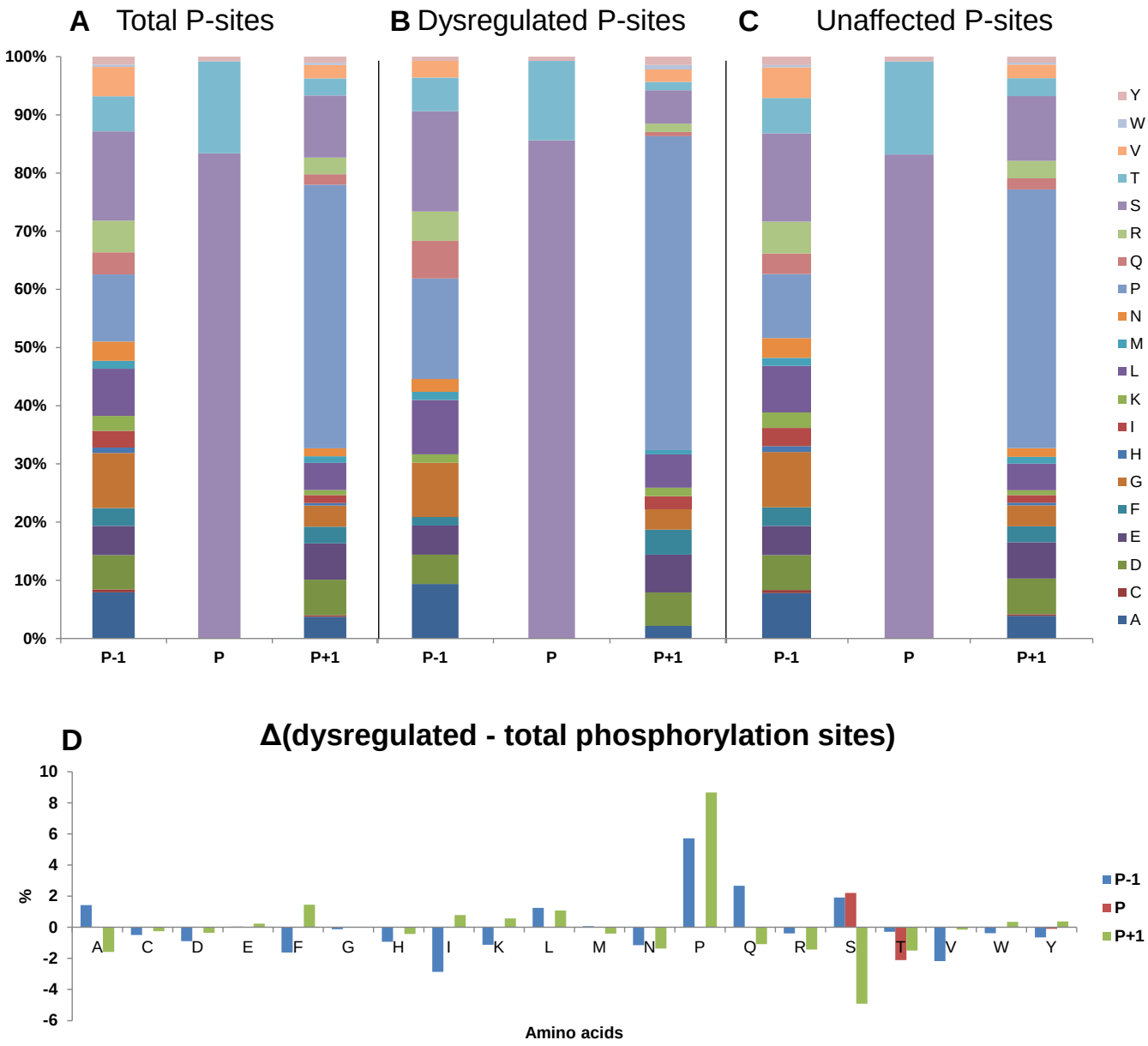


Figure 6. Amino acid distribution around phosphorylation sites (P), from the N-term preceding residue (P-1) to the C-term following residue (P+1), in the total 1,603 P-sites (A), 139 dysregulated P-sites (B) and 1,464 unaffected P-sites (C) and distribution difference between dysregulated and total P-sites (D).

Functional validation of the cell cycle impact of TiO_2 NPs:

We evidenced by comparative phosphoproteomics that phosphorylation-dysregulated proteins and P-sites mainly revealed a probable impact of TiO_2 NPs on cell cycle and cytoskeleton integrity. We therefore verified the cell cycle pattern of exposed cells (Figure 7). The majority of cells in both control and TiO_2-NP exposed groups are in the G1 phase (80-90%). S and G2-M phases both represent 5-10% of total cells. TiO_2-NP exposure induces statistically

significant decrease in the proportion of cells in the G1 phase. This result is in agreement with results inferred from the phosphoproteomic experiment.

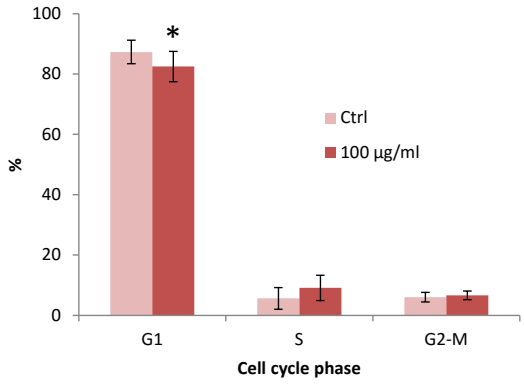


Figure 7. Cell cycle analysis. Cell cycle phase distribution of A549 cells unexposed (Ctrl) or exposed to 100 µg/ml TiO_2 NPs for 24 h. Statistical significance, vs. Ctrl (*): $p < 0.05$.

Discussion:

This article describes the impact of TiO_2 NPs on the cellular phosphoproteome of A549 human alveolar pulmonary cells. The rational for choosing this cell line is that the alveolar area is the most relevant and vulnerable compartment of the respiratory tract in terms of inhaled NP deposition and accumulation[43, 44]. Exposure dose was 100 µg/ml (i.e. 17 µg/cm² = 0.11 ng/cell) TiO_2 NPs during 24 h. These conditions were chosen because they are classical in *in vitro* nanotoxicity studies and induce many of the toxicological effects reported for these NPs. We consider this dose to be a worst-case scenario, roughly corresponding to the alveolar deposition theoretically obtained after a full working lifetime exposure to 1 mg/m^3 of TiO_2 NPs[45]. These exposure conditions lead to moderate cell mortality rates, as inferred from our previous studies[4, 18].

First, we show that global protein phosphorylation level is unaffected by TiO_2-NP exposure. Considering the strong affinity between TiO_2 and phosphate groups[19], one could have expected TiO_2-NP cellular exposure to induce a sharp physico-chemical effect reflected on global protein phosphorylation levels. The present study demonstrates that this is not the case and that the impact of TiO_2 NPs on the cellular phosphoproteome is much more finely tuned.

Second, we analyzed the results according to two observation angles, i.e. individual protein phosphorylation level and individual phosphorylation sites (P-sites). The protein overlap between both approaches is high (80%) but incomplete, thus underlining the complementarity of both views. Moreover the phosphorylation trend is opposite in both related protein groups, with the first group exhibiting a global increase of phosphorylation levels whereas the second group elicited a global decrease. The opposite phosphorylation trends revealed by these two complementary observation angles suggest that the increase of protein phosphorylation levels must be largely attributed to the differential phosphorylation of a wide range of P-sites, rather than to the strong deregulation of a few P-sites. We show here that exposure to TiO_2 NPs impacts cell cycle progression, cytoskeleton organization, cellular function and maintenance, cell death and survival, molecular transport and inflammatory processes. Although all these functions have already been described as being impacted by TiO_2 NPs, the mechanisms leading to these alterations remain poorly understood. Our results suggest that modulation of the

phosphorylation status of cellular proteins could be a causative factor of the phenotypic modifications reported by other studies. Indeed TiO_2-NP exposure induces a dysregulation of cell cycle progression[11-16]. It usually consists in accumulation of cells in S or G2-M phases, which correlates well with our present observation. It is also associated to impairment of mitotic progression, reflected by the formation of multipolar mitotic spindles and abnormal chromosome segregation during anaphase and telophase, as well as to an impact on the function of the PLK1 kinase[17]. All these effects can be explained by the presently observed dysregulation of several P-sites (KIF4A801, FLNA1084, ENSA67 and especially MISP397, which is phosphorylated by PLK1) involved in the regulation of mitosis and mitotic cytoskeleton structure[29, 30, 32, 33]. Besides our functional phosphoproteomic analysis reveals a probable impact on cytoskeleton integrity, which is consistent with the recent literature[13, 21, 46-53]. Indeed TiO_2 NPs impair the expression of cytoskeleton-related genes[13, 51] and disorganize actin and microtubule networks[46, 49, 50, 52]. An acellular study also shows that they inhibit tubulin polymerization and induce tubulin conformational changes[47]. TiO_2 NPs impact mitochondrial integrity and activity and this is related to the induction of oxidative stress, apoptosis and autophagy[2]. Again our results indicate that the phosphorylation status of proteins involved in these functions is impacted, suggesting that phosphorylation/dephosphorylation may drive these effects. The influence of TiO_2 NPs on these three endpoints is also illustrated in our study through the enrichment of several ontology terms (cell function and maintenance, as well as cell death and survival, including DNA repair and p53 pathways, etc.), the dysregulation of two P-sites involved in oxidative stress response (HSPB115 and CARHSP141[26, 34, 37, 39, 40]) and the possible interaction of dysregulated proteins with apoptosis mediating caspases. Oxidative stress is one of the most extensively reported mechanism of toxicity elicited by TiO_2 NPs and is thought to mediate other reported toxic effects such as cell mortality, through apoptosis in particular, or genotoxicity[1, 2, 5, 8, 9]. TiO_2-NP induced apoptosis is frequently associated to an activation of caspases[2]. Besides induction of DNA damage and/or apoptosis was linked in several independent reports to an activation of the p53 pathway[54-59]. Our study is confirming this link at the phosphoproteome level. Inflammation also belongs to the top most toxicity mechanisms reported for TiO_2 NPs[1, 2, 5, 7, 8, 60] and TiO_2 NPs were shown for instance to activate NFκB, ERK1/2 and p38 MAPK complexes in several biological models[1]. We also confirm this link through our phosphoproteomic approach, particularly in the protein network analysis. Since the activation of these factors relies on their phosphorylation/dephosphorylation, we highlight here a causative factor of TiO_2-NP induced inflammation.

Finally we underline here an impact of TiO_2 NPs on molecular transport. In the literature recent studies report a TiO_2-NP induced up- or down-regulation of genes or proteins involved in ion transport[51, 53, 61], as well as trans-membrane transport[62-64] and intracellular molecular transport in general[20, 65]. For instance up-regulation of ITGAV gene expression was observed in BEAS-2B cells[65]. Our results thus correlate well with the literature. The present study also suggests a possible interaction of dysregulated proteins with 26S proteasome. Only one study so far addressed the impact of TiO_2 NPs on this cellular target. It reports an activation of proteasome activity in an acellular context[66].

Scrutiny of sequence logos surrounding dysregulated P-sites additionally pointed out an increased occurrence of prolines at P-1 and P+1 positions, as well as a decreased presence of serines at P+1 positions. The sequence logo analysis showed that the amino acid distribution

at P-sites (83% S, 16% T and 1% Y) was consistent with usual distributions in humans (79% S, 17% T and 4% Y)[67]. However the observed increase in proline residues at P+1 positions among dysregulated P-sites (versus total P-sites) suggests that TiO_2 NPs exert a stronger impact on proline-directed kinases and phosphatases than on other kinases and phosphatases, which mostly disfavor substrates exhibiting a proline at P+1 position. This preferential impact could be linked with a direct interaction between proline-directed kinases and phosphatases and TiO_2 NPs, which could mimic the substrates of these proteins. Alternatively, the interaction could also be more indirect. Indeed it was shown that protein flexibility is a critical determinant in the adsorption to SiO_2 NPs[68]. Assuming that SiO_2 and TiO_2 surfaces behave similarly in this regard, it could thus be that TiO_2 NPs incorporate many proline-rich proteins in their protein corona, which could interact with proline-directed kinases and phosphatases. However this speculative hypothesis would need experimental verification.

The datasets obtained from both control and TiO_2-NP exposed samples contained about 90% of phosphopeptides, which is equivalent to the global yield previously observed for phosphopeptide enrichment from other cellular systems[24]. The listed phosphopeptides correspond to the signature of 713 phosphoproteins (617 in control cells alone) and 70 proteins for which no phosphorylated peptide was detected, as well as 1,606 unique phosphorylation sites. These figures are almost four to five times higher than the number of phosphoproteins and phosphorylation sites (181 and 337 respectively) previously detected in A549 cells using a relatively similar shotgun phosphoproteomics approach with a TiO_2 resin based phosphopeptide enrichment and the same tandem mass spectrometer and acquisition time[69]. This large quantitative gap may stem from slight experimental differences such as the use of different culture media (DMEM versus RPMI) or more important changes in terms of mass spectrometry efforts devoted only to phosphopeptide enriched fractions. Besides it was shown that TiO_2 and IMAC based phosphopeptide enrichment methods cover different types of phosphopeptides with only partial overlap[19]. In 2009 public depositories of phosphoproteomics data already depicted approximately 25,000 phosphorylation sites on about 7,000 human proteins[70]. These figures are much higher than the number of P-sites and phosphoproteins detected here. However this is logical considering that these databases aggregate the datasets of numerous biological models, which each only express a fraction of the total phosphoproteome at a time[71]. Besides every phosphoproteomic analysis is estimated to be associated to a false-discovery rate of about 1% of phosphorylation sites, thus explaining the constant rise in reported novel P-sites.

Experimental:

Chemicals and nanoparticles:

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise indicated and were >99% pure. TiO_2 NPs (Aeroxide® P25) were obtained from Evonik®. Their physico-chemical properties are: spherical shape, 86% anatase crystalline phase, diameter of 24 nm, 46 m^2/g of specific surface area and pH of zero charge of 7.0, as previously determined[18]. NP dispersion was carried out at 10 mg/ml in ultrapure sterile water by 30 min of sonication at 4°C, in pulsed mode 1 s on / 1 s off, using an Autotune 750 W sonicator from Bioblock Scientific operated at 30% of amplitude, as previously described[4]. According to the calorimetric procedure, this corresponds to 19.82 W[72, 73]. Suspensions were diluted in exposure medium immediately before cell exposure. Hydrodynamic diameter measurements were performed,

before and after dilution in the exposure medium, by dynamic light scattering on a ZetaSizer nano ZS (Malvern). Following dispersion in water, the hydrodynamic diameter was 70 ± 20 nm with a 0.18 ± 0.04 polydispersity index (PDI) and shifted to 720 ± 20 nm (0.50 ± 0.02 PDI) after dilution in the exposure medium.

Cell culture and exposure conditions:

Human epithelial lung A549 alveolar carcinoma cells (CCL-185) were purchased from ATCC. They were cultured in DMEM as previously described[18]. They were seeded 3 days prior to NPs exposure, and were exposed to NPs in fetal bovine serum-free cell culture medium. We used three independent biological replicates per condition. When in contact with TiO_2 NPs, cell handling was carried out without artificial light and as little day light as possible in order to avoid possible photoactivation of TiO_2-NPs. After NP exposure, cell layers were rinsed three times in PBS and harvested with trypsin-EDTA 0.25%.

Phosphoproteome sample preparation and trypsin proteolysis:

For phosphoproteomics, 1.2 10^7 cells per replicate were harvested, immediately flash frozen and kept at -80°C until used. Frozen cell pellets were melted on ice for 10 min directly in contact with the denaturing lysis buffer consisting in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, containing 8 M urea, 75 mM NaCl and 2X phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, 88667). The samples were then subjected to three cycles of sonication (20 s with 0.4 s on / 0.4 s off pulses of 40% amplitude) separated by 1 min breaks using a probe sonicator – Hielsher UP50H. Lysates were centrifuged at 16,000 rcf for 10 min at 4°C and the resulting supernatants were collected and stored at -80°C. Total protein concentration was assessed using Bradford reagent (CooAssay Standard Protein Assay kit, UP36858, Interchim) by spectrophotometric reading at 595 nm. Samples were supplemented by 5 mM (final concentration) dithiothreitol and incubated for 15 min at 56°C with continuous stirring. Reduced cysteines were then alkylated by addition of 5 mM (final concentration) iodoacetamide for 15 min at room temperature with continuous stirring. Samples were then diluted with 100 mM Tris/HCl, pH 8.5 in order to reduce urea concentration to 1 M. Trypsin (Roche 11 047 841 001) at 1 mg/ml in 0.01% trifluoroacetic acid aqueous solution was added at the equivalent final concentration of 2% of total protein mass per sample. Digestion was performed overnight at 37°C. Afterwards, trypsin was inactivated by addition of 0.6% (vol/vol) final concentration trifluoroacetic acid aqueous solution. Samples were centrifuged for 1 min at 1,000 rcf and 20°C. The resulting supernatants were stored at -80°C. Proteolysis extent was verified by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

Phosphopeptide enrichment by strong cation exchange and immobilized metal affinity chromatographies:

Proteolyzed samples were desalted using Harvard Macro Spin C18 Columns, 74-4101. Resin was first activated by three rinsing cycles with 500 µl of activation solution (80% acetonitrile, 20% water). Columns were equilibrated by three extra rinsing cycles with 500 µl wash solution (0.5% trifluoroacetic acid in water). Peptides were then loaded onto the columns (250 µg of peptides per column) and were centrifuged for 30 s at 2,000 rcf, 20°C. The resulting filtrates were collected and reloaded onto the columns. Resin was then washed three times with 500 µl of wash solution. Finally, peptides were eluted in 100 µl of 1:1 acetonitrile/water, 0.1% TFA. Desalted peptides were then freeze-dried and stored at -80°C until subjected to chromatography. Peptides were resolved by strong cation exchange chromatography (SCX) according to a previously described protocol[24]. One mg of desalted peptides was dissolved in 65 µl of buffer consisting in 7 mM KH_2PO_4, pH 2.65 and 30% acetonitrile (vol/vol), i.e.

buffer A. A 60 µl volume was injected onto a polySULFOETHYL ATM column (PolyLC) with a 3.2-mm inner diameter x 200 mm length, 5-µm particle size, 200 Å pore size, operated at a flow rate of 400 µl/min with an Agilent 1100 Series reverse-phase HPLC system equipped with G1315B diode array detector, G1322A degasser and G1311A quaternary pump, G1329A autosampler, and sample cooler unit[74]. Both injection and collection chambers were maintained at 5°C. Separation was carried out using a gradient of buffer A, buffer B (7 mM KH_2PO_4, 350 mM KCl, pH 2.65, 30% acetonitrile (vol/vol)), buffer C (50 mM K_2HPO_4, 500 mM NaCl, pH 7.5) and ultrapure water. The gradient consisted in 100% buffer A from elution start to minute 34, 75% buffer A and 25% buffer B during minute 35, 100% buffer B from minute 36 to 41, 100% ultrapure water from minute 42 to 48, 100% buffer C from minute 49 to 60, 100% ultrapure water from minute 61 to 67 and again 100% buffer A from minute 68 to elution end (minute 120). The two 4-min fractions containing most phosphopeptides[24] were eluted between 8 to 16 min (100% of buffer A). These two separate fractions were freeze-dried to reduce their volume to 150 µl. A 350 µl volume of 0.1% TFA was added to each sample, which was desalted as described above. Phosphopeptides were then further enriched by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using PhosSelect Iron Affinity Gel resin (Sigma, P9740) and Harvard Micro Spin C18 Columns (74-4601) for peptide desalting. Phosphopeptide binding on the PhosSelect resin was carried out as previously reported[24]. The phosphopeptide coated resin was then transferred on top of the activated and equilibrated Harvard Micro Spin C18 columns. Peptides were then desalted as described above with 200 µl rinsing steps instead of 500 µl. The resulting two-layered resin was rinsed twice with 100 µl of IMAC binding buffer (40% acetonitrile, 60% 25 mM formic acid in water) and then once with 200 µl of C18 wash solution. Phosphopeptides were eluted from the PhosSelect resin and at the same time retained on the underlying C18 resin by three rinsing steps with 100 µl of IMAC elution buffer (500 mM K_2HPO_4, pH 7). After four rinsing cycles with 200 µl C18 wash solution, phosphopeptides were eluted from the C18 resin with 2x50 µl of C18 elution solution. Samples were then freeze-dried and stored at -80°C until analyzed by tandem mass spectrometry.

Tandem mass spectrometry:

Enriched phosphopeptides were dissolved in 30 µl of 0.1% TFA and 10 µl of each sample were injected onto the nanoLC-MS/MS system. NanoLC-MS/MS analyses were performed using a LTQ Orbitrap XL hybrid mass spectrometer (ThermoFisher) coupled to an Ultimate 3000 LC system (Dionex) in similar conditions as those previously described (Dedieu et al., 2011). Full-scan mass spectra were measured from m/z 300 to 1,800 with the LTQ Orbitrap XL mass spectrometer in data-dependent mode using a TOP3 strategy consisting in a scan cycle initiated with a full scan of high mass accuracy in the Orbitrap (30,000 resolution; internal calibration), followed in parallel by MS/MS normal mode scans in the linear ion trap on the three most abundant precursor ions. The parameters were set as follows: minimum signal required at 15,000; possible charge states: 2+ and 3+; dynamic exclusion of previously-selected ions with 60 sec exclusion duration. The previously described Multi Stage Activation mode (pseudo-MS3)[75] was activated with a neutral lost mass list including 32.6590 (phosphate, triple positive charges) and 48.9890 (phosphate, double positive charges). The lock mass option on the LTQ Orbitrap XL mass spectrometer was enabled in MS mode and the polydimethylcyclosiloxane ions generated in the electrospray process from ambient air (protonated $[(CH_3)_2SiO)]_6$ with m/z at 445.12002) were used for internal recalibration in real time.

MS/MS spectra interpretation, statistics, and data mining:

Peak lists were generated with the MASCOT DAEMON software (version 2.3.2) from Matrix Science using the extract_msn.exe data import filter from the Xcalibur FT package (version

2.0.7) proposed by ThermoFisher. Data import filter options were set at: 400 (minimum mass), 5,000 (maximum mass), 0 (grouping tolerance), 0 (intermediate scans), 10 (minimum peaks), 2 (extract MSn) and 1,000 (threshold) as described previously[76]. For peptide assignments, MS/MS spectra were searched against the SwissProt database with the MASCOT 2.3.02 software (Matrix Science). Search parameters were: SwissProt_2012_02 (534,695 sequences totaling 189,667,883 residues) using only the Mammalia (mammals) taxonomy (65,476 sequences); maximum number of miss-cleavages of 2; mass tolerances of 5 ppm for the parent ion and 0.5 Da for MS/MS; fixed modification for carbamidomethylated Cys; and variable modification for oxidized Met and phosphorylated Ser, Thr and Tyr residues. MASCOT results were parsed using the IRMa 1.30.4 software[77] filtering peptides with a p-value below 0.01 and rank set at 1. Fold-changes were calculated as the ratio between the values obtained in TiO_2-exposed samples and unexposed samples based on spectral counts after standard normalization. Normalization and statistical significance were assessed using the PatternLab software[78]. Results were considered statistically significant when the p-value was below 0.05 and the absolute value of the fold-change was equal to or above 1.5. Gene ontology and pathway analyses were performed using QIAGEN's Ingenuity® Pathway Analysis (IPA® - 23814503, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity), with a confidence level set at "experimentally observed" and considering human proteins only. Statistics on protein ontology enrichments were performed through IPA® with right-tailed Fisher exact tests. Enrichments were considered statistically significant when the p-value was below 0.05.

Cell cycle analysis:

A total of 10^6 cells per sample were harvested and rinsed in 1 ml of PBS-EDTA (2 mM) buffer, then re-suspended in 0.5 ml of ice-cold 70% ethanol and left at room temperature for 30 min before storage at -20°C. Prior to analysis, cell suspensions were diluted with 1 ml of PBS-EDTA (2 mM) buffer, re-suspended in analysis buffer composed of 25 µg/ml RNase A and 25 µg/ml propidium iodide in PBS-EDTA (2 mM) and left in the dark at room temperature for 45 min. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) analyses were performed using a FACS Calibur (Becton Dickinson) flow cytometer and data were analyzed with Flowing Software 2.5.1. Statistical significance was assessed with Mann-Whitney u-tests using the Statistica 8.0 software (Statsoft). Results were considered statistically significant when p-value was below 0.05.

Conclusions:

This article reports that 24 h A549 cell exposure to 100 µg/ml TiO_2 NPs induces phosphoproteome changes in a finely tuned way that is only reflected at individual protein or phosphorylation site levels but cannot be perceived if the proteome is analyzed at a global scale only. The main impacted biological functions and processes are cell cycle progression (whose impairment was experimentally verified) and cytoskeleton integrity. Moreover, p53 pathway activation, DNA repair and other cell death and survival processes, as well as inflammation, oxidative stress response and molecular transport are also affected as seen through phosphoproteomics.

This study confirms the main toxicity mechanisms reported in the literature for TiO_2 NPs and brings novel insights into upstream pathways, suggesting that they may be linked with cellular phosphoproteome scrambling. Besides it describes an original comparative phosphoproteomic method based on the analysis of phosphorylation levels at both whole protein and phosphorylation site scales. The whole protein analysis was carried out using three different phosphorylation level

indicators that proved complementary. They could be systematically assessed in future phosphoproteomic investigations. This study thus shows how the phosphoproteome could be an interesting parameter to characterize the toxicological impact of NPs.

Acknowledgements:

This work was funded by CEA through the Toxicology research transverse program, and via the European Commission's 7th Framework Programme project NanoMILE (Contract No. NMP4-LA-2013-310451). It is a contribution to the Labex Serenade (n° ANR-11-LABX-0064) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program of the French National Research Agency (ANR) through the A*MIDEX project (n° ANR-11-IDEX-0001-02).

The authors would like to personally thank Jean Labarre and Jean-Christophe Aude for their insightful comments on the analysis strategy and data interpretation.

References:

1. H. Shi, R. Magaye, V. Castranova and J. Zhao, Particle and fibre toxicology, 2013, 10.
2. S. Boland, S. Hussain and A. Baeza-Squiban, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2014, 6, 641.
3. A. Bruinink, J. Wang and P. Wick, Archives of Toxicology, 2015.
4. A. Simon-Deckers, B. Gouget, M. Mayne-L'Hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud and M. Carriere, Toxicology, 2008, 253, 137.
5. H. Johnston, G. Hutchison, F. Christensen, S. Peters, S. Hankin and V. Stone, Particle and Fibre Toxicology C7 - 33, 2009, 6, 1.
6. A. Kermanizadeh, C. Chauché, D. M. Brown, S. Loft and P. MÃ¸ller, Environmental and Molecular Mutagenesis, 2014, n/a.
7. R. Landsiedel, U. G. Sauer, L. Ma-Hock, J. r. Schnekenburger and M. Wiemann, Nanomedicine (London, England), 2014, 9, 2557.
8. M. Skocaj, M. Filipic, J. Petkovic and S. Novak, Radiology and Oncology, 2011, 45, 227.
9. T. Chen, J. Yan and Y. Li, Journal of Food and Drug Analysis, 2014.
10. Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone and M. Dusinska, Nanotoxicology, 2014, 8, 233.
11. K. Kansara, P. Patel, D. Shah, R. K. Shukla, S. Singh, A. Kumar and A. Dhawan, Environmental and Molecular Mutagenesis, 2014, n/a.
12. Y. S. Lee, S. Yoon, H. J. Yoon, K. Lee, H. K. Yoon, J. H. Lee and C. W. Song, Toxicology Letters, 2009, 189, 191.
13. B. Li, Y. Ze, Q. Sun, T. Zhang, X. Sang, Y. Cui, X. Wang, S. Gui, D. Tan, M. Zhu, X. Zhao, L. Sheng, L. Wang, F. Hong and M. Tang, PLoS ONE, 2013, 8.
14. E. I. Medina-Reyes, L. Bucio-Lopez, V. n. Freyre-Fonseca, Y. Sanchez-Pérez, C. M. Garcia-Cuéllar, R. Morales-Barcenas, J. Pedraza-Chaverri and Y. I. Chirino, Environmental Science and Pollution Research, 2014.
15. B. Moe, S. Gabos and X.-F. Li, Analytica Chimica Acta, 2013, 789, 83.

16. R. Y. Prasad, K. Wallace, K. M. Daniel, A. H. Tennant, R. M. Zucker, J. Strickland, K. Dreher, A. D. Kligerman, C. F. Blackman and D. M. DeMarini, Acs Nano, 2013.

17. S. Huang, P. J. Chueh, Y.-W. Lin, T.-S. Shih and S.-M. Chuang, Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 241, 182.

18. M.-L. Jugan, S. Barillet, A. Simon-Deckers, N. Herlin-Boime, S. Sauvaigo, T. Douki and M. Carriere, Nanotoxicology, 2012, 6, 501.

19. H. Imamura, M. Wakabayashi and Y. Ishihama, Seminars in Cell & Developmental Biology, 2012, 23, 836.

20. Y. Ge, M. Bruno, K. Wallace, W. Winnik and R. Y. Prasad, PROTEOMICS, 2011, 11, 2406.

21. J. Sund, J. Palomäki, N. Ahonen, K. Savolainen, H. Alenius and A. Puustinen, Journal of Proteomics, 2014, 108, 469.

22. P. Cohen, Nature Cell Biology, 2002, 4, E127.

23. W. Zhu, J. W. Smith and C.-M. Huang, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 2010, 1.

24. J. Villén and S. P. Gygi, Nature Protocols, 2008, 3, 1630.

25. A. G. Ammer and S. A. Weed, Cell Motility and the Cytoskeleton, 2008, 65, 687.

26. H. Hou, F. Wang, W. Zhang, D. Wang, X. Li, M. Bartlam, X. Yao and Z. Rao, The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286, 9623.

27. L. Le Gallic, L. Virgilio, P. Cohen, B. Biteau and G. Mavrothalassitis, Molecular and Cellular Biology, 2004, 24, 1206.

28. T. Küntziger, M. Rogne, R. L. S. Folstad and P. Collas, Biochemistry, 2006, 45, 5868.

29. S. Mochida, The FEBS journal, 2014.

30. R. Nunes Bastos, S. R. Gandhi, R. D. Baron, U. Gruneberg, E. A. Nigg and F. A. Barr, The Journal of Cell Biology, 2013, 202, 605.

31. S. M. Rubin, A.-L. Gall, N. Zheng and N. P. Pavletich, Cell, 2005, 123, 1093.

32. S. G. Y. Szeto, E. C. Williams, A. D. Rudner and J. M. Lee, Experimental Cell Research, 2015, 330, 248.

33. M. Zhu, F. Settele, S. Kotak, L. Sanchez-Pulido, L. Ehret, C. P. Ponting, P. GÃ¶nczy and I. Hoffmann, The Journal of Cell Biology, 2013, 200, 773.

34. B. M. Doshi, L. E. Hightower and J. Lee, Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1197, 76.

35. S. M. Dudek, J. R. Jacobson, E. T. Chiang, K. G. Birukov, P. Wang, X. Zhan and J. G. N. Garcia, The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279, 24692.

36. K.-Y. Lee, L. Liu, Y. Jin, S.-B. Fu and J. L. Rosales, Journal of Cellular Physiology, 2012, 227, 739.

37. T. Rogalla, M. Ehrnsperger, X. Preville, A. Kotlyarov, G. Lutsch, C. Ducasse, C. Paul, M. Wieske, A. P. Arrigo, J. Buchner and M. Gaestel, The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274, 18947.

38. W. Wang, Y. Liu and K. Liao, BMC Cell Biology, 2011, 12.

39. G. C. Auld, D. G. Campbell, N. Morrice and P. Cohen, The Biochemical Journal, 2005, 389, 775.

40. J. R. Pfeiffer, B. L. McAvoy, R. E. Fecteau, K. M. Deleault and S. A. Brooks, Molecular and Cellular Biology, 2011, 31, 277.

41. Y. Murakami, F. Hosoi, H. Izumi, Y. Maruyama, H. Ureshino, K. Watari, K. Kohno, M. Kuwano and M. Ono, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 396, 376.

42. T. Kobayashi, Y. Nakatani, T. Tanioka, M. Tsujimoto, S. Nakajo, K. Nakaya, M. Murakami and I. Kudo, The Biochemical Journal, 2004, 381, 59.

43. M. Geiser and W. Kreyling, Particle and Fibre Toxicology C7 - 2, 2010, 7, 1.

44. H.-R. Paur, F. R. Cassee, J. Teeguarden, H. Fissan, S. Diabate, M. Aufderheide, W. G. Kreyling, O. Hänninen, G. Kasper, M. Riediker, B. Rothen-Rutishauser and O. Schmid, Journal of Aerosol Science, 2011, 42, 668.

45. S. Gangwal, J. S. Brown, A. Wang, K. A. Houck, D. J. Dix, R. J. Kavlock and E. A. C. Hubal, Environmental Health Perspectives, 2011, 119, 1539.

46. M.-C. Bernier, M. Besse, M. Vayssade, S. Morandat and K. El Kirat, Langmuir, 2012, 28, 13660.

47. Z. N. Gheshlaghi, G. H. Riazi, S. Ahmadian, M. Ghafari and R. Mahinpour, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2008, 40, 777.

48. Y. Hou, M. Lai, X. Chen, J. Li, Y. Hu, Z. Luo, X. Ding and K. Cai, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014, 102, 1726.

49. Z. Mao, B. Xu, X. Ji, K. Zhou, X. Zhang, M. Chen, X. Han, Q. Tang, X. Wang and Y. Xia, Nanoscale, 2015, 7, 8466.

50. S. G. Marquez-Ramirez, N. L. Delgado-Buenrostro, Y. I. Chirino, G. G. r. Iglesias and R. Lopez-Marure, Toxicology, 2012, 302, 146.

51. L. Sheng, L. Wang, X. Sang, X. Zhao, J. Hong, S. Cheng, X. Yu, D. Liu, B. Xu, R. Hu, Q. Sun, J. Cheng, Z. Cheng, S. Gui and F. Hong, Journal of Hazardous Materials, 2014, 278, 180.

52. C. Y. Tay, P. Cai, M. I. Setyawati, W. Fang, L. P. Tan, C. H. L. Hong, X. Chen and D. T. Leong, Nano Letters, 2014, 14, 83.

53. S. C. Tilton, N. Karin, A. Tolic, Y. xie, X. Lai, R. F. Hamilton, K. Waters, A. Holian, F. A. Witzmann and G. Orr, Nanotoxicology, 2014, 0, 1.

54. S. J. Kang, B. M. Kim, Y. J. Lee and H. W. Chung, Environmental and molecular mutagenesis, 2008, 49, 399.

55. R. Meena, M. Rani, R. Pal and P. Rajamani, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167, 791.

56. J. Petkovic, B. Zegura, M. Stevanovic, N. Drnovsek, D. Uskokovic, S. Novak and M. Filipic, Nanotoxicology, 2011, 5, 341.

57. Y. L. Shi, F. Wang, J. B. He, S. Yadav and H. Wang, Toxicology Letters, 2010, 196, 21.

58. R. K. Srivastava, Q. Rahman, M. P. Kashyap, A. K. Singh, G. Jain, S. Jahan, M. Lohani, M. Lantow and A. B. Pant, Human & Experimental Toxicology, 2013, 32, 153.

59. J. Wu, J. Sun and Y. Xue, Toxicology Letters, 2010, 199, 269.

60. X. Chang, Y. Zhang, M. Tang and B. Wang, Nanoscale Research Letters, 2013, 8.

61. M. Husain, A. T. Saber, C. Guo, N. R. Jacobsen, K. A. Jensen, C. L. Yauk, A. Williams, U. Vogel, H. Wallin and S. Halappanavar, Toxicology and Applied Pharmacology, 2013.

62. M. Dorier, E. Brun, G. Veronesi, F. Barreau, K. Pernet-Gallay, C. Desvergne, t. rabilloud, C. Carapito, N. Herlin and M. CarriÃ¨re, Nanoscale, 2015.

63. N. Gou, A. Onnis-Hayden and A. Z. Gu, Environmental Science & Technology, 2010, 44, 5964.

64. S. Halappanavar, P. Jackson, A. Williams, K. A. Jensen, K. S. Hougaard, U. Vogel, C. L. Yauk and H. Wallin, Environmental and molecular mutagenesis, 2011, 52, 425.

65. T.-H. Kim, S.-W. Shin, J.-S. Park and C.-S. Park, Environmental Toxicology, 2013, n/a.

66. C. A. Falaschetti, T. Paunesku, J. Kurepa, D. Nanavati, S. S. Chou, M. De, M. Song, J.-t. Jang, A. Wu, V. P. Dravid, J. Cheon, J. Smalle and G. E. Woloschak, ACS Nano, 2013, 7, 7759.

67. J. A. Ubersax and J. E. Ferrell Jr, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8, 530.

68. C. Mathé, S. p. Devineau, J.-C. Aude, G. Lagniel, S. Chédin, V. Legros, M.-H. Mathon, J.-P. Renault, S. Pin, Y. Boulard and J. Labarre, PloS one, 2013, 8.

69. G. Yu, C.-L. Xiao, C.-H. Lu, H.-T. Jia, F. Ge, W. Wang, X.-F. Yin, H.-L. Jia, J.-X. He and Q.-Y. He, Molecular BioSystems, 2010, 7, 472.

70. S. Lemeer and A. J. R. Heck, Current Opinion in Chemical Biology, 2009, 13, 414.

71. J. Boekhorst, P. J. Boersema, B. B. J. Tops, B. van Breukelen, A. J. R. Heck and B. Snel, PLoS ONE, 2011, 6.

72. E. Brun, F. Barreau, G. Veronesi, B. Fayard, S. Sorieul, C. Chaneac, C. Carapito, T. Rabilloud, A. Mabondzo, N. Herlin-Boime and M. Carriere, Particle and fibre toxicology, 2014, 11.

73. J. S. Taurozzi, V. A. Hackley and M. R. Wiesner, Nanotoxicology, 2011, 5, 711.

74. J. Armengaud, B. Fernandez, V. r. Chaumont, F. o. Rollin-Genetet, S. p. Finet, C. Marchetti, H. Myllykallio, C. Vidaud, J.-L. Pellequer, S. Gribaldo, P. Forterre and P. Gans, The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278, 31078.

75. H.-H. Hsiao and H. Urlaub, PROTEOMICS, 2010, 10, 3916.

76. G. r. m. Clair, J. Armengaud and C. Duport, Molecular & cellular proteomics: MCP, 2012, 11.

77. V. r. Dupierris, C. Masselon, M. Court, S. Kieffer-Jaquinod and C. Bruley, Bioinformatics (Oxford, England), 2009, 25, 1980.

78. P. C. Carvalho, J. S. G. Fischer, E. I. Chen, J. R. Yates and V. C. Barbosa, BMC Bioinformatics, 2008, 9.

79. S. A. Didichenko, C. M. Fragoso and M. Thelen, The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278, 26055.

80. C. Krag, E. K. Malmberg and A. E. Salcini, Journal of Cell Science, 2010, 123, 4240.

81. G. Tibolla, R. Pineiro, D. Chiozzotto, I. Mavrommati, A. P. Wheeler, G. D. Norata, A. L. Catapano, T. Maffucci and M. Falasca, PLoS ONE, 2013, 8.

Supplementary information:

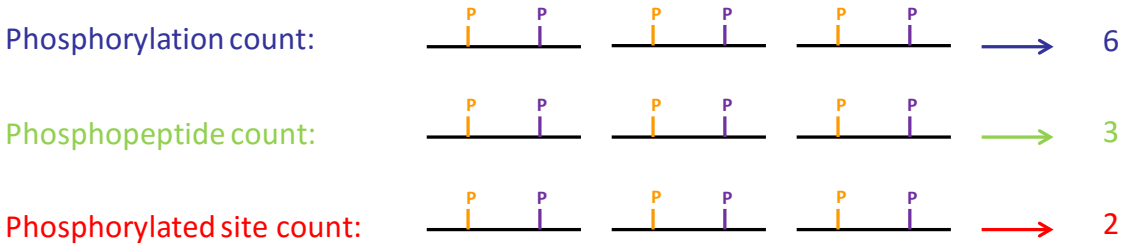


Figure S1. Illustration of the three whole protein phosphorylation level indicators. This illustration takes the example of a twice-phosphorylated peptide detected three times: this peptide accounts for 6 according to the phosphorylation count, 3 with the phosphopeptide count and 2 according to the phosphorylated site count.

Table S1. List of MS/MS spectra assigned to human peptides in the datasets of both control (Ctrl) and TiO_2-NP (TiO_2) exposed samples. Biological replicates are referenced A to C. PTM: post-translational modification, SPID: Swiss-Prot identification.

Table S2. List of unique phosphorylation sites detected by MS/MS in the datasets of both control (Ctrl) and TiO_2-NP (TiO_2) exposed samples. SPID: Swiss-Prot identification.

Table S3. List of proteins detected by MS/MS and whole protein phosphorylation levels in the datasets of both control (Ctrl) and TiO_2-NP (TiO_2) exposed samples. SPID: Swiss-Prot identification, PZC: pH of zero charge.

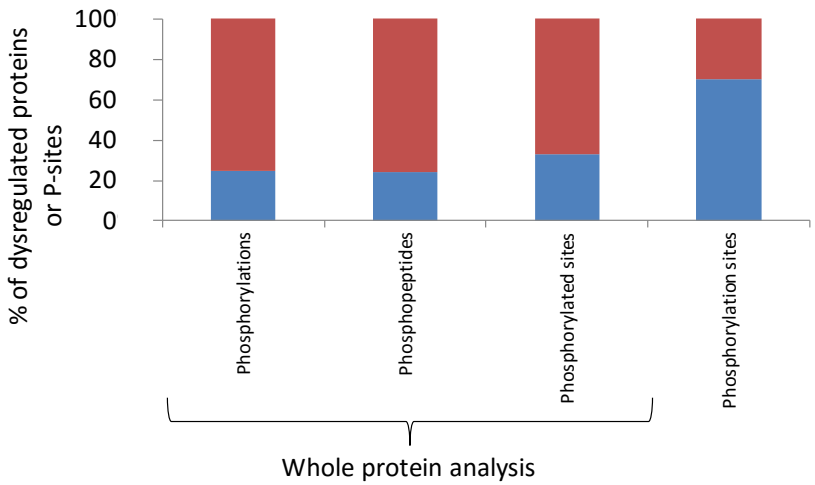


Figure S2. Distribution of up- (red - fold-change ≥ 1.5, p-value < 0.05) or down-regulated (blue - fold-change ≤ 1.5, p-value < 0.05) phosphorylation levels in terms of whole protein indicators (phosphorylation, phosphopeptide and phosphorylated site counts) or phosphorylation site specific phosphorylation level.

Tables S4. IPA® disease and biofunction ontology terms enriched in each protein group and proteins involved.

Canonical Pathways / Protein group	Ref	1	2	3	4	5	6	7	8
D-myo-inositol (1,4,5)-Trisphosphate Biosynthesis	1							1	
Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	12			3	4				
3-phosphoinositide Biosynthesis	10			3	4	2			
LXR/RXR Activation	5			2		2			
FXR/RXR Activation	4			2		2			
Cardiac β-adrenergic Signaling	10			3		2			
Palmitate Biosynthesis I (Animals)	1			1		1			
Fatty Acid Biosynthesis Initiation II	1			1		1			
Protein Kinase A Signaling	27			4					
D-myo-inositol-5-phosphate Metabolism	9					2			
D-myo-inositol (3,4,5,6)-tetrakisphosphate Biosynthesis	8			2		2			
D-myo-inositol (1,4,5,6)-Tetrakisphosphate Biosynthesis	8			2		2			
3-phosphoinositide Degradation	8			2		2			
Integrin Signaling	26	7	7		7		5		
Role of JAK1 and JAK3 in γc Cytokine Signaling	6	3	3		3				3
IL-9 Signaling	5	3	3		3		2		3
Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	6		3		3				3
PKCθ Signaling in T Lymphocytes	7	3	3		3		3		
Role of p14/p19ARF in Tumor Suppression	3	2	2		2		2		
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	3	2	2		2		2		
Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling	3	2	2		2				
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	12						3		
Glioma Signaling	11						3		
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	5						2		
Small Cell Lung Cancer Signaling	5						2		
Melanoma Signaling	5						2		
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	1			1					
Total number of proteins in each group	783	81	84	33	89	26	55	5	111

Figure S3. IPA® canonical pathways and number of implicated proteins in each group. The color scale reflects the number of proteins involved, from light to dark red as this number increases. Ref: theoretical number of proteins involved in the pathway within the reference universe.

Toxicity Functions / Protein group	1	2	3	4	5	6	7	8
Coronary artery disease	3	3	2		2			
Hepatitis C								3
Susceptibility to noncryptogenic cirrhosis								2
Susceptibility to hepatitis C virus								2
Cryptogenic cirrhosis								2
Hepatic steatosis			2					3
Stenosis of aortic valve			1					
Nephrotoxicity			1					
Total number of proteins in each group	81	84	33	89	26	55	5	111

Figure S4. IPA® toxicity functions and number of implicated proteins in each group. The color scale reflects the number of proteins involved, from light to dark red as this number increases.

Disease categories / Protein group	1	2	3	4	5	6	7	8
Cancer	55	57	12	36	4	38	4	43
Cardiovascular Disease	3	5	5		4			
Connective Tissue Disorders			2				1	
Dermatological Diseases and Conditions			3		5		1	
Developmental Disorder			5		2		2	2
Endocrine System Disorders	8	24	4	27	2		2	18
Gastrointestinal Disease	21	23	6	17	5			15
Hematological Disease			1				1	
Hepatic System Disease			2					5
Hereditary Disorder	3	3	9	3	5		3	5
Immunological Disease			2		1			
Infectious Disease			2		1		1	3
Inflammatory Disease			1			8		3
Metabolic Disease	9	11	6	11	4		1	11
Neurological Disease	12	13	6	14	4	9	1	15
Nutritional Disease		3	4	3	3			5
Ophthalmic Disease	4	7	5	7	3			4
Organismal Injury and Abnormalities	56	58	17	40	9	38	4	46
Psychological Disorders			3		3			
Renal and Urological Disease			3	2	1		2	
Reproductive System Disease	30		10	3	2	22	4	10
Respiratory Disease			2		1	4		
Skeletal and Muscular Disorders			4		2		1	2
Total number of proteins in each group	81	84	33	89	26	55	5	111

Figure S5. IPA® disease categories and number of implicated proteins in each group. The color scale reflects the number of proteins involved, from light to dark red as this number increases.

Upstream regulator	Molecule Type	1	2	3	4	5	6	7	8
MGEA5	enzyme								6
PHLPP1	enzyme			1		1			
PHLPP2	enzyme			1		1			
SOAT1	enzyme			1		1			
GPER1	g-protein coupled receptor			1		1			
BMP2	growth factor			1					
IGF1	growth factor	3	3		3				3
JAG2	growth factor			1					
TGFB1	growth factor			3		3			
Mapk	kinase			1		1			
CDK4	kinase	2	2		2				3
CDKN1A	kinase						2		
ERBB2	kinase					2			
FGFR2	kinase			1					
PIM1	kinase			1		1			
ESR1	ligand-dependent nuclear receptor								4
NR5A2	ligand-dependent nuclear receptor			1		1			
THRB	ligand-dependent nuclear receptor			1		1			
miR-126a-3p (and other miRNAs w/seed CGUACCG)	mature microrna			1		1			
miR-132-3p (and other miRNAs w/seed AACAGUC)	mature microrna	2	2		2		2		2
miR-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA)	mature microrna			1		1			
miR-26a-5p (and other miRNAs w/seed UCAAGUA)	mature microrna			1		1			
ARRB1	other			1					
BLOC1S5	other			1				1	
BLOC1S6	other			1				1	
DCN	other			1		1			
EFNA1	other			1		1			
IGFBP5	other			1		1			
KRT14	other								2
LGALS3	other	3	3		3		3		
LIMA1	other								3
SCAP	other			1		1			
VTN	other	2	2		2				
PTPase	phosphatase			1		1			
BRD7	transcription regulator								2
CCND1	transcription regulator	2	2		2				3
CDKN2A	transcription regulator								2
CEBPA	transcription regulator		2	2	2				
CREBZF	transcription regulator			1		1			
DNAJB6	transcription regulator			1					
HIC1	transcription regulator		3	2	3				4
HTATIP2	transcription regulator			1					
KMT2A	transcription regulator			1		1			
MAX	transcription regulator							1	
NFYA	transcription regulator			1		1			
POU2F1	transcription regulator			1					
POU2F2	transcription regulator			1					
PPARGC1A	transcription regulator			1		1			
SMAD3	transcription regulator								3
SMARCA4	transcription regulator								5
SREBF2	transcription regulator	2	2		2				2
TP53	transcription regulator		10						
TP63	transcription regulator	3	3	2	3	2			4
USF1	transcription regulator		2	2	2				2
ZNF217	transcription regulator				2			1	
FABP2	transporter			1		1			

Figure S6. Kinase and phosphatase upstream regulators identified by IPA®, target proteins and number of regulated proteins in each group. The color scale reflects the number of proteins involved, from light to dark red as this number increases.

Résultats complémentaires à l'article 2

En complément des résultats présentés dans l'article 2, nous avons analysé nos données de phosphoprotéomique avec d'autres logiciels et plateformes d'ontologie protéique, fournissant des résultats purement descriptifs ou d'enrichissement de catégories. Par ailleurs, nous avons cherché à valider les résultats déduits des analyses phosphoprotéomiques à l'aide d'autres techniques expérimentales. L'impact des NP de TiO_2 sur le niveau de phosphorylation global des protéines cellulaires a été confirmé par une autre technique que la protéomique, à savoir une coloration différentielle des phosphoprotéines et des protéines totales au sein d'un gel de polyacrylamide. Nous avons d'autre part étudié l'effet des NP de TiO_2 sur la quantité intracellulaire et le poids moléculaire de trois protéines dérégulées selon nos trois critères de niveau de phosphorylation protéique : SRRM1, BAG3 et HNRNPUL2. Enfin, s'agissant d'une des principales voies affectées d'après l'analyse phosphoprotéomique, l'effet des NP de TiO_2 sur la prolifération cellulaire a également été étudié directement. Ces résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

A. Analyse phosphoprotéomique descriptive et comparaison des résultats d'ontologie protéique obtenus avec différents logiciels et plateformes

Dans le cadre de cette analyse complémentaire, nous nous sommes limités aux groupes de protéines numérotés précédemment 4, 5 et 8 (Figure 3 de l'article 2), à savoir les protéines dérégulées selon au moins un des trois critères de niveau de phosphorylation protéique, selon les trois ou comportant au moins un site de phosphorylation dérégulé.

1. Analyse descriptive

Dans un premier temps nous avons réalisé une analyse descriptive des données, c'est-à-dire sans réaliser de test statistique d'enrichissement de catégories. En plus des groupes de protéines 4, 5 et 8, les protéines de l'univers de référence, soit l'ensemble des 783 protéines détectées dans les différents échantillons, ont également été analysées. D'une manière générale, les résultats montrent une distribution globalement similaire dans les quatre groupes. Notre attention s'est donc particulièrement portée sur les tendances intergroupes.

Tout d'abord les protéines détectées ont été comparées en termes de point isoélectrique et de masse moléculaire, d'après les données fournies par le logiciel MASCOT. La majorité des protéines (41-58%) présente un point isoélectrique inférieur à 6, 15-29% entre 6 et 8, 19-29% entre 8 et 10 et seulement 2 à 8% supérieur à 10 (Figure 33A). Les masses moléculaires sont principalement comprises entre 50 et 200 kDa ou inférieures à 50 kDa (12-24%) (Figure 33B). Seuls 8 à 10% des protéines présentent une masse moléculaire supérieure à 200 kDa, avec un maximum de 838 kDa atteint par MACF1 (microtubule-actin crosslinking factor 1).

A

pI	Ref	4	5	8
pI < 6	41	46	58	42
6 ≤ pI < 8	29	27	15	26
8 ≤ pI < 10	28	25	19	29
10 ≤ pI	3	2	8	3
Total	783	89	26	111

B

Mw (kDa)	Ref	4	5	8
Mw < 50	24	20	12	22
50 ≤ Mw < 100	38	35	38	39
100 ≤ Mw < 200	28	35	42	30
200 ≤ Mw	10	10	8	10
Total	783	89	26	111

Figure 33 : Distribution du point isoélectrique (pI) et de la masse moléculaire (Mw) des protéines détectées. Les tableaux associent le pourcentage de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque catégorie. Plus ce pourcentage est élevé, plus la coloration rouge de la case correspondante est foncée. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées.

Une analyse descriptive de la localisation cellulaire des protéines a ensuite été réalisée à l'aide des plateformes GO term mapper (Figure 34A) et IPA® (Figure 34B). Ces outils montrent que ces protéines sont majoritairement cytoplasmiques, à 72-79% selon GO term mapper et à 39-50% selon IPA®, et nucléaires, à 54-61% d'après GO term mapper et à 31-39% d'après IPA®. On note également un nombre important de protéines membranaires, 50-73% selon GO term mapper et 9-12% selon IPA®. Les chiffres plus élevés rapportés par GO term mapper par rapport à IPA® sont probablement liés au fait que cette première plateforme autorise le classement de chaque protéine dans plusieurs catégories, tandis que IPA® n'indique qu'un seul compartiment cellulaire par protéine. Néanmoins GO term mapper indique des proportions de protéines plus faibles dans les différents compartiments cellulaires pour le protéome humain total (PHT) en comparaison avec les groupes Ref, 4, 5 et 8 détectés ici (Figure 34A).

A

Catégorie	Identifiant GO	Ref	4	5	8	PHT
Cellule	GO:0005623	94	96	96	95	72
Intracellulaire	GO:0005622	91	93	96	93	56
Cytoplasme	GO:0005737	72	79	77	75	35
Noyau	GO:0005634	61	58	54	56	24
Membrane	GO:0016020	50	56	73	59	33
Région extracellulaire	GO:0005576	24	24	15	24	11
Chromosome	GO:0005694	9	6	8	5	2
Espace extracellulaire	GO:0005615	4	4	8	5	3
Surface cellulaire	GO:0009986	3	2	4	1	1
Matrice extracellulaire protéagineuse	GO:0005578	1	0	0	0	1
Structure encapsulante externe	GO:0030312	0	0	0	0	
Total en nombre de protéines		783	89	26	111	46686

B

Catégorie	Ref	4	5	8
Cytoplasme	39	43	50	45
Noyau	39	37	31	35
Membrane plasmique	10	10	12	9
Espace extracellulaire	2	2	4	2
Autre	10	8	4	9
n/d	0	0	0	0
Total en nombre de protéines	783	89	26	111

Figure 34 : Distribution de la localisation cellulaire des protéines détectées. Ces résultats ont été obtenus à partir des plateformes GO term mapper (A) et IPA® (B). Les tableaux associent le pourcentage de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque compartiment cellulaire. Ce pourcentage est également indiqué en comparaison pour le protéome humain total (PHT). Plus il est élevé, plus la coloration rouge de la case correspondante est foncée. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. « GO » : Gene Ontology, « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées, « n/d » : non-documenté.

Les résultats de ces deux plateformes ont également été comparés en termes de fonction ou type de protéines (Figure 35). GO term mapper indique une forte proportion de protéines capables de se lier à d'autres cibles cellulaires, protéines (79-85%) et acides nucléiques (36-42%) en particulier, les autres principales fonctions protéiques relevées étant des activités catalytiques (27-35%), transférase (13-19%) et hydrolase (12-19%), ainsi que de transduction du signal (5-15%) (Figure 35A). Les proportions relevées pour le PHT sont globalement similaires à celles des groupes Ref, 4, 5 et 8 détectés ici. On note toutefois un pourcentage plus faible dans le PHT pour les termes liaison, liaison protéique et liaison des acides nucléique. La plateforme IPA® relève quant à elle principalement 15-23% d'enzymes, 1-11% de régulateurs de transcription, 8% de kinases et 5-8% de transporteurs (Figure 35B). Cependant ces résultats sont probablement biaisés par le fait que 48-57% des protéines voient leur type qualifié de « autre », ce qui suggère un classement peu précis.

A

Catégorie	Identifiant GO	Ref	4	5	8	PHT
Liaison	GO:0005488	91	92	92	92	57
Liaison protéique	GO:0005515	80	79	85	77	28
Liaison des acides nucléiques	GO:0003676	41	36	42	43	17
Activité catalytique	GO:0003824	29	30	35	27	31
Activité transférase	GO:0016740	13	18	19	14	12
Activité hydrolase	GO:0016787	13	12	19	13	13
Activité de transduction du signal	GO:0004871	5	8	15	5	6
Activité kinase	GO:0016301	7	8	8	6	5
Activité structurale moléculaire	GO:0005198	7	7	4	9	3
Activité de régulation enzymatique	GO:0030234	8	6	8	5	3
Activité de récepteur	GO:0004872	2	4	8	3	5
Activité de transporteur	GO:0005215	3	3	4	2	6
Activité hélicase	GO:0004386	2	3	0	3	1
Activité isomérase	GO:0016853	1	2	0	2	1
Activité ligase	GO:0016874	4	2	4	1	2
Activité lyase	GO:0016829	1	2	4	2	1
Activité motrice	GO:0003774	2	2	4	3	1
Activité de canal	GO:0015267	0	1	0	0	2
Activité de transporteur ionique transmembranaire	GO:0015075	2	1	0	1	4
Activité oxydoréductase	GO:0016491	2	1	4	1	4
Activité de transport protéique	GO:0008565	1	0	0	0	0
Activité de régulation de la traduction	GO:0045182	1	0	0	0	0
Activité antioxydante	GO:0016209	0	0	0	0	0
Activité de transport d'électrons	GO:0009055	0	0	0	0	0
Total en nombre de protéines		783	89	26	111	46686

B

Catégorie	Ref	4	5	8
Enzyme	15	20	23	19
Régulateur de transcription	11	11	4	1
Kinase	8	8	8	8
Transporteur	5	7	8	5
Régulateur de traduction	2	0	0	1
Peptidase	2	0	0	0
Phosphatase	1	2	8	1
Récepteur transmembranaire	1	1	0	1
Canal ionique	0	1	0	0
Récepteur couplé à une protéine G	0	0	0	0
Cytokine	0	4	0	1
Facteur de croissance	0	0	0	0
Autre	55	48	50	57
n/d	0	0	0	0
Total en nombre de protéines	783	89	26	111

Figure 35 : Description de la fonction et du type de protéines détectées. Ces résultats ont été obtenus à partir des plateformes GO term mapper (A) et IPA® (B). Les tableaux associent le pourcentage de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque catégorie. Ce pourcentage est également indiqué en comparaison pour le protéome humain total (PHT). Plus il est élevé, plus la coloration rouge de la case correspondante est foncée. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. « GO » : Gene Ontology, « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées, « n/d » : non-documenté.

Enfin une étude descriptive des processus cellulaires reflétés par les protéines détectées a été menée via GO term mapper (Figure 36). Les premières catégories relevées étant très larges, elles rassemblent de nombreuses protéines (81-88% sont impliquées dans des processus cellulaires, 67-74% dans des processus métaboliques, etc.). Parmi les catégories plus resserrées, on trouve 38-46% de protéines impliquées dans la communication cellulaire, 23-43% dans des processus liés aux acides nucléiques ou à leurs composants, 30-50% dans le transport et 31-39% dans les processus biosynthétiques. Enfin de nombreuses catégories comprenant 15-30% des protéines sont également relevées. On note entre autres parmi elles les processus liés au développement de l'organisme, les processus cataboliques, de mort cellulaire, différenciation cellulaire, ou encore mouvements de composants cellulaires. D'une manière générale, on note encore une fois des % inférieurs dans le PHT, comparé aux groupes de protéines détectés ici.

Catégorie	Identifiant GO	Ref	4	5	8	PHT
Processus cellulaire	GO:0009987	88	87	81	86	68
Processus métabolique	GO:0008152	74	67	73	67	57
Régulation de processus biologique	GO:0050789	69	62	62	62	41
Réponse au stimulus	GO:0050896	50	56	62	52	28
Processus métabolique macromoléculaire	GO:0043170	60	51	58	51	39
Communication cellulaire	GO:0007154	38	46	46	43	22
Processus de l'organisme multicellulaire	GO:0032501	37	40	38	41	17
Processus lié aux nucléobases, nucléosides, nucléotides et acides nucléiques	GO:0006139	43	39	23	29	23
Transport	GO:0006810	30	39	50	34	18
Processus biosynthétique	GO:0009058	39	34	31	32	24
Développement de l'organisme multicellulaire	GO:0007275	29	30	31	33	12
Processus catabolique	GO:0009056	16	28	19	14	7
Mort cellulaire	GO:0008219	20	26	19	22	5
Différenciation cellulaire	GO:0030154	26	25	23	29	9
Processus multi-organismes	GO:0051704	20	20	19	22	17
Mouvement de composants cellulaires	GO:0006928	14	17	15	19	5
Sécrétion	GO:0046903	6	8	8	7	3
Organisation structurale extracellulaire	GO:0043062	2	2	0	2	1
Comportement	GO:0007610	3	1	4	2	2
Total en nombre de protéines		783	89	26	111	46686

Figure 36 : Description des processus cellulaires auxquels appartiennent les protéines détectées. Ces résultats ont été obtenus à partir de la plateforme GO term mapper. Le tableau associe le pourcentage de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque catégorie. Ce pourcentage est également indiqué en comparaison pour le protéome humain total (PHT). Plus il est élevé, plus la coloration rouge de la case correspondante est foncée. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. « GO » : Gene Ontology, « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées.

2. Tests d'enrichissement

En complément des analyses descriptives et des tests d'enrichissement de catégories réalisés avec IPA®, d'autres tests d'enrichissement ont été menés à l'aide des plateformes d'ontologie GOrilla (Eden et al., 2007, 2009), GO term finder (Boyle et al., 2004) et Babelomics/FatiGO (Al-Shahrour et al., 2004, 2007). A l'image des tests effectués avec IPA®, l'univers de référence considéré est toujours constitué de l'ensemble des 783 protéines détectées dans les différents échantillons. Le seuil de significativité est placé à p-value < 0,05, ou 0,01 dans le cas de GOrilla.

Les résultats montrent que les logiciels et plateformes d'ontologie en accès libre comme GOrilla, GO term finder et Babelomics relèvent beaucoup moins de termes significativement enrichis que IPA®. GOrilla en rapporte ici quatre : différenciation des cellules myéloïdes et des érythrocytes, chimiotaxie et membrane plasmique, aucun n'ayant été relevé dans le groupe 5 (Tableau 16). GO term finder relève un seul terme significatif : périphérie cellulaire, enrichi dans le groupe 8 et comprenant 46 protéines. Enfin le module FatiGO de la plateforme Babelomics ne rapporte aucun terme significativement enrichi.

Tableau 16 : Catégories d'ontologie protéique enrichies parmi les protéines détectées selon la plateforme GOrilla.[a]

Catégorie	Identifiant GO	4	5	8
Différenciation des cellules myéloïdes	GO:0030099	6	0	0
Chimiotaxie	GO:0006935	0	0	6
Différenciation des érythrocytes	GO:0030218	5	0	5
Membrane plasmique	GO:0005886	0	0	39
Total en nombre de protéines		89	26	111

[a]Le tableau associe le nombre de protéines des groupes Ref, 4, 5 et 8 appartenant à chaque catégorie. La dernière ligne indique le nombre total de protéines contenues dans chaque groupe. Ces analyses ont été mises à jour les 11-12 juin 2015. « GO » : Gene Ontology, « Ref » : univers de référence comprenant l'ensemble des protéines détectées.

B. Confirmation de l'absence de modification du niveau de phosphorylation global des protéines après exposition aux NP de TiO_2

En complément des résultats présentés dans l'article 2, l'effet des NP de TiO_2 sur le niveau de phosphorylation global des protéines a été étudié par une autre technique que la protéomique, à savoir une coloration différentielle des phosphoprotéines, par le marqueur Pro-Q® Diamond, puis des protéines totales, par le marqueur SYPRO® Ruby, au sein d'un gel de polyacrylamide. L'intensité des pistes protéiques totales de chaque échantillon a été quantifiée pour chacun des marqueurs et la quantité de phosphoprotéines a été normalisée par la quantité totale de protéines. Les résultats montrent une absence de modification du niveau de phosphorylation global des protéines cellulaires après exposition des cellules aux NP de TiO_2, ce qui confirme les conclusions de l'analyse phosphoprotéomique.

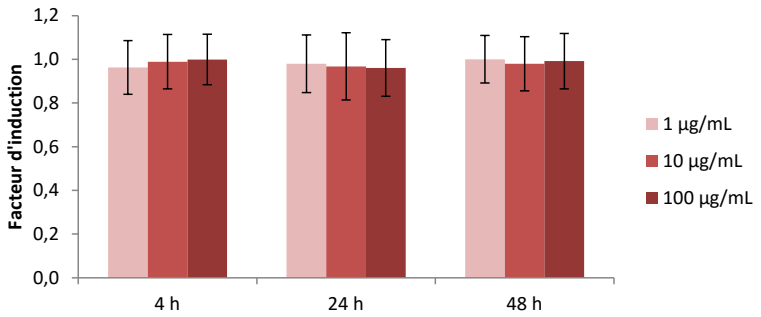


Figure 37 : Niveau de phosphorylation global des protéines cellulaires après exposition des cellules aux NP de TiO_2. Ces résultats ont été obtenus par des techniques de coloration au sein de gels de polycarylamide. Ils sont exprimés en facteur d'induction par rapport aux contrôles non-exposés.

C. La quantité de protéines intracellulaires évolue inversement à leur niveau de phosphorylation

La quantité intracellulaire de trois protéines détectées dans les phosphoprotéomes des cellules témoins et/ou exposées a été étudiée par western-blot. Ces protéines sont BAG3, HNRNPUL2 et SRRM1. Les résultats obtenus montrent que la concentration intracellulaire de ces protéines (Figure 38) évolue dans le sens inverse de leur niveau de phosphorylation mesuré dans le cadre de l'étude phosphoprotéomique (Article 2, Table S3). En effet, le contenu cellulaire de BAG3 n'est pas modifié lors du traitement aux NP de TiO_2, alors que son niveau de phosphorylation diminue selon les trois indicateurs. La concentration en HNRNPUL2 baisse, tandis que son niveau de phosphorylation augmente. Enfin la quantité cellulaire de SRRM1 augmente, alors que son niveau de phosphorylation

diminue. La résolution associée aux western-blots était ici insuffisante pour observer les modifications de poids moléculaire liées aux modulations du niveau de phosphorylation.

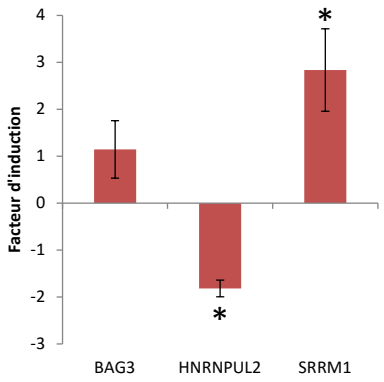


Figure 38 : Niveau d'expression global des protéines BAG3, HNRNPUL2 et SRRM1 dans les cellules A549 exposées à 100 µg/mL de NP de TiO_2 pendant 24 h. Ces résultats, obtenus par western-blot, sont exprimés en facteur d'induction par rapport au contrôle. Significativité statistique, par rapport au contrôle (*) : $p < 0,05$.

D. La prolifération cellulaire n'est pas modifiée après exposition aux NP de TiO_2

La prolifération cellulaire après exposition aux NP de TiO_2 a été étudiée par incorporation de BrdU dans l'ADN des cellules proliférantes (en remplacement de la thymine) pendant 2h post-exposition et marquage colorimétrique de ce BrdU. Les résultats montrent que la prolifération, quelle que soit la concentration de NP de TiO_2 utilisée (0, 1, 10 ou 100 µg/mL), décroit avec le temps d'incubation des cellules dans le milieu d'exposition (Figure 39). Cela est probablement dû à l'absence de sérum dans ce milieu ou à une inhibition de contact liée à l'atteinte du niveau de confluence des cellules. Aucun effet statistiquement significatif de l'exposition aux NP de TiO_2 sur la prolifération cellulaire n'a été relevé.

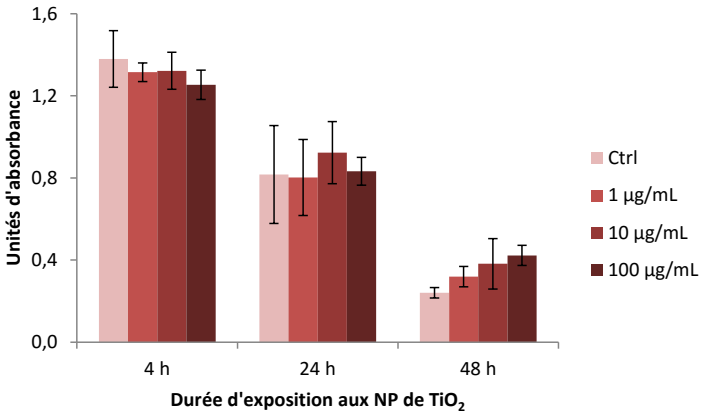


Figure 39 : Prolifération cellulaire après exposition aux NP de TiO_2. Ctrl : contrôle (non-exposé aux NP de TiO_2).

Discussion complémentaire à l'article 2

Les analyses descriptives complémentaires à l'article 2 montrent que 41-58% des protéines détectées dans les phosphoprotéomes des cellules contrôles et exposées aux NP de TiO_2 présentent un point isoélectrique inférieur à 6. En outre 90-92% des protéines détectées possèdent un poids moléculaire inférieur à 200 kDa, le maximum étant situé à 838 kDa. Ces distributions sont cohérentes avec les données de la littérature portant sur le protéome humain total, qui indiquent entre autres une

médiane située environ à pH 7 pour le point isoélectrique (Wu et al., 2006). Aucune donnée satisfaisante n'a été trouvée en comparaison pour le phosphoprotéome humain agrégé. D'une manière générale, les résultats de l'analyse descriptive des paramètres physico-chimiques et des termes d'ontologie protéique montrent des profils de répartition globalement similaires dans les différents groupes de protéines détectés. La répartition des protéines dans les différents compartiments cellulaires confirme les observations notées dans l'article 2, dans la mesure où ces protéines sont principalement cytoplasmiques et/ou nucléaires. L'analyse par GO term mapper des termes d'ontologie liés aux fonctions protéiques relève une forte proportion de protéines capables de lier d'autres cibles, dont les acides nucléiques. On observe également des proportions non-négligeables de protéines impliquées dans des processus de communication cellulaire et de transport, ce qui rejoint encore une fois les conclusions de l'article 2. On note en comparaison des pourcentages souvent plus faibles pour les différents termes d'ontologie protéique dans le protéome humain total considéré par GO term mapper. Par ailleurs on constate que IPA® semble moins adapté à une analyse descriptive des termes d'ontologie liés à la fonction protéique que GO term mapper. En effet IPA® ne répertorie qu'une seule fonction par protéine et la classe souvent dans la catégorie « autre », ce qui introduit un biais dans l'étude des répartitions.

Les tests d'enrichissement montrent que les logiciels et plateformes d'ontologie en accès libre comme GOrilla, GO term finder et Babelomics/FatiGO relèvent beaucoup moins de termes significativement enrichis que IPA®. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences de résultats. Tout d'abord IPA® fonde ses analyses sur sa propre base de données, qui diffère de la base de données Gene Ontology officielle[13] utilisée par les plateformes libres comme GOrilla, GO term finder ou Babelomics/FatiGO. Cela explique notamment que les termes relevés ne soient pas formulés ni hiérarchisés de la même manière. Par ailleurs chaque logiciel ou plateforme d'ontologie utilise un algorithme différent, en particulier concernant les tests statistiques. GOrilla est la seule plateforme utilisée ici à employer un seuil d'enrichissement placé à 0,01 en termes de p-value dans les conditions les moins stringentes, les autres résultats d'enrichissement ayant été obtenus avec un seuil à 0,05. Les analyses d'enrichissement IPA® présentées dans l'article 2 sont basées sur des tests de Fisher, tout comme celles de Babelomics/FatiGO (Al-Shahrour et al., 2004, 2007), tandis que GOrilla utilise des tests mHG ou HG (Eden et al., 2007, 2009) et GO term finder emploie des distributions hypergéométriques (Boyle et al., 2004). En outre ces plateformes calculent également, au moins pour certains types d'analyses, une estimation du taux de faux positifs à l'aide de tests de Benjamini-Hochberg. C'est notamment le cas de IPA® dans le cadre des analyses de voies canoniques et de listes de toxicité. Cependant aucun résultat d'enrichissement rapporté ici ne s'est révélé significatif selon ces tests.

Le niveau d'expression global de trois protéines détectées dans les phosphoprotéomes des cellules témoins et/ou exposées a été étudié par western-blot. Ces protéines sont BAG3, HNRNPUL2 et SRRM1. Le choix de ces protéines est lié à la fois à des aspects d'analyse phosphoprotéomique et à leur rôle fonctionnel dans les cellules. Toutes trois sont dérégulées selon les trois critères de niveau de phosphorylation protéique (i.e. elles appartiennent toutes au groupe 5). SRRM1 est la protéine la plus abondante du groupe 5, détectée au total 237 fois, à travers 5 peptides différents. BAG3 fait également partie des protéines les plus abondantes dans ce groupe, avec 39 détections à travers 3 peptides différents. Toutes deux présentent des niveaux de phosphorylation inférieurs dans les cellules

[13] http://geneontology.org/, consulté le 12/06/2015

exposées par rapport aux cellules contrôles (i.e. facteur d'induction négatif). HNRNPUL2 en revanche voit son niveau de phosphorylation global augmenter après exposition des cellules aux NP de TiO_2. Cette protéine, détectée 10 fois à travers un peptide unique, est moins abondante que SRRM1 et BAG3. Cependant elle est impliquée dans la réparation de l'ADN et en particulier dans la réparation des cassures doubles-brins (Polo et al., 2012), d'où son intérêt dans le cadre de cette étude. Plus précisément, HNRNPUL2 interagit avec le complexe MRN et est recruté sur le lieu des cassures doubles-brins, où il promeut leur réparation par recombinaison homologue, via notamment le recrutement de l'hélicase BLM et l'activation de la voie de signalisation ATR. Sur le plan fonctionnel, SRRM1 est également liée à la réparation des cassures doubles-brins via son interaction avec RAD21 (McCracken et al., 2005). RAD21, qui est une sous-unité du complexe des cohésines, est recruté sur le site des cassures doubles-brins et promeut la réparation de ces cassures en phase G2 du cycle cellulaire (Bauerschmidt et al., 2010). Les cohésines jouent de plus un rôle dans la distribution des unités ϒH2AX au niveau de ces cassures et peuvent permettre de maintenir la transcription des gènes situés dans ces zones (Caron et al., 2012). L'interaction SRRM1-RAD21 a principalement lieu lorsque SRRM1 se trouve dans un état hautement phosphorylé. Or ce niveau de phosphorylation est ici diminué dans les cellules exposées aux NP de TiO_2, d'où une potentielle réduction de l'interaction. BAG3, enfin, intervient dans de nombreux processus cellulaires comme l'organisation du cytosquelette, l'apoptose et l'autophagie (Rosati et al., 2011), processus révélés impactés selon notre analyse par la perturbation du phosphoprotéome par les NP de TiO_2. Les résultats obtenus sur les protéines BAG3, HNRNPUL2 et SRRM1 montrent que le niveau d'expression global des protéines évolue en sens inverse de leur niveau de phosphorylation mesuré dans le cadre de notre étude phosphoprotéomique. Cette constatation renforce la pertinence des indicateurs choisis pour l'analyse du niveau de phosphorylation protéique. Par ailleurs l'analyse du niveau de phosphorylation global des protéines cellulaires par coloration en gel confirme la conclusion de l'étude phosphoprotéomique, dans la mesure où aucun effet significatif de l'exposition des cellules aux NP de TiO_2 n'est détecté.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude montrent que les NP de TiO_2 induisent une perturbation du phosphoprotéome cellulaire, impactant de nombreux processus cellulaires. La réparation de l'ADN ne fait pas directement partie des processus les plus affectés. Cependant, on note tout de même la dérégulation du niveau de phosphorylation de trois protéines impliquées dans la réparation des cassures doubles-brins : HNRNPUL2, SRRM1 et PARP4. Le rôle de HNRNPUL2 et SRRM1 dans la réparation de l'ADN est décrit ci-dessus. PARP4 fait partie du complexe « vault », qui pourrait intervenir dans le transport intracellulaire des protéines de réparation de l'ADN, coordonner la formation des complexes de réparation du HR au niveau des cassures doubles-brins et garantir un niveau suffisant d'expression de RAD51 (Abd Elmageed et al., 2012; Lara et al., 2011). En outre, une augmentation de l'expression du complexe vault conduirait à une baisse de l'activité NHEJ via une répression de KU70/80.
Par ailleurs, la perturbation de nombreux processus cellulaires relevée dans le cadre de notre étude phosphoprotéomique pourrait indirectement impacter la réparation de l'ADN. En effet cette dernière est intimement liée entre autres à la progression du cycle cellulaire (Hoeijmakers, 2001; Patil et al., 2013) et aux processus de régulation de l'apoptose (Bernstein et al., 2002), dont la dérégulation a ici été observée.

Les données montrent que la prolifération cellulaire, quelle que soit la concentration de NP de TiO_2 utilisée (0-100 µg/mL), décroit avec le temps d'incubation des cellules dans le milieu d'exposition dépourvu de sérum. Ce phénomène a déjà été observé par d'autres équipes dans différentes lignées

cellulaires après incubation des cellules dans des milieux de culture pauvres en sérum (Oya et al., 2003). On note enfin une absence d'effet des NP de TiO_2 sur la prolifération cellulaire après exposition. D'autres études rapportent que les NP de TiO_2 augmentent (Huang et al., 2009; Medina-Reyes et al., 2014) ou diminuent la prolifération cellulaire (Acar et al., 2015; Coccini et al., 2015). Ces divergences de résultats peuvent être expliquées par l'utilisation de conditions expérimentales différentes, notamment en termes de lignées cellulaires et de NP.

Conclusion sur les résultats complémentaires à l'article 2

Ces résultats complémentaires confirment en grande partie les tendances relevées dans l'article 2 concernant les termes d'ontologie protéique, en montrant notamment que les protéines détectées et dérégulées sont principalement cytoplasmiques et/ou nucléaires et sont impliquées dans des processus de communication cellulaire et de transport. On observe en outre un nombre important de protéines capables de lier d'autres cibles et en particulier les acides nucléiques. Cependant les tests d'enrichissement réalisés avec les plateformes libres comme GOrilla, GO term finder et Babelomics/FatiGO relèvent beaucoup moins de termes significativement enrichis que IPA®, ce qui peut s'expliquer par des différences méthodologiques entre ces divers outils. La pertinence des indicateurs choisis pour l'analyse du niveau de phosphorylation protéique est renforcée par la démonstration sur trois protéines de la décorrélation de ces niveaux de phosphorylation avec l'expression globale des protéines. L'absence de modification du niveau de phosphorylation global des protéines après exposition aux NP de TiO_2 est confirmée par une technique différente de la protéomique. Par ailleurs, même si l'article 2 révèle un impact des NP de TiO_2 sur le niveau de phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, ces données complémentaires montrent que cet effet ne se répercute pas sur la prolifération cellulaire.

Enfin, même si la réparation de l'ADN ne fait pas partie des principales fonctions cellulaires impactées par la perturbation du phosphoprotéome, quelques protéines impliquées dans la réparation subissent néanmoins une dérégulation de leur niveau de phosphorylation. La perturbation du cycle cellulaire et de la régulation de l'apoptose pourrait également indirectement impacter la réparation de l'ADN.

Article 3: TiO_2 nanoparticles induce genotoxicity and down-regulate DNA repair genes in bronchial BEAS-2B cells

Ce troisième article a pour objet de vérifier la dépendance vis-à-vis de la lignée cellulaire pulmonaire du profil de cyto-génotoxicité et d'expression des gènes de réparation de l'ADN après exposition aux NP de TiO_2. En effet l'emploi de la lignée A549 dans des études de génotoxicité est parfois critiqué, dans la mesure où ces cellules cancéreuses sont hypotriploïdes et présentent peut-être une réponse antioxydante anormale. L'absence d'autre lignée cellulaire commerciale dans la catégorie des cellules alvéolaires humaines nous a conduits à étendre notre recherche d'une lignée de comparaison aux cellules bronchiques. Notre choix s'est porté sur la lignée BEAS-2B, car celle-ci est issue de cellules non-cancéreuses et présente une ploïdie et une réponse antioxydante normales.

La réponse des cellules BEAS-2B aux NP de TiO_2 a été étudiée en termes de cytotoxicité par le test MTT et de génotoxicité par le test des comètes en conditions alcalines et le dosage des bases 8oxodG par HPLC-MS^2. L'expression de gènes de réparation de l'ADN appartenant aux voies BER et NER a également été analysée par RT-qPCR.

On observe que les NP de TiO_2 induisent une cytotoxicité modérée, mais une augmentation significative des dommages à l'ADN, i.e. cassures simple ou double-brin ou sites alcali-labiles et 8oxodG. Six gènes de réparation de l'ADN parmi les 18 étudiés voient leur expression diminuer, et ce principalement après 4-24 h d'exposition à 100 µg/mL, soit la concentration de NP de TiO_2 la plus élevée. Ces répressions, notamment celles de gènes du BER, pourraient expliquer les dommages génotoxiques observés.

Les résultats montrent une grande similitude entre le profil de toxicité engendré par les NP de TiO_2 chez BEAS-2B et celui constaté précédemment chez A549, ce qui renforce la pertinence de l'usage de l'une ou l'autre lignée pour l'étude des mécanismes de génotoxicité des nanomatériaux. Les principales différences entre les deux lignées concernent les cinétiques d'apparition des dommages à l'ADN et l'amplitude des dommages observés, en termes de 8oxodG et de nombre de gènes de réparation de l'ADN réprimés. Les cellules BEAS-2B apparaissent plus sensibles que les A549 aux dommages génotoxiques oxydatifs induits par les NP de TiO_2, ce qui pourrait être lié à l'éventuelle différence intrinsèque de réponse antioxydante évoquée ci-dessus. En revanche, l'expression des gènes de réparation de l'ADN est moins affectée chez BEAS-2B que chez A549. Cela suggère que les modifications d'expression constatées seraient indépendantes du stress oxydant engendré par les NP.

Cet article sera soumis pour publication à un comité de lecture dès que l'article 1 présenté précédemment sera publié.

Article 3: TiO_2 nanoparticles induce genotoxicity and down-regulate DNA repair genes in bronchial BEAS-2B cells

M. Biola-Clier[1,2], D. Béal[1,2], G-S. Rebello-Moreira[1,2], L. Armand[1,2], T. Douki[1,2], M. Carrière[1,2*]

[1]Univ. Grenoble Alpes, INAC, SCIB, F-38000 Grenoble, France ;
[2]CEA, INAC, SCIB, F-38054 Grenoble, France
*Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 38 78 03 28; E-mail address: marie.carriere@cea.fr

Keywords:
Genotoxicity, titanium dioxide, gene expression, DNA damage

Abstract:
During the last decades TiO_2 nanoparticle (NP) production has increased tremendously, raising concerns as to their toxicity towards people who handle them and are likely to inhale them. It was shown previously that TiO_2-NP exposure on carcinoma A549 alveolar pulmonary cells induces moderate cell mortality, but DNA single-strand breaks and/or alkali-labile sites and oxidized DNA bases, impairs DNA repair activity through both BER and NER pathways and globally down-regulates DNA repair gene expression in all pathways. The aim of this study is to investigate if these effects can also be observed in a non-cancerous pulmonary cell line. We used BEAS-2B bronchial epithelial cells to study the impact of TiO_2 NPs on cell mortality through the MTT assay, genotoxicity using the comet assay and HPLC-MS/MS measurement of 8oxodG levels and expression of BER and NER DNA repair genes by RT-qPCR. Data show that TiO_2-NP exposure induces a globally similar response in BEAS-2B as in A549 cells. This strengthens the evidence towards TiO_2-NP induced genotoxicity and the involvement of a down-regulation of DNA repair genes in TiO_2-NP toxicity mechanisms. Moreover it suggests that either A549 or BEAS-2B cells may be relevantly used in DNA damage response focused nanotoxicity studies.

Introduction:

TiO_2 nanoparticles (NPs) belong to the top five NPs used in consumer products (Shi et al., 2013). Their annual production is estimated to equal 3800-7800 tons in the US alone (Boland et al., 2014) and is steeply increasing (Shi et al., 2013). It therefore appears necessary to characterize their impact on the health of people who handle them and are likely to inhale them, as it was shown that inhalation is the main human exposure route to these NPs in occupational settings.

Many *in vitro* and *in vivo* animal studies previously addressed the impact of TiO_2 NPs on pulmonary models (Johnston et al., 2009; Landsiedel et al., 2014; Shi et al., 2013; Skocaj et al., 2011). Results show that the main toxicity mechanisms are induction of inflammation and oxidative stress, which are frequently associated with genotoxicity. High exposure doses in animal *in vivo* inhalation studies also led to the formation of lung tumors (Shi et al., 2013). This resulted in the listing of TiO_2 by IARC (International Agency for Research on Cancer) as possibly carcinogenic (2B group) (Baan, 2007).

TiO_2-NP induced genotoxicity may take the form of DNA single or double-strand breaks or oxidized bases such as 8oxodG (Chen et al., 2014a; Jugan et al., 2012). This damage is thought to mainly result from oxidative stress generated by these NPs (Chen et al., 2014a), which is primarily reflected by an increase in intracellular reactive oxygen species (ROS) and sometimes associated to glutathione

depletion and decrease in the activity of antioxidant enzymes (Kermanizadeh et al., 2014; Petersen and Nelson, 2010). *In vitro,* TiO_2 NPs are internalized in most cell types, mainly through endocytosis and accumulate in the cytoplasm inside vesicles or as free particles (Bruinink et al., 2015; Simon-Deckers et al., 2008). Very few studies observe the penetration of TiO_2 NPs inside the nucleus (Ahlinder et al., 2013; Geiser et al., 2005; Jugan et al., 2012; Li et al., 2010; Shukla et al., 2011). This suggests that TiO_2-NP induced genotoxicity is likely indirect (Chen et al., 2014a) and that if production of ROS at NP surface is involved, it must be through the generation of molecules such as H_2O_2 which, unlike highly reactive radicals, can readily diffuse on long cellular distances and through cell membranes (Petersen and Nelson, 2010). However TiO_2-NP induced DNA damage could also result from other phenomena (Magdolenova et al., 2014). It was shown for instance that TiO_2 NPs could alter mitotic progression (Huang et al., 2009), as well as impair DNA repair activity (Jugan et al., 2012) and alter the expression of DNA repair genes and proteins (Lan et al., 2014; Tilton et al., 2014) (cf. Article 1).

Our group previously addressed the cyto- and genotoxic impact of TiO_2 NPs on carcinoma lung A549 alveolar epithelial cells (Jugan et al., 2012; Simon-Deckers et al., 2008) (cf. Article 1). Results show that these NPs induce moderate cell mortality, but production of intracellular ROS, DNA single-strand breaks or alkali-labile sites and 8oxodG oxidative DNA damage (Jugan et al., 2012). Additionally it was shown that they strongly decrease the cellular DNA repair capacity through impairment of both base excision and nucleotide excision DNA repair pathways (BER and NER). This impairment could result from a global down-regulation of the expression of DNA repair genes and proteins through all DNA repair pathways (cf. Article 1). However the use of A549 cells in DNA damage response investigations is often criticized on the basis that they are hypotriploid cells[14] which show increased oxidative stress response (Singh et al., 2006). Their behavior may thus significantly differ from that of wild-type cells. It was shown in particular that this cell line harbors a mutated *KEAP1* gene, which results in absence of KEAP1-mediated NRF2 antioxidant cellular response repression, thus providing A549 cells with a naturally boosted antioxidant response (Singh et al., 2006). However the catalogue of somatic mutations in cancer (cancer.sanger.ac.uk/cosmic) does not confirm the presence of this mutation.

BER and NER both deal with DNA lesions that affect only one DNA strand (Fousteri and Mullenders, 2008; Hegde et al., 2008; Hoeijmakers, 2001). BER repairs non-helix distorting lesions such as oxidized bases or single-strand breaks (Hegde et al., 2008), while NER conversely specializes in the repair of helix distorting lesions such as bulky DNA adducts and intra-strand crosslinks (Fong et al., 2013; Fousteri and Mullenders, 2008; Hoeijmakers, 2001). Since TiO_2 NPs mainly induce oxidative DNA damage and single-strand breaks, these two pathways are certainly involved in their repair processes.

The aim of this study is to compare the response of non-cancerous bronchial epithelial BEAS-2B cells to that of A549 cells, particularly their DNA damage response, when exposed to TiO_2 NPs. We therefore used the exact same TiO_2-NP exposure conditions as in our previous work that was carried out on A549 cells, i.e. exposure to 10-100 µg/ml of Aeroxide® P25 TiO_2 NPs in serum-free DMEM culture medium during 4, 24 or 48 h. We studied the impact of TiO_2 NPs on cell viability through the MTT assay and on DNA damage using the comet assay and HPLC-MS/MS dosage of 8oxodG lesions. Finally we measured the expression of 18 genes involved in BER or NER DNA repair pathways by RT-qPCR.

[14] www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx?geo_country=fr, consulted on June 22nd, 2015.

Methods:

Chemicals and nanoparticles:

Unless indicated otherwise, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and were > 99% pure.

TiO_2 P25 nanoparticles (Aeroxide® P25) were obtained from Evonik. Their physico-chemical characteristics were previously determined to be as follows: spherical shape, 86% anatase, diameter of 24 nm, specific surface area of 46 m^2/g and point of zero charge of 7.0 (Jugan et al., 2012; Simon-Deckers et al., 2008).

Nanoparticles were dispersed and diluted in cell exposure medium, i.e. serum-free cell culture medium, as previously described (Simon-Deckers et al., 2008). After dispersion in water, the number-based hydrodynamic diameter was 70 ± 20 nm and polydispersity index (PDI) was 0.18 ± 0.04. Hydrodynamic diameter shifted to 720 ± 20 nm and PDI to 0.50 ± 0.02 after dilution in exposure medium, suggesting agglomeration.

Cell culture and exposure conditions:

Human epithelial lung BEAS-2B bronchial cells were purchased from ATCC (CRL-9609). They were cultured in DMEM (Gibco, 11960-044) containing 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics and glutamine, and exposed to TiO_2 NPs in FBS-free cell culture medium as previously published for A549 alveolar cells (Jugan et al., 2012) (cf. Article 1). Exposure doses were 0; 10 and 100 µg/ml (i.e. 0.17-17 $\mu g/cm^2$ = 1.1 pg – 0.11 ng/cell) TiO_2 NPs, during 4; 24 or 48 h, except for cytotoxicity assessment where we used concentrations of 0; 10; 50; 100 and 200 µg/ml.

Cytotoxicity assay:

Cytotoxicity to BEAS-2B cells was assessed by using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay as previously described (Jugan et al., 2012; Mosmann, 1983). Cells were grown in 96-well plates before being exposed to 50 µl of 0-200 µg/ml of NP suspension for 4-48 h. Prior to absorbance reading, in order to limit possible NP interference with the assay, remaining NPs were left to sediment for 1h at room temperature and plates were centrifuged for 5 min at 3200 rcf, 22°C before transfer of the supernatants (50 µl out of 100µl) in a new plate as previously described (Brun et al., 2014).

Genotoxicity assays:

Comet assay:

DNA strand breaks and alkali-labile sites induced by nanoparticles in BEAS-2B cells were assessed through the alkaline version of the comet assay (Ostling and Johanson, 1984) as previously described (Jugan et al., 2012). About 20000 cells from each sample were deposited on each slide, and three slides per sample. Lysis was performed overnight at 4°C and electrophoresis was carried out at 25 V (300 mA) for 30 min.

8oxodG dosage through HPLC-MS/MS:

Oxidative damage to DNA was measured by the dosage of 8oxodG through HPLC-MS/MS. DNA from frozen pellets (-80°C) was extracted using the DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol with an extra RNase treatment step after cell lysis, i.e. 2 min of incubation with 400 µg of RNase A. DNA elution was performed in 100 µl of 0.1 mM deferoxamine aqueous solution to prevent spurious oxidation. DNA digestion of 50 µl of sample was performed through two

incubation steps of 2h each at 37°C. The first incubation was preceded by the addition of 0.025 U phosphodiesterase II (Sigma, P9041), 2.5 U DNAse II (Sigma, D4138), 0.5 U nuclease P1 (Sigma, N8630 - in 300 mM ammonium acetate, 1 mM $ZnSO_4$, pH 5.3), 0.5 µmol succinic acid and 0.25 µmol $CaCl_2$, pH 6. Samples were vortexed once 30 min after the beginning of incubation. Then 0.015 U phosphodiesterase I (Worthington, LS003926), 2 U alkaline phosphatase (Sigma, P6774), 3 µmol Tris and 6 nmol EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), pH 8) were added before the second incubation period. DNA digestion was stopped by addition of 3.5 µl 0.1 M HCl. HPLC-MS/MS analysis was carried out as previously described (Frelon et al., 2000; Jugan et al., 2012).

DNA repair gene expression analysis:

DNA repair gene expression was assessed by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) as previously described (cf. article 1). Briefly, RNA was extracted and reverse transcribed using the GenElute™ mammalian total RNA miniprep kit (Sigma) with the optional DNase treatment step and the SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Life Technologies), according to the manufacturers' protocols. qPCR was performed on a MX3005P Multiplex Quantitative PCR thermocycler (Stratagene). Three reference genes, namely *GAPDH*, *S18* and *CycloB* were chosen for normalization using BestKeeper (Pfaffl et al., 2004). Relative quantification of gene expression and statistical analyses were performed with the REST 2009 software (Qiagen (Pfaffl, 2001)), which uses the ΔΔCq method. A theoretical value of 2 was assumed for all PCR efficiencies.

Statistical analyses:

Experiments were performed on at least three biological replicates. Unless indicated otherwise, statistical significance was assessed with both non-parametric one-way analysis of variance on ranks (Kruskal-Wallis) and paired comparison Mann-Whitney u-tests using Statistica 8.0 software (Statsoft). Results were considered statistically significant when p-value was < 0.05.

Results:

TiO_2 NPs induce only moderate cell mortality:

TiO_2-NP induced cytotoxicity was assessed using the MTT assay based on the measurement of mitochondrial activity. Results show only moderate dose-dependent cell mortality that remains below 30% even at the highest dose of 200 µg/ml TiO_2 NPs during 48 h (Figure 1). No cell mortality was observed at 4 h. Cytotoxicity was only noticed at 24 h and 48 h time points.

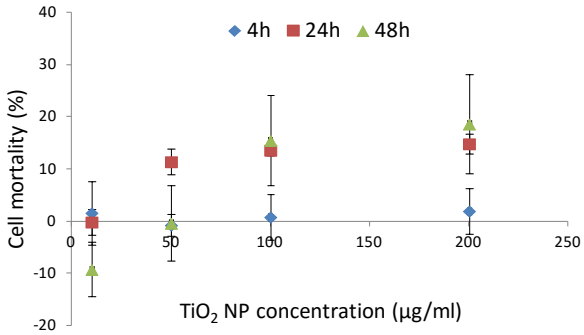


Figure 1: MTT cell mortality rates of BEAS-2B cells when exposed to TiO_2 NPs.

TiO_2 NPs induce genotoxicity:

TiO_2-NP induced genotoxicity was assessed through both the alkaline comet assay and 8oxodG DNA oxidative lesion dosage. Both assays show an induction of DNA damage. The comet assay revealed the dose-dependent presence of DNA breaks (or alkali-labile sites) in all exposure conditions (Figure 2A). Dose-dependent 8oxodG lesions were likewise detected at all time points following exposure to 100 µg/ml (Figure 2B). However 10 µg/ml TiO_2 NPs only induced 8oxodG at 4 h. Both assays showed higher DNA damage at 100 µg/ml than at 10 µg/ml.

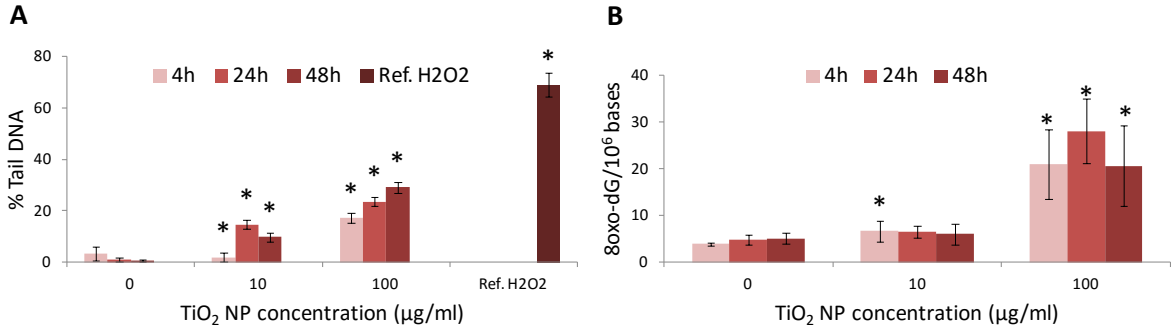


Figure 2: TiO_2-NP induced genotoxicity in BEAS-2B cells as measured by the alkaline comet assay (A) and the dosage of 8oxodG oxidative DNA lesions (B). Statistical significance, exposed vs. control, (*): $p < 0.05$.

TiO_2 NPs down-regulate the expression of DNA repair genes:

The expression of 18 DNA repair genes belonging to the BER or NER pathways or regulating their transcription was studied by RT-qPCR following TiO_2-NP exposure. Results show a dysregulation of six of these genes, mostly through a reduced expression that is mainly elicited at the highest exposure concentration and at 4 h and 24 h time points (Figure 3). Only two genes were affected at 10 µg/ml (*CSB* and *E2F1*).

Genes	4 h		24 h		48 h	
	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
OGG1						
APE1						
PARP1						
POLβ		0,62 ± 0,10		0,67 ± 0,15		
XRCC1						
PCNA		0,76 ± 0,14		0,58 ± 0,06		
LIG3						
POLε						
LIG1						
hHR23B						0,57 ± 0,16
XPC						
XPE (DDB1)						
XPE (DDB2)						
CSA						
CSB			0,65 ± 0,14			
BRCA1				0,71 ± 0,10		
NRF2						
E2F1		1,50 ± 0,34			0,75 ± 0,10	

Figure 3: DNA repair genes differentially expressed in TiO_2-NP exposed BEAS-2B cells. These results were obtained by RT-qPCR and are expressed in terms of fold-change versus negative controls (without NPs).

In the BER pathway, among the nine genes studied (*OGG1, APE1, PARP1, POLβ, XRCC1, PCNA, LIG3, POLε* and *LIG1*), two were dysregulated (*POLβ* and *PCNA*), both of them through a reduced expression at 4 h and 24 h (at 100 µg/ml TiO_2 NPs) (Figure 3). This suggests an impact on end-cleaning and gap-

filling steps in which POLβ is involved, as well as on DNA re-synthesis which depends on PCNA (Hegde et al., 2008; Hoeijmakers, 2001). Base excision, strand incision and ligation steps seem unaffected.

In the NER pathway 11 genes were studied (*hHR23B, XPC, XPE* (*DDB1* and *DDB2*), *CSA, CSB, PCNA, POLε, LIG1, XRCC1* and *LIG3*). Three of them were dysregulated through a reduced expression (*hHR23B, CSB* and *PCNA*) (Figure 4B). *hHR23B* was down-regulated after 48 h of exposure to 100 µg/ml, *CSB* after 24 h at 10 µg/ml and *PCNA* after 4-24 h at 100 µg/ml (Figure 3). Two out of these three genes are involved in the damage recognition and helicase activity steps: *hHR23B* in global genome NER and *CSB* in transcription-coupled NER (Fousteri and Mullenders, 2008). DNA re-synthesis also seems to be affected through the impact on *PCNA*.

Finally three transcriptional regulators of DNA repair genes were studied (*BRCA1, NRF2* and *E2F1*). Gene expression of *BRCA1* and *NRF2* was unaffected in all exposure conditions. However *E2F1* was up-regulated after 4 h at 100 µg/ml and was down-regulated after 48 h at 10 µg/ml (Figure 3). Nevertheless these results seem uncorrelated with the expression pattern of *PCNA*, which is the only known E2F1 target gene whose expression was investigated here (Polager et al., 2002).

Discussion and conclusion:

This article describes the impact of TiO_2-NP exposure on human bronchial BEAS-2B epithelial cells in terms of cell mortality, genotoxicity and expression of DNA repair genes. Results show only moderate cell mortality. However dose-dependent DNA damage was observed in all exposure conditions (10-100 µg/ml during 4, 24 or 48 h). Besides the expression of six DNA repair genes involved in the BER or NER pathways was shown to be dysregulated, mostly in a down-regulated way. This dysregulation mainly occurred at 4-24 h and at the highest TiO_2-NP concentration. DNA re-synthesis was affected in both BER and NER through repression of *PCNA*. The BER pathway was additionally affected at end-cleaning and gag-filling steps and the NER at damage recognition and helicase activity steps.

Together these results are moreover in good agreement with those previously obtained by our group in the exact same exposure conditions in carcinoma lung A549 alveolar epithelial cells (Jugan et al., 2012), which also showed moderate cell mortality, but significant induction of DNA single-strand breaks (or alkali-labile sites) and 8oxodG oxidative lesions, reduction of BER and NER DNA repair activity and global down-regulation of DNA repair gene expression (cf. Article 1). The main difference between A549 and BEAS-2B cells in terms of genotoxicity seems to be kinetics of DNA damage induction. At 100 µg/ml we here observe a time-dependent increase of DNA breaks measured by the alkaline comet assay, whereas in A549 cells the time-response curve was rather bell-shaped with a maximum at 24 h (Jugan et al., 2012). A similar bell-shaped time-response curve is noted here for 8oxodG measurements. However in A549 cells the corresponding curve was inverted with the minimum of 8oxodG induction being observed at 24 h. Besides absolute levels of 8oxodG were higher in BEAS-2B cells (reaching 30 lesions per million bases but only about 10 in A549 cells), which could be explained by the fact that *KEAP1* mutation provides A549 cells with a better antioxidant response than normal cells such as BEAS-2Bs (Singh et al., 2006). Moreover the impact of TiO_2 NPs on BER and NER DNA repair gene expression was stronger in A549 than in BEAS-2B cells (cf. Article 1). In A549 cells most of these down-regulation events also occurred after 4-24 h at 100 µg/ml. However many more genes were affected, suggesting a more global impairment of all DNA repair steps. BEAS-2B cells thus appear to be more sensitive than A549 cells to TiO_2-NP induced oxidative DNA damage but not to their

impact on DNA repair gene expression. This suggests that the observed down-regulation of DNA repair gene expression may be independent of TiO_2-NP mediated oxidative stress.

The BER is in charge of the repair of non-helix distorting lesions affecting only one DNA strand, including oxidative 8oxodG damage and single-strand breaks (Hegde et al., 2008). Therefore the induction of 8oxodG oxidative DNA lesions following TiO_2-NP exposure could be explained by the down-regulation of BER genes (POLβ and PCNA). Besides if the DNA damage detected here by the alkaline comet assay contains single-strand breaks, the repression of BER genes could also explain them.

The present results are consistent with the vast majority of studies which focused on TiO_2-NP induced cell mortality and DNA damage. Indeed most of them similarly report the induction of only moderate cell mortality (Landsiedel et al., 2014), which often reaches a maximum that rarely exceeds 30% (Chusuei et al., 2013; Ghosh et al., 2013; Jeong et al., 2013; Jugan et al., 2012; Park et al., 2014a; Pujalte et al., 2011; Saquib et al., 2012; Simon-Deckers et al., 2008; Wang et al., 2007). Besides most genotoxicity studies conducted in BEAS-2B or A549 lung epithelial cells with similar TiO_2-NP doses also observe a TiO_2-NP induced increase of DNA breaks and/or oxidative DNA damage (Falck et al., 2009; Gurr et al., 2005; Jugan et al., 2012; Kansara et al., 2014; Karlsson et al., 2008, 2009; Lan et al., 2014; Prasad et al., 2013; Srivastava et al., 2011, 2013; Toyooka et al., 2012; Ursini et al., 2014; Wang et al., 2015a). A few *in vivo* lung exposures in rats also elicited genotoxic effects (Numano et al., 2014; Zhang et al., 1998). Only one study conducted in BEAS-2B cells and three *in vivo* lung exposure studies reported an absence of genotoxicity after TiO_2-NP exposure (Lindberg et al., 2012; Naya et al., 2012; Rehn et al., 2003; Vales et al., 2014).

Very few studies addressed the influence of nanomaterials on the expression of DNA repair genes and besides ours only one other was to our knowledge conducted with TiO_2 NPs. This study also reports a down-regulation of five out of six DNA repair genes in A549 cells after 24 h at 50 µg/ml (Lan et al., 2014), which is consistent with our results. However they observe an opposite trend at 2-4 h. This discrepancy may be attributed to experimental differences such as NP type, cell culture medium or NP dispersion state, which can influence toxicity kinetics.

On the whole this study confirms the likely involvement of a down-regulation of DNA repair genes in TiO_2-NP toxicity mechanisms. It could in particular partly explain the accumulation of DNA damage in exposed cells. Besides the fact that cellular responses to TiO_2 NPs were globally similar in both A549 and BEAS-2B cells in terms of cell mortality, genotoxicity and impact on DNA repair strengthens the relevance of using either one of them as a biological model for nanotoxicity studies focused on DNA damage response mechanisms.

Acknowledgments:

This work was funded by CEA through the Toxicology research program, and via the European Commission's 7th Framework Programme project NanoMILE (Contract No. NMP4-LA-2013-310451). It is a contribution to the Labex Serenade (n° ANR-11-LABX-0064) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program of the French National Research Agency (ANR) through the A*MIDEX project (n° ANR-11-IDEX-0001-02).

Declaration of interest:

The authors report no conflict of interest.

References:

Ahlinder, L., Ekstrand-Hammarström, B., Geladi, P., and Ã–sterlund, L. (2013). Large Uptake of Titania and Iron Oxide Nanoparticles in the Nucleus of Lung Epithelial Cells as Measured by Raman Imaging and Multivariate Classification. Biophysical Journal 105, 310–319.

Baan, R.A. (2007). Carcinogenic Hazards from Inhaled Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc not Containing Asbestos or Asbestiform Fibers: Recent Evaluations by an IARC Monographs Working Group. Inhalation Toxicology 19, 213–228.

Boland, S., Hussain, S., and Baeza-Squiban, A. (2014). Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity: Carbon black and TiO2 induce different mechanisms of toxicity. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 6, 641–652.

Bruinink, A., Wang, J., and Wick, P. (2015). Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. Archives of Toxicology.

Brun, E., Barreau, F., Veronesi, G., Fayard, B., Sorieul, S., Chaneac, C., Carapito, C., Rabilloud, T., Mabondzo, A., Herlin-Boime, N., et al. (2014). Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. Particle and Fibre Toxicology 11, 13.

Chen, T., Yan, J., and Li, Y. (2014). Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. Journal of Food and Drug Analysis.

Chusuei, C.C., Wu, C.H., Mallavarapu, S., Hou, F.Y.S., Hsu, C.M., Winiarz, J.G., Aronstarn, R.S., and Huang, Y.W. (2013). Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. Chem.-Biol. Interact. 206, 319–326.

Falck, G.C.M., Lindberg, H.K., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalan, J., Savolainen, K., and Norppa, H. (2009). Genotoxic effects of nanosized and fine TiO2. Human & Experimental Toxicology 28, 339–352.

Fong, Y.W., Cattoglio, C., and Tjian, R. (2013). The Intertwined Roles of Transcription and Repair Proteins. Molecular Cell 52, 291–302.

Fousteri, M., and Mullenders, L.H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. Cell Research 18, 73–84.

Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J.L., Pouget, J.P., Tornabene, C., and Cadet, J. (2000). High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. Chem. Res. Toxicol. 13, 1002–1010.

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

Ghosh, M., Chakraborty, A., and Mukherjee, A. (2013). Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. Journal of Applied Toxicology n/a – n/a.

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

Hegde, M.L., Hazra, T.K., and Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. Cell Res. 18, 27–47.

Hoeijmakers, J.H.J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411, 366–374.

Huang, S., Chueh, P.J., Lin, Y.-W., Shih, T.-S., and 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.

Jeong, M., Park, J.M., Lee, E.J., Cho, Y.S., Lee, C., Kim, J.M., and Half, S.S. (2013). Cytotoxicity of Ultra-pure TiO2 and ZnO Nanoparticles Generated by Laser Ablation. Bull. Korean Chem. Soc. 34, 3301–3306.

Johnston, H., Hutchison, G., Christensen, F., Peters, S., Hankin, S., and Stone, V. (2009). Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO2 particulates: the contribution of physicochemical characteristics. Particle and Fibre Toxicology C7 - 33 6, 1–27.

Jugan, M.-L., Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., and Carriere, M. (2012). Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. Nanotoxicology 6, 501–513.

Kansara, K., Patel, P., Shah, D., Shukla, R.K., Singh, S., Kumar, A., and Dhawan, A. (2014). TiO2 nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells: DNA Double Strand Breaks and Cell Cycle Arrest. Environmental and Molecular Mutagenesis n/a – n/a.

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

Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P., and Moller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. Toxicology Letters 188, 112–118.

Kermanizadeh, A., Chauché, C., Brown, D.M., Loft, S., and Møller, P. (2014). The role of intracellular redox imbalance in nanomaterial induced cellular damage and genotoxicity: A review: NM Induced Redox Status Imbalance and Genotoxicity. Environmental and Molecular Mutagenesis n/a – n/a.

Lan, J., Gou, N., Gao, C., He, M., and Gu, A.Z. (2014). Comparative and Mechanistic Genotoxicity Assessment of Nanomaterials via a Quantitative Toxicogenomics Approach across Multiple Species. Environ. Sci. Technol. 48, 12937–12945.

Landsiedel, R., Sauer, U.G., Ma-Hock, L., Schnekenburger, J., and Wiemann, M. (2014). Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. Nanomedicine (Lond) 9, 2557–2585.

Li, N., Ma, L., Wang, J., Zheng, L., Liu, J., Duan, Y., Liu, H., Zhao, X., Wang, S., Wang, H., et al. (2010). Interaction Between Nano-Anatase TiO2 and Liver DNA from Mice In Vivo. Nanoscale Research Letters 5, 108–115.

Lindberg, H.K., Falck, G.C.-M., Catalán, J., Koivisto, A.J., Suhonen, S., Järventaus, H., Rossi, E.M., Nykäsenoja, H., Peltonen, Y., Moreno, C., et al. (2012). Genotoxicity of inhaled nanosized TiO(2) in mice. Mutat. Res. 745, 58–64.

Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., and Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. Nanotoxicology 8, 233–278.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63.

Naya, M., Kobayashi, N., Ema, M., Kasamoto, S., Fukumuro, M., Takami, S., Nakajima, M., Hayashi, M., and Nakanishi, J. (2012). In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. Regul. Toxicol. Pharmacol. 62, 1–6.

Numano, T., Xu, J.G., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D.B., Furukawa, F., Kanno, J., Hirose, A., Tsuda, H., and Suzui, M. (2014). Comparative Study of Toxic Effects of Anatase and Rutile Type Nanosized Titanium Dioxide Particles in vivo and in vitro. Asian Pac. J. Cancer Prev. 15, 929–935.

Ostling, O., and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123, 291–298.

Park, E.-J., Lee, S.Y., Lee, G.-H., Kim, D.-W., Kim, Y., Cho, M.-H., and Kim, J.-H. (2014). Sheet-type titania, but not P25, induced paraptosis accompanying apoptosis in murine alveolar macrophage cells. Toxicol. Lett. 230, 69–79.

Petersen, E.J., and Nelson, B.C. (2010). Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. Anal. Bioanal. Chem. 398, 613–650.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, 6.

Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 26, 509–515.

Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. Oncogene 21, 437–446.

Prasad, R.Y., Wallace, K., Daniel, K.M., Tennant, A.H., Zucker, R.M., Strickland, J., Dreher, K., Kligerman, A.D., Blackman, C.F., and DeMarini, D.M. (2013). Effect of Treatment Media on the Agglomeration of Titanium Dioxide Nanoparticles: Impact on Genotoxicity, Cellular Interaction, and Cell Cycle. Acs Nano.

Pujalte, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Treguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtes, C., and L'Azou, B. (2011). Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. Particle and Fibre Toxicology 8.

Rehn, B., Seiler, F., Rehn, S., Bruch, J., and Maier, M. (2003). Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. Toxicol. Appl. Pharmacol. 189, 84–95.

Saquib, Q., Al-Khedhairy, A.A., Siddiqui, M.A., Abou-Tarboush, F.M., Azam, A., and Musarrat, J. (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. Toxicology in Vitro 26, 351–361.

Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., and Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and Fibre Toxicology 10, 15.

Shukla, R.K., Sharma, V., Pandey, A.K., Singh, S., Sultana, S., and Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicology in Vitro 25, 231–241.

Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., and Carriere, M. (2008). In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. Toxicology 253, 137–146.

Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R.K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M.O., Herman, J.G., Baylin, S.B., Sidransky, D., Gabrielson, E., et al. (2006). Dysfunctional KEAP1–NRF2 Interaction in Non-Small-Cell Lung Cancer. PLoS Medicine 3, e420.

Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., and Novak, S. (2011). Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? Radiol. Oncol. 45, 227–247.

Srivastava, R.K., Rahman, Q., Kashyap, M.P., Lohani, M., and Pant, A.B. (2011). Ameliorative effects of dimetylthiourea and N-acetylcysteine on nanoparticles induced cyto-genotoxicity in human lung cancer cells-A549. PLoS ONE 6, e25767.

Srivastava, R.K., Rahman, Q., Kashyap, M.P., Singh, A.K., Jain, G., Jahan, S., Lohani, M., Lantow, M., and Pant, A.B. (2013). Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. Human & Experimental Toxicology 32, 153–166.

Tilton, S.C., Karin, N., Tolic, A., xie, Y., Lai, X., Hamilton, R.F., Waters, K., Holian, A., Witzmann, F.A., and Orr, G. (2014). Three human cell types respond to multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanobelts with cell-specific transcriptomic and proteomic expression patterns. Nanotoxicology 0, 1–40.

Toyooka, T., Amano, T., and Ibuki, Y. (2012). Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 742, 84–91.

Ursini, C.L., Cavallo, D., Fresegna, A.M., Ciervo, A., Maiello, R., Tassone, P., Buresti, G., Casciardi, S., and Iavicoli, S. (2014). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory response in human alveolar and bronchial epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles: Cyto-genotoxicity and inflammation by TiO2 NPs in respiratory cells. Journal of Applied Toxicology n/a – n/a.

Vales, G., Rubio, L., and Marcos, R. (2014). Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. Nanotoxicology 1–11.

Wang, J.J., Sanderson, B.J.S., and Wang, H. (2007). Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 628, 99–106.

Wang, Y., Cui, H., Zhou, J., Li, F., Wang, J., Chen, M., and Liu, Q. (2015). Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. Environmental Science and Pollution Research.

Zhang, Q., Kusaka, Y., Sato, K., Nakakuki, K., Kohyama, N., and Donaldson, K. (1998). Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. J. Toxicol. Environ. Health Part A 53, 423–438.

Résultats et discussion complémentaires à l'article 3

En complément des résultats présentés dans l'article 3, une étude de l'état de dispersion des NP de TiO_2 a été menée dans les surnageants des cellules A549 et BEAS-2B. Les cellules ont été exposées à 0 (« T- ») ou 100 µg/mL (« 100 ») de NP de TiO_2 pendant 4, 24 ou 48 h, dans du milieu de culture sans sérum, puis le surnageant d'exposition a été récolté pour être immédiatement analysé par DLS. Avant la mesure, 100 µg/mL de NP de TiO_2 ont été ajoutés aux surnageants T-. Les analyses DLS ont été réalisées en assimilant les paramètres du milieu d'exposition à ceux de l'eau.

On observe que quelle que soit la durée de l'exposition et la lignée cellulaire, les surnageants T- présentent des diamètres particulaires en nombre plus élevés et des indices de polydispersité (PDI) plus faibles que ceux des cellules exposées (Figure 40). Les diamètres T- sont compris entre 500 et 700 nm chez A549 et 800-900 nm chez BEAS-2B, pour des PDI de 0,2-0,3, tandis que dans les surnageants 100, les diamètres sont de 350-100 chez A549 et de 600-100 chez BEAS-2B, pour des PDI de 0,5-1,0.

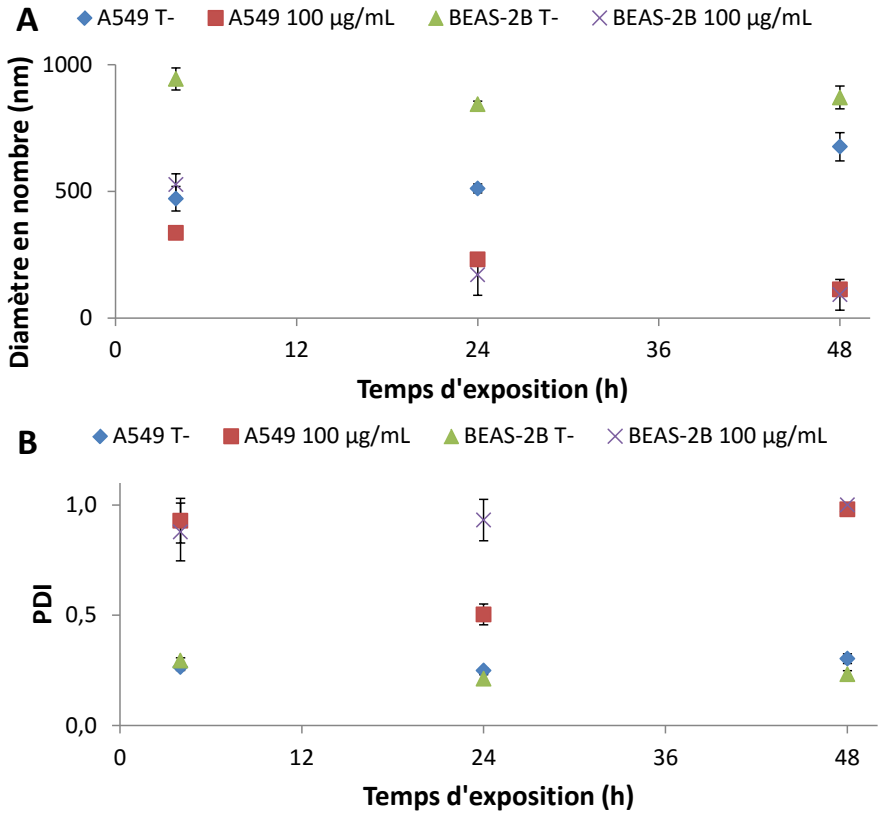


Figure 40 : Diamètre hydrodynamique en nombre et PDI dans les surnageants de cellules A549 et BEAS-2B exposées à 0 (T-) ou 100 µg/mL de NP de TiO_2. 100 µg/mL de NP de TiO_2 ont été ajoutés aux surnageants T- préalablement aux mesures. « PDI » : indice de polydispersité.

Dans les surnageants 100, le diamètre semble décroître avec le temps d'exposition. Cependant les valeurs élevées des PDI associés impliquent une forte incertitude sur les mesures de taille particulaire. Il convient donc de rester prudent dans l'interprétation de ces tendances. La forte polydispersité observée dans ces échantillons pourrait être due à la présence de débris cellulaires. Ces débris pourraient résulter de la cytotoxicité des NP de TiO_2 envers les cellules. Cela expliquerait que le PDI soit plus faible dans les surnageants T-.

Les différences d'état de dispersion observées entre les surnageant T- et 100 pourraient également être le résultat de l'internalisation d'une partie des NP dans les cellules. De nombreuses études ont en effet montré que ces NP pénètrent majoritairement par endocytose et s'accumulent principalement dans le cytoplasme, sous la forme de vésicules cytoplasmiques ou sous forme libre (Bruinink et al., 2015; Simon-Deckers et al., 2008). Les plus gros agrégats/agglomérats pourraient donc ici avoir été endocytés, ce qui expliquerait la présence de particules de diamètre plus élevé dans les T- par rapport aux 100.

D'une manière générale, les tendances observées ici sont les mêmes chez A549 et BEAS-2B, ce qui rejoint les conclusions de l'article 3. Les légères différences d'état de dispersion des NP dans les surnageants des deux lignées se retrouvent principalement au niveau du diamètre des NP dans les surnageants T-. Ces différences pourraient être dues au fait que les cellules A549 sécrètent du surfactant alvéolaire et potentiellement du mucus, dont elles expriment les gènes, alors que les cellules BEAS-2B ne sécrètent ni l'un ni l'autre (BéruBé et al., 2009). Les sécrétions des cellules A549 pourraient favoriser la dispersion des NP. Cela expliquerait l'observation de diamètres plus faibles dans les surnageants T- A549 comparés aux T- BEAS-2B.

Les résultats obtenus ici sont à comparer avec la mesure décrite dans les différents articles de cette étude, qui indique que dans du milieu d'exposition stérile n'ayant jamais été en contact avec les cellules, les NP de TiO_2 présentent un diamètre en nombre de 720 ± 20 nm et un PDI de 0,5 ± 0,02. Encore une fois, les sécrétions des cellules A549 pourraient expliquer le fait que le diamètre des surnageants T- soit inférieur à cette valeur, alors qu'il est supérieur chez BEAS-2B. On observe par ailleurs un PDI plus important dans le milieu d'exposition stérile que dans les surnageants T-. Cette différence est probablement due à des modifications de la composition de ce milieu induites par les cellules, en termes de protéines par exemple.

Conclusion sur les résultats complémentaires à l'article 3

Ces résultats complémentaires montrent que l'état de dispersion des NP de TiO_2 dans le milieu d'exposition est modifié au contact des cellules. Cette modification se traduit par une diminution apparente du diamètre hydrodynamique en nombre, mais une augmentation de la polydispersité (PDI). Cette dernière pourrait être due à la présence de débris cellulaires dans le surnageant des cellules exposées, résultant de la cytotoxicité des NP envers les cellules. Cette hypothèse est renforcée par le fait que lorsque l'on introduit des NP dans le surnageant de cellules non-exposées (T-), le PDI est plus faible. En revanche ce PDI dans les surnageants T- est plus faible que dans du milieu d'exposition stérile.

Les principales différences observées entre les surnageants des lignées A549 et BEAS-2B se traduisent par un diamètre en nombre plus important chez BEAS-2B que chez A549, ce qui pourrait être lié à la sécrétion par les cellules A549 de surfactant alvéolaire et potentiellement de mucus. Cependant, outre ces légères différences de diamètre, les tendances observées restent les mêmes dans les deux lignées, ce qui rejoint les conclusions de l'article 3.

Discussion générale et perspectives :

I. Discussion méthodologique

Cette thèse étudie les mécanismes d'impact des NP de TiO_2 Aeroxide® P25 (Evonik) sur la réparation de l'ADN, avec pour modèle biologique principal la lignée cellulaire alvéolaire A549. Le choix d'une seule référence de NP de TiO_2 et de cette référence en particulier est fondé sur plusieurs éléments. Tout d'abord, d'après une étude réalisée antérieurement au laboratoire, les NP de TiO_2 induisent une chute des capacités cellulaires de réparation de l'ADN tant par la voie BER que NER, quels que soient les paramètres de taille, de forme et de structure cristalline (rutile/anatase) de ces NP (Jugan et al., 2012). La décision dans le cadre de notre étude de nous limiter à une seule de ces NP a permis d'analyser plus en profondeur les mécanismes de toxicité, en réalisant des expériences plus diversifiées que si nous avions conservé l'ensemble des cinq références employées précédemment. Nous avons ici choisi de nous focaliser sur les TiO_2 P25, dans la mesure où ces NP sont largement utilisées à la fois dans les processus photocatalytiques industriels (Ohno et al., 2001) et dans les études de nanotoxicologie (Shi et al., 2013). L'étude de leurs mécanismes de toxicité présente donc un intérêt en termes de santé publique et de santé au travail. De plus le fait qu'elles fassent partie des NP de référence du JRC (sous la référence NM-105) et qu'elles soient employées dans de nombreuses études de nanotoxicologie renforce l'impact de nos travaux, qui pourront plus facilement être comparés à ceux des autres équipes que si nous avions utilisé de nouvelles NPs.

Comme expliqué dans les différents articles, le choix de la lignée cellulaire alvéolaire A549 découle du fait que le compartiment alvéolaire est la zone du tractus respiratoire la plus touchée par le dépôt et l'accumulation de nanomatériaux (Geiser and Kreyling, 2010; Paur et al., 2011). La pertinence de la sélection de cette lignée comme modèle représentatif des cellules pulmonaires humaines est renforcée par nos observations, qui montrent que les effets des NP de TiO_2 observés avec ces cellules sont très proches de ceux constatés avec la lignée épithéliale bronchique BEAS-2B, en termes de cytotoxicité, génotoxicité et expression des gènes de réparation de l'ADN, mais aussi d'état de dispersion des NP de TiO_2 dans le surnageant d'exposition. L'idéal serait de valider les résultats sur des cellules alvéolaires primaires. Cependant la culture de cellules primaire implique l'utilisation de sérum ou de mélanges protéiques équivalents dans les milieux de culture et d'exposition, ce qui peut radicalement modifier l'internalisation et la toxicité cellulaire des NP (Tedja et al., 2012). En outre l'utilisation de sérum parait inadéquate dans le cadre de modèles d'épithélium pulmonaire, dans la mesure où les NPs inhalées ne rentrent en contact avec la circulation sanguine qu'après interaction avec les cellules épithéliales. Certes le surfactant pulmonaire, avec lequel les NP entrent en contact avant de pénétrer dans les cellules alvéolaires, contient des protéines, mais il est surtout composé de lipides (Chroneos et al., 2010). L'usage de sérum pourrait éventuellement modéliser l'interaction des NP avec les protéines du mucus et du surfactant pulmonaires, mais la composition protéique de ces fluides est différente de celle du sérum. La couronne protéique formée autour des NP après incubation dans du sérum n'est donc pas représentative de l'état de surface des nanomatériaux susceptibles d'interagir avec les cellules alvéolaires ou bronchiques. Même si nos résultats et ceux d'autres équipes (Oya et al., 2003) montrent que l'absence de sérum dans les milieux de culture engendre une baisse de la prolifération cellulaire, l'utilisation d'un témoin non-exposé pour chaque temps d'exposition permet de s'affranchir des conséquences de cet effet.

Le protocole de dispersion des NP de TiO_2 utilisé ici réduit l'agglomération des NP, dans l'eau, mais aussi dans le milieu d'exposition. En effet le diamètre hydrodynamique après dilution dans le milieu

d'exposition, i.e. du DMEM sans sérum, est ici de 720 ± 20 nm avec un PDI de 0,5 ± 0,02. Sans sonication préalable, ce diamètre est, à 100 µg/mL, supérieur à 1 µm (Ji et al., 2010). Notre protocole de dispersion permet donc de diminuer l'écart de taille des NP observé entre un milieu sans et avec sérum, ce dernier conduisant dans le DMEM à des diamètres hydrodynamiques de l'ordre de 300 nm. Dans notre modèle, l'état d'agglomération constaté laisse supposer que la (macro)pinocytose pourrait jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes d'internalisation des NP (Bruinink et al., 2015). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les NP internalisées s'accumulent dans le cytoplasme principalement sous la forme de vésicules cytoplasmiques, pouvant résulter d'un processus d'endocytose (Simon-Deckers et al., 2008). Cependant, l'observation de quelques NP sous forme libre dans le cytoplasme suggère tout de même l'existence d'autres mécanismes d'internalisation, comme par exemple la diffusion à travers les membranes (Bruinink et al., 2015).

Les doses de NP de TiO_2 utilisées dans le cadre de cette étude correspondent au minium à environ 24 h d'exposition à un aérosol de 1 mg/m^3 (Gangwal et al., 2011), soit une concentration située entre les valeurs limites d'exposition recommandées pour les NP de TiO_2 par le NIOSH et le NEDO. La dose maximale employée ici, i.e. 48 h à 100 µg/mL, soit 17 µg/cm², se rapproche du dépôt alvéolaire obtenu après une carrière professionnelle complète effectuée dans un environnement contenant 1 mg/m^3 de NP de TiO_2. Ces doses d'exposition élevées sont justifiées par le but mécanistique de l'étude. Les effets et mécanismes de toxicité pouvant différer selon la dose, c'est la raison pour laquelle nous avons tenu à inclure dans nos plans d'expériences aussi souvent que possible différentes concentrations d'exposition, allant de 1 à 100 µg/mL. Cependant pour étudier de manière plus pertinente la toxicité des NP à faibles doses, il est préférable de mener des études sur des temps supérieurs à 48 h, ce qui implique *in vitro* l'utilisation de sérum dans les milieux d'exposition. De telles approches ont été développées au laboratoire en parallèle de mes travaux de thèse (Annexe 1) (Armand et al., 2015, 2016).

II. Discussion générale des résultats et perspectives

L'article 1 suggère que la chute de l'activité de réparation de l'ADN entraînée par les NP de TiO_2 est due à une diminution conséquente de l'expression des gènes et de la quantité de protéines de réparation de l'ADN dans les cellules. Cependant, cette étude semble globalement montrer que cet impact est médié non-pas par la forte dérégulation d'un type précis de régulateurs amont, mais plutôt par de faibles effets sur une myriade de facteurs. Cette constatation s'illustre au niveau du phosphoprotéome, avec la fine dérégulation de quelques protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires, mais aucun effet d'ensemble. Et elle s'illustre également au niveau des autres régulateurs de la réparation de l'ADN, i.e. méthylation des promoteurs des gènes, activité du protéasome et expression de régulateurs transcriptionnels. Ce profil de toxicité laisse penser que les mécanismes à l'origine de l'impact des NP de TiO_2 sur la réparation de l'ADN pourraient être dus à une combinaison d'interactions spécifiques entre les NP et des cibles cellulaires, à l'image de certains xénobiotiques moléculaires, et d'effets physico-chimiques aspécifiques comme la génération d'espèces réactives de l'oxygène, susceptibles d'altérer l'intégrité de l'ensemble des composants cellulaires. La fine caractérisation des interactions surfaciques entre les NP de TiO_2 et les composants cellulaires semble donc être la clé de la compréhension des mécanismes de toxicité associés.

Comme mentionné précédemment, la baisse des capacités cellulaires de réparation de l'ADN pourrait être liée à une séquestration des protéines de réparation hors du noyau et en particulier à la surface des NP dans le cytoplasme. Nous participons actuellement à l'étude de cette hypothèse, en

collaboration avec d'autres laboratoires du CEA. La démarche, les objectifs et les partenaires de ce projet sont présentés en Annexe 2. Des NP de TiO_2 P25 ont été incubées dans des extraits protéiques totaux de cellules A549 obtenus dans notre laboratoire, puis la couronne protéique ainsi formée autour des NP a été analysée par protéomique shotgun. Les premiers résultats montrent la présence dans cette couronne de nombreuses protéines de réparation, dont PARP1, MSH6, MSH2, FANCI, APEX1, PAR14, RAD21, PARP2, ERCC2, PARG, FANCD2, ERCC3, RAD17 et PMS2, ce qui tendrait à confirmer l'hypothèse de la séquestration. Un des objectifs est de comparer ces données à celles obtenues dans le cadre de notre analyse phosphoprotéomique, afin de caractériser le rôle de la phosphorylation dans l'adsorption des protéines et l'impact fonctionnel pouvant en découler.

Plus généralement, existe-t-il un déterminant structural responsable de l'adsorption ou de la dérégulation du niveau de phosphorylation des protéines après exposition aux NP de TiO_2 ? Quelle est la nature des interactions surfaciques ayant lieu à l'interface NP-milieu cellulaire ? Pour répondre à ces questions, il est intéressant de comparer ces NP et leurs effets biologiques à ceux d'autres NP de composition et de structure proches. La solubilité dans l'eau et le relargage d'ions ayant été identifiés comme des déterminants majeurs de la toxicité des NP (Landsiedel et al., 2014), il convient de rapprocher en priorité les NP de TiO_2 des NP d'autres oxydes métalliques peu solubles en milieu aqueux, comme par exemple SiO_2, CeO_2 ou ZrO_2. Zr étant situé immédiatement en-dessous de Ti dans la classification périodique des éléments, TiO_2 et ZrO_2 présentent une grande proximité chimique qui s'illustre dans leur réactivité, malgré des structures cristallines différentes (Gupta and Tripathi, 2011; Moulin et al., 2008; Di Paola et al., 2013). A l'image du TiO_2, ZrO_2 a notamment une grande affinité pour les phosphates et est utilisé similairement pour la purification des phosphopeptides (Zhou et al., 2007). ZrO_2 est aussi employé, seul ou en combinaison avec TiO_2, pour des applications de (photo)catalyse et les deux oxydes sont des semiconducteurs de type n (Botta et al., 1999; Reddy and Khan, 2005; Yamaguchi, 1994). SiO_2 et CeO_2 sont également proches du TiO_2 sur le plan chimique, notamment en termes de groupements de surface. Cependant ces divers oxydes métalliques possèdent tout de même des différences d'affinité, notamment envers les phosphates. Aucune information n'a été trouvée dans la littérature concernant l'affinité du SiO_2 pour les phosphates, ce qui laisse penser qu'elle doit être faible. Quant au CeO_2, des études en conditions acellulaires ont montré que ces NP pouvaient exercer une activité de clivage des groupements phosphates, par exemple sur l'ATP, mais pas sur l'ADN (Yokel et al., 2014). En revanche cette activité étant diminuée en présence d'ions phosphates, il est probable qu'elle soit inhibée en conditions physiologiques. La question se pose donc de savoir si des NP comme celles de SiO_2, CeO_2 ou ZrO_2 peuvent avoir un impact similaire à celles de TiO_2 sur la réparation de l'ADN. Une réponse affirmative suggèrerait l'indépendance de cet impact vis-à-vis de l'affinité du TiO_2 pour les phosphates. L'idéal serait de comparer précisément selon un même protocole expérimental l'affinité de ces différents types de surfaces pour les phosphates, afin de confirmer les différences supputées.

Lorsque l'on compare le nombre d'études portant sur la toxicité des nanomatériaux, on constate que ceux de TiO_2 et SiO_2 (respectivement 3 148 et 3 107 études) sont beaucoup plus étudiés que ceux de CeO_2 et ZrO_2 (respectivement 589 et 102 études)[15]. Cette tendance reflète globalement les différences en termes de masse annuelle produite et utilisée dans le monde, du moins en ce qui concerne le TiO_2,

[15] Comparaison effectuée à l'aide de la base de données Web of Science™ (Thomson Reuters), le 30 juillet 2015, selon l'équation : nano* AND tox* AND (tio2 OR titania OR "titanium oxide" OR "titanium dioxide") / (sio2 OR silica OR "silicon oxide" OR "silicon dioxide" OR quartz OR sand) / (ceo2 OR ceria OR cerium) / (ZrO2 OR "zirconium oxide" OR "zirconia" OR "zirconium dioxide").

SiO_2 et CeO_2 (Piccinno et al., 2012), aucune donnée chiffrée n'ayant été trouvée en comparaison pour le ZrO_2. D'une manière générale, les mécanismes cellulaires de toxicité de ces différents oxydes métalliques peu hydrosolubles sont relativement similaires. Ils dépendent bien entendu des conditions expérimentales, i.e. des doses, modèles biologiques, caractéristiques précises des NP, etc. Cependant lorsque l'on compare les doses minimales requises pour l'observation d'effets toxiques, on remarque que ces différentes NP sont bien moins néfastes que les NP d'oxydes métalliques solubles telles que les NP de ZnO, de cuivre ou d'argent (Cho et al., 2013; Horie et al., 2009; Lanone et al., 2009; Sauer et al., 2014). En termes qualitatifs, on note pour les NP de SiO_2 et CeO_2 l'induction de stress oxydant via la production d'espèces réactives de l'oxygène, la peroxydation de lipides, la déstabilisation de membranes cellulaires, la réduction des taux de glutathion et l'activation de voies de signalisation cellulaire de réponses antioxydantes comme la voie NRF2 (Napierska et al., 2010; Yokel et al., 2014). Les NP de CeO_2 se démarquent par des mécanismes et une réactivité spécifiques. En effet ces NP, selon la manière dont elles ont été synthétisées, peuvent présenter un profil pro- ou antioxydant (Yokel et al., 2014), en fonction notamment du rapport entre ions Ce^{3+} et Ce^{4+} en surface. Les NP de SiO_2 et CeO_2 peuvent également induire des phénomènes inflammatoires, illustrés *in vitro* via par exemple l'activation de la voie NF-κB et la sécrétion de cytokines inflammatoires, ou *in vivo* par l'apparition d'inflammations pulmonaires après exposition par voie aérienne (Cho et al., 2010, 2013; Kim et al., 2014; Napierska et al., 2010; Veranth et al., 2007; Yokel et al., 2014). Les études *in vitro* montrent une internalisation des NP de SiO_2 et CeO_2 dans les cellules et leur accumulation dans divers compartiments cellulaires, i.e. le cytoplasme majoritairement, mais aussi parfois dans le noyau (Napierska et al., 2010; Singh et al., 2010; Zhou et al., 2015). Ces NP peuvent induire des dommages à l'ADN. Une revue récente de la littérature portant sur la génotoxicité des NP d'oxydes métalliques conclut en une majorité de résultats positifs pour les NP de CeO_2 (7 résultats positifs et 2 négatifs sur un total de 7 études) et en une majorité de résultats négatifs pour les NP de SiO_2 (7 résultats positifs et 14 négatifs sur un total de 18 études) (Golbamaki Bakhtyari et al., 2015). La génotoxicité engendrée par les NP de CeO_2 peut se traduire par l'induction de bases oxydées de type 8oxodG (Yokel et al., 2014) ou encore de dommages chromosomiques (Golbamaki Bakhtyari et al., 2015) et elle apparait parfois à des concentrations inférieures de 2 à 3 ordres de grandeur à la concentration minimale à partir de laquelle une mort cellulaire est observée (Yokel et al., 2014). Concernant les NP de ZrO_2, une seule étude rapporte des résultats de tests de génotoxicité, i.e. test des comètes, et ceux-ci sont négatifs (Demir et al., 2013; Golbamaki Bakhtyari et al., 2015). Les NP de SiO_2 et CeO_2 peuvent en outre toutes deux induire de l'apoptose (Napierska et al., 2010; Yokel et al., 2014).

En termes de couronne protéique, une étude a trouvé une composition protéique très proche autour de NP de TiO_2 et de SiO_2 après incubation dans du plasma, alors que les protéines adsorbées sur les NP de ZnO étaient de nature différente (Deng et al., 2009). En plus de l'adsorption de protéines sériques, une adsorption d'ions Ca^{2+} en provenance du milieu de culture DMEM a par ailleurs été observée sur les NP de TiO_2, CeO_2 et SiO_2 (Horie et al., 2009). L'adsorption de ces protéines et ions par les NP de TiO_2 et CeO_2, sur lesquelles l'adsorption était quantitativement la plus forte, entraine une chute de la viabilité et de la prolifération cellulaire, notamment sur des cellules A549, lorsque celles-ci sont mises en culture dans le milieu dépourvu des composés adsorbés. Parmi les protéines du sérum, les NP de CeO_2 forment des complexes plus stables avec les immunoglobulines qu'avec l'albumine, bien que celle-ci soit présente en plus forte concentration (Liu et al., 2013). Il a été montré en outre que l'adsorption d'albumine de sérum bovin sur le ZrO_2 pouvait être réduite de plus de 50% par une pré-incubation de ce matériau en présence d'ions phosphates (Putman et al., 1997), envers lesquels il est

rappelons-le très affin (Zhou et al., 2007). Malheureusement, aucune étude n'a à ce jour étudié la composition de la couronne protéique des NP de SiO_2, CeO_2 et ZrO_2 en milieu cellulaire, c'est-à-dire dans des extraits protéiques cellulaires ou après extraction des NP issues de cellules exposées. Les études se concentrent principalement sur la couronne formée après incubation dans du sérum. La compréhension des interactions surfaciques entre les NP et les milieux cellulaires pourrait également grandement bénéficier d'une caractérisation précise de l'affinité de ces différents matériaux pour les groupements chimiques présents abondamment en milieu physiologique. Bien que jusqu'ici notre attention se soit principalement portée sur les phosphates, il serait intéressant d'étudier l'interaction des NP avec les acétylations, glycosylations, lipides, etc.

De même on déplore le fait que les effets des nanomatériaux, et des NP de SiO_2, CeO_2 et ZrO_2 en particulier, sur la réparation de l'ADN ont pour l'instant été très peu étudiés. Seule une étude montre que les NP de SiO_2 entraînent, à l'image des NP de TiO_2 étudiées ici, une hyperméthylation du promoteur de PARP1, ainsi que la répression du gène correspondant (Gong et al., 2012). Ce niveau de preuve reste très insuffisant pour conclure quant à l'effet de ces NP sur la réparation de l'ADN.

Pour approfondir notre compréhension des mécanismes d'impact des NP de TiO_2 sur la réparation de l'ADN, l'emploi d'inhibiteurs ou d'activateurs de régulateurs de la réparation pourrait s'avérer intéressante. Les cellules pourraient en premier lieu être exposées aux NP en présence d'antioxydants. Cette approche a déjà été utilisée pour montrer le rôle du stress oxydant dans divers effets toxiques, i.e. inflammation, dommages à l'ADN, etc. (Abdelazim et al., 2015; Azim et al., 2015; Abu-Dief et al., 2015; El-Zahed et al., 2015; González-Esquivel et al., 2015; Al-Rasheed et al., 2013). Il serait ainsi possible d'évaluer précisément le rôle du stress oxydant dans l'altération des capacités cellulaires à réparer l'ADN. Si en présence d'antioxydants les NP n'induisent plus de dommages à l'ADN mais continuent d'altérer la réparation, en termes d'activité, d'expression des gènes ou de concentration protéique cellulaire, cela confirmerait l'indépendance de cette altération vis-à-vis des dommages génotoxiques et son lien avec une voie mécanistique de toxicité plus spécifique. En supposant que les antioxydants employés suppriment toute induction significative d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules, si l'impact sur la réparation de l'ADN persiste, cela suggèrerait son indépendance vis-à-vis d'une éventuelle dégradation des protéines de réparation par oxydation.

Selon cette même approche, il pourrait être intéressant d'exposer les cellules aux NP de TiO_2 en présence d'inhibiteurs du protéasome (MG132 par exemple), d'inhibiteurs des méthyltransférases à ADN ou encore d'activateurs des chaperones. Cela fournirait des informations sur le rôle de la dégradation protéasomale dans la chute des quantités cellulaires de protéines de réparation de l'ADN, l'impact de la méthylation des promoteurs de gènes de réparation dans la répression des gènes correspondant et sur le rôle des dégradations conformationnelles dans la chute de l'activité de réparation de l'ADN. De manière plus ciblée, il serait également possible de stimuler ou de réprimer l'expression de certains gènes ou l'activité de certaines protéines régulatrices de la réparation de l'ADN, afin de finement caractériser les mécanismes biologiques menant à la perturbation de la réparation par les NP. Une stimulation de la réparation de l'ADN permettrait par exemple d'évaluer l'importance de la réparation de l'ADN dans l'évolution du niveau de dommages génotoxiques en présence de NP. Bien entendu ce type d'études nécessiterait l'emploi de nombreux contrôles, notamment sans NP, car l'utilisation de tels inhibiteurs ou activateurs serait susceptible d'impacter de nombreux processus cellulaires et de se répercuter sur la réparation de l'ADN sans que cela ait un lien avec les NP.

Enfin cette toxicité des NP de TiO_2 qui se traduit par la perturbation de la réparation de l'ADN pourrait être utilisée au bénéfice de la santé humaine. Il a déjà été mentionné que les NP de TiO_2 font partie des NP étudiées à l'heure actuelle pour des applications de traitement du cancer (Fei Yin et al., 2013). Pour l'instant ces études sont principalement motivées par les propriétés de photocatalyse de ces NP, qui pourraient permettre, en combinaison avec une irradiation ciblée des tumeurs, d'éliminer les cellules cancéreuses en déclenchant en leur sein un fort stress oxydant. Or la chute de l'activité de réparation de l'ADN induite par les NP de TiO_2 pourrait accentuer et faciliter la destruction de ces cellules cancéreuses. Le couplage de ces NP avec des anticorps capables de cibler précisément les cellules à détruire augmenterait la spécificité de ce traitement. Naturellement, de nombreuses études complémentaires seraient nécessaires avant d'envisager effectuer de tels tests chez l'homme, mais ces applications n'en restent pas moins prometteuses.

Conclusion :

Cette étude porte sur les mécanismes d'impact des NP de TiO_2 sur la réparation de l'ADN dans des cellules alvéolaires pulmonaires, en condition d'exposition *in vitro* submergée, dans du milieu de culture sans sérum et à des doses de 1-100 µg/mL pendant 4-48 h. Les résultats obtenus sont résumés dans la Figure 41. Ils montrent que les NP de TiO_2 induisent une répression globale des gènes et des protéines de réparation de l'ADN, qui pourrait être liée à la répression de régulateurs transcriptionnels, ainsi qu'à l'augmentation de l'activité caspase du protéasome et de la méthylation des promoteurs de certains gènes de réparation. La même tendance de répression des gènes de réparation de l'ADN est en outre observée dans la lignée épithéliale bronchique BEAS-2B.

On observe également que ces NP perturbent le phosphoprotéome cellulaire. Cette perturbation, invisible à l'échelle du phosphoprotéome entier, se traduit par une fine dérégulation du niveau de phosphorylation de nombreuses protéines et sites de phosphorylation intervenant dans divers processus cellulaires. Dans l'ensemble ces processus reflètent les effets des NP de TiO_2 rapportés dans la littérature. L'interférence des NP de TiO_2 avec les modifications post-traductionnelles par phosphorylation pourrait donc constituer un nouveau mécanisme explicatif de la toxicité de ces NP. Même si la réparation de l'ADN ne fait pas partie des principales fonctions cellulaires impactées par la perturbation du phosphoprotéome, quelques protéines impliquées dans la réparation subissent néanmoins une dérégulation de leur niveau de phosphorylation. La perturbation du cycle cellulaire et de la régulation de l'apoptose pourrait également indirectement impacter la réparation de l'ADN.

Dans l'ensemble, ces données apportent de nouvelles pistes d'explication des mécanismes de toxicité des NP de TiO_2, qui pourraient notamment expliquer la chute précédemment observée des capacités cellulaires de réparation de l'ADN. Enfin cette étude enrichit la littérature sur le plan méthodologique, en présentant une approche originale pour l'étude du niveau de phosphorylation à la fois des protéines et des sites de phosphorylation, qui pourrait être appliquée dans d'autres études de toxicologie. Par ailleurs l'observation d'un profil toxicologique similaire dans les cellules A549 et BEAS-2B après exposition aux NP de TiO_2, du point de vue de l'état de dispersion des NP dans le surnageant d'exposition, de la cyto/géno-toxicité et de l'expression des gènes de réparation de l'ADN, renforce la pertinence de l'utilisation de l'une ou l'autre de ces lignées dans le cadre de l'étude des mécanismes de génotoxicité des nanomatériaux.

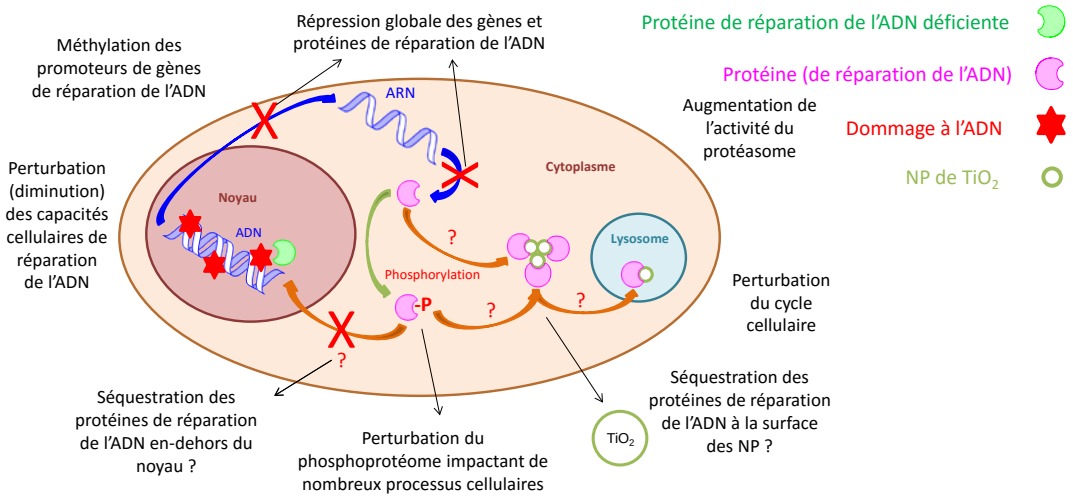


Figure 41 : Représentation schématique des principales conclusions de cette étude et hypothèses demeurant en suspens.

Références :

Abdelazim, S.A., Darwish, H.A., Ali, S.A., Rizk, M.Z., and Kadry, M.O. (2015). Potential Antifibrotic and Angiostatic Impact of Idebenone, Carnosine and Vitamin E in Nano-Sized Titanium Dioxide-Induced Liver Injury. Cellular Physiology and Biochemistry *35*, 2402–2411.

Abd Elmageed, Z.Y., Naura, A.S., Errami, Y., and Zerfaoui, M. (2012). The Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs): New roles in intracellular transport. Cellular Signalling *24*, 1–8.

Abu-Dief, E.E., Khalil, K.M., Abdel-Aziz, H.O., Nor-Eldin, E.K., and Ragab, E.E. (2015). Histological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Adult Male Albino Rat Liver and Possible Prophylactic Effects of Milk Thistle Seeds. Life Science Journal *12*.

Acar, M., Bulut, Z., Ate, A., Nami, B., Kocak, N., and Y ld z, B. (2015). Titanium dioxide nanoparticles induce cytotoxicity and reduce mitotic index in human amniotic fluid-derived cells. Human & Experimental Toxicology *34*, 74–82.

Ahlinder, L., Ekstrand-Hammarström, B., Geladi, P., and Ã–sterlund, L. (2013). Large Uptake of Titania and Iron Oxide Nanoparticles in the Nucleus of Lung Epithelial Cells as Measured by Raman Imaging and Multivariate Classification. Biophysical Journal *105*, 310–319.

Alarifi, S., Ali, D., Al-Doaiss, A.A., Ali, B.A., Ahmed, M., and Al-Khedhairy, A.A. (2013). Histologic and apoptotic changes induced by titanium dioxide nanoparticles in the livers of rats. International Journal of Nanomedicine *8*, 3937–3943.

Al-Rasheed, N.M., Faddah, L.M., Mohamed, A.M., Baky, N.A.A., and Mohammad, R.A. (2013). Potential Impact of Quercetin and Idebenone against Immuno- inflammatory and Oxidative Renal Damage Induced in Rats by Titanium Dioxide Nanoparticles Toxicity. J. Oleo Sci. *62*, 961–971.

Al-Shahrour, F., Díaz-Uriarte, R., and Dopazo, J. (2004). FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. Bioinformatics *20*, 578–580.

Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tárraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D., and Dopazo, J. (2007). FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. Nucleic Acids Res. *35*, W91–W96.

Amunugama, R., and Fishel, R. (2012). Homologous Recombination in Eukaryotes. In Progress in Molecular Biology and Translational Science, (Elsevier), pp. 155–206.

Anjilvel, S. (1995). A Multiple-Path Model of Particle Deposition in the Rat Lung. Fundamental and Applied Toxicology *28*, 41–50.

ANSES (2014). Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : enjeux et mise à jour des connaissances. Autosaisine n°2012-SA-0273 « Nanomatériaux et Santé ».

Armand, L., Dagouassat, M., Belade, E., Simon-Deckers, A., Le Gouvello, S., Tharabat, C., Duprez, C., Andujar, P., Pairon, J.-C., Boczkowski, J., et al. (2013). Titanium dioxide nanoparticles induce matrix metalloprotease 1 in human pulmonary fibroblasts partly via an interleukin-1β-dependent mechanism. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *48*, 354–363.

Armand, L., Biola-Clier, M., Bobyk, L., Collin-Faure, V., Diemer, H., Strub, J.-M., Cianferani, S., Van Dorsselaer, A., Herlin-Boime, N., Rabilloud, T., et al. (2015). Molecular responses of alveolar epithelial

A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view. Journal of Proteomics.

Armand, L., Tarantini, A., Beal, D., Biola-Clier, M., Bobyk, L., Sorieul, S., Pernet-Gallay, K., Marie-Desvergne, C., Lynch, I., Herlin-Boime, N., et al. (2016). Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. Nanotoxicology 1–11.

Armengaud, J., Fernandez, B., Chaumont, V., Rollin-Genetet, F., Finet, S., Marchetti, C., Myllykallio, H., Vidaud, C., Pellequer, J.-L., Gribaldo, S., et al. (2003). Identification, purification, and characterization of an eukaryotic-like phosphopantetheine adenylyltransferase (coenzyme A biosynthetic pathway) in the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus abyssi. J. Biol. Chem. *278*, 31078–31087.

Azim, S.A.A., Darwish, H.A., Rizk, M.Z., Ali, S.A., and Kadry, M.O. (2015). Amelioration of titanium dioxide nanoparticles-induced liver injury in mice: Possible role of some antioxidants. Experimental and Toxicologic Pathology.

Baan, R.A. (2007). Carcinogenic Hazards from Inhaled Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc not Containing Asbestos or Asbestiform Fibers: Recent Evaluations by an *IARC Monographs* Working Group. Inhalation Toxicology *19*, 213–228.

Bak, S.T., Sakellariou, D., and Pena-Diaz, J. (2014). The dual nature of mismatch repair as antimutator and mutator: for better or for worse. Front Genet *5*, 287.

Bauerschmidt, C., Arrichiello, C., Burdak-Rothkamm, S., Woodcock, M., Hill, M.A., Stevens, D.L., and Rothkamm, K. (2010). Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin. Nucleic Acids Res. *38*, 477–487.

Bernier, M.-C., Besse, M., Vayssade, M., Morandat, S., and El Kirat, K. (2012). Titanium Dioxide Nanoparticles Disturb the Fibronectin-Mediated Adhesion and Spreading of Pre-osteoblastic Cells. Langmuir *28*, 13660–13667.

Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M., and Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. Mutation Research/Reviews in Mutation Research *511*, 145–178.

BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., and Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. Toxicology *278*, 311–318.

BéruBé, M.A. Damien Breheny, Richard Clothier, Robert Combes, Rodger, Duffin, B.F. Marianna Gaça, Alison Gray, Ian Hall, Michael Kelly, Michael Lethem, Manfred Liebsch, L.M. Jean-Paul Morin, JeanClare Seagrave, Melody A. Swartz, and Umachandran, T.D.T. and M. (2009). In Vitro Models of Inhalation Toxicity and Disease. Altern Lab Anim. *37(1)*, 89–141.

Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R., Hoffmann, E., and Dopp, E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. Particle and Fibre Toxicology *6*, 17.

Bhola, R., Bhola, S.M., Mishra, B., and Olson, D.L. (2011). Corrosion in titanium dental implants/prostheses–a review. Trends in Biomaterials and Artificial Organs *25*, 34–46.

Boekhorst, J., Boersema, P.J., Tops, B.B.J., van Breukelen, B., Heck, A.J.R., and Snel, B. (2011). Evaluating Experimental Bias and Completeness in Comparative Phosphoproteomics Analysis. PLoS ONE *6*, e23276.

Boffetta, P., Gaborieau, V., Nadon, L., Parent, M.F., Weiderpass, E., and Siemiatycki, J. (2001). Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal. Scand J Work Environ Health *27*, 227–232.

Boffetta, P., Soutar, A., Cherrie, J.W., Granath, F., Andersen, A., Anttila, A., Blettner, M., Gaborieau, V., Klug, S.J., Langard, S., et al. (2004). Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. Cancer Causes Control *15*, 697–706.

Boland, S., Hussain, S., and Baeza-Squiban, A. (2014). Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity: Carbon black and TiO2 induce different mechanisms of toxicity. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology *6*, 641–652.

Botta, S.G., Navío, J.A., Hidalgo, M.C., Restrepo, G.M., and Litter, M.I. (1999). Photocatalytic properties of ZrO2 and Fe/ZrO2 semiconductors prepared by a sol–gel technique. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry *129*, 89–99.

Boyle, E.I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J.M., and Sherlock, G. (2004). GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. Bioinformatics *20*, 3710–3715.

Bruinink, A., Wang, J., and Wick, P. (2015). Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. Archives of Toxicology.

Brun, E., Carrière, M., and Mabondzo, A. (2012). In vitro evidence of dysregulation of blood/brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO2 nanoparticles. Biomaterials *33*, 886–896.

Brun, E., Barreau, F., Veronesi, G., Fayard, B., Sorieul, S., Chaneac, C., Carapito, C., Rabilloud, T., Mabondzo, A., Herlin-Boime, N., et al. (2014). Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. Particle and Fibre Toxicology *11*, 13.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin. Chem. *55*, 611–622.

Caldecott, K.W. (2014). DNA single-strand break repair. Exp. Cell Res. *329*, 2–8.

Caron, P., Aymard, F., Iacovoni, J.S., Briois, S., Canitrot, Y., Bugler, B., Massip, L., Losada, A., and Legube, G. (2012). Cohesin Protects Genes against γH2AX Induced by DNA Double-Strand Breaks. PLoS Genetics *8*, e1002460.

Carvalho, P.C., Fischer, J.S., Chen, E.I., Yates, J.R., and Barbosa, V.C. (2008). PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. BMC Bioinformatics *9*, 316.

Celá, P., Veselá, B., Matalová, E., Večeřa, Z., and Buchtová, M. (2014). Embryonic toxicity of nanoparticles. Cells Tissues Organs (Print) *199*, 1–23.

Chang, X., Zhang, Y., Tang, M., and Wang, B. (2013). Health effects of exposure to nano-TiO2: a meta-analysis of experimental studies. Nanoscale Res Lett *8*, 51.

Chen, J.L., and Fayerweather, W.E. (1988). Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide. J Occup Med *30*, 937–942.

Chen, X., and Mao, S.S. (2007). Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. Chemical Reviews *107*, 2891–2959.

Chen, T., Yan, J., and Li, Y. (2014a). Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. Journal of Food and Drug Analysis.

Chen, Z., Wang, Y., Ba, T., Li, Y., Pu, J., Chen, T., Song, Y., Gu, Y., Qian, Q., Yang, J., et al. (2014b). Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. Toxicology Letters.

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

Cho, W.S., Duffin, R., Bradley, M., Megson, I.L., MacNee, W., Lee, J.K., Jeong, J., and Donaldson, K. (2013). Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. Part. Fibre Toxicol. *10*, 15.

Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. Nucleic Acids Research *41*, 8403–8420.

Chroneos, Z.C., Sever-Chroneos, Z., and Shepherd, V.L. (2010). Pulmonary Surfactant: An Immunological Perspective. Cellular Physiology and Biochemistry *25*, 13–26.

Chusuei, C.C., Wu, C.H., Mallavarapu, S., Hou, F.Y.S., Hsu, C.M., Winiarz, J.G., Aronstarn, R.S., and Huang, Y.W. (2013). Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. Chem.-Biol. Interact. *206*, 319–326.

Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. Molecular Cell *40*, 179–204.

Clair, G., Armengaud, J., and Duport, C. (2012). Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in Bacillus cereus. Mol. Cell Proteomics *11*, M111.013102.

Coccini, T., Grandi, S., Lonati, D., Locatelli, C., and De Simone, U. (2015). Comparative cellular toxicity of titanium dioxide nanoparticles on human astrocyte and neuronal cells after acute and prolonged exposure. NeuroToxicology.

Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. Nature Cell Biology *4*, E127–E130.

Cowie, H., Magdolenova, Z., Saunders, M., Drlickova, M., Correia Carreira, S., Halamoda Kenzaoi, B., Gombau, L., Guadagnini, R., Lorenzo, Y., Walker, L., et al. (2015). Suitability of human and mammalian cells of different origin for the assessment of genotoxicity of metal and polymeric engineered nanoparticles. Nanotoxicology *9*, 57–65.

Cui, Y., Gong, X., Duan, Y., Li, N., Hu, R., Liu, H., Hong, M., Zhou, M., Wang, L., Wang, H., et al. (2010). Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. Journal of Hazardous Materials *183*, 874–880.

Czajka, M., Sawicki, K., Sikorska, K., Popek, S., Kruszewski, M., and Kapka-Skrzypczak, L. (2015). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. Toxicology in Vitro.

Daley, J.M., Kwon, Y., Niu, H., and Sung, P. (2013). Investigations of homologous recombination pathways and their regulation. Yale J Biol Med *86*, 453–461.

Dan, Y., Shi, H., Stephan, C., and Liang, X. (2015). Rapid Analysis of Titanium Dioxide Nanoparticles in Sunscreens Using Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. Microchemical Journal.

Dedieu, A., Gaillard, J.-C., Pourcher, T., Darrouzet, E., and Armengaud, J. (2011). Revisiting iodination sites in thyroglobulin with an organ-oriented shotgun strategy. J. Biol. Chem. *286*, 259–269.

Demir, E., Burgucu, D., Turna, F., Aksakal, S., and Kaya, B. (2013). Determination of TiO2, ZrO2, and Al2O3 Nanoparticles on Genotoxic Responses in Human Peripheral Blood Lymphocytes and Cultured Embyronic Kidney Cells. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A *76*, 990–1002.

Deng, Z.J., Mortimer, G., Schiller, T., Musumeci, A., Martin, D., and Minchin, R.F. (2009). Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. Nanotechnology *20*, 9.

Deriano, L., and Roth, D.B. (2013). Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. Annual Review of Genetics *47*, 433–455.

Di Paola, A., Bellardita, M., and Palmisano, L. (2013). Brookite, the Least Known TiO2 Photocatalyst. Catalysts *3*, 36–73.

Dorier, M., Brun, E., Veronesi, G., Barreau, F., Pernet-Gallay, K., Desvergne, C., rabilloud, thierry, Carapito, C., Herlin, N., and Carrière, M. (2015). Impact of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles on uptake carriers and efflux pumps in Caco-2 gut epithelial cells. Nanoscale.

Driscoll, K.E., Deyo, L.C., Carter, J.M., Howard, B.W., Hassenbein, D.G., and Bertram, T.A. (1997). Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. Carcinogenesis *18*, 423–430.

Dupierris, V., Masselon, C., Court, M., Kieffer-Jaquinod, S., and Bruley, C. (2009). A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. Bioinformatics *25*, 1980–1981.

Eden, E., Lipson, D., Yogev, S., and Yakhini, Z. (2007). Discovering Motifs in Ranked Lists of DNA Sequences. PLoS Computational Biology *3*, e39.

Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., and Yakhini, Z. (2009). GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. BMC Bioinformatics *10*, 48.

Ellis, E.D., Watkins, J., Tankersley, W., Phillips, J., and Girardi, D. (2010). Mortality among titanium dioxide workers at three DuPont plants. J. Occup. Environ. Med. *52*, 303–309.

Elo, R., Määttä, K., Uksila, E., and Arstila, A.U. (1972). Pulmonary deposits of titanium dioxide in man. Arch Pathol *94*, 417–424.

El-Zahed, E.S., El-Sayed, H.R., Ibraheem, O.Y., and Omran, B.H. (2015). Hepatotoxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles & the Possible Protective Role of N-acetylcysteine in Adult Male Albino Rats (Histological & Biochemical Study). Journal of American Science *11*.

Falck, G.C.M., Lindberg, H.K., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalan, J., Savolainen, K., and Norppa, H. (2009). Genotoxic effects of nanosized and fine TiO2. Human & Experimental Toxicology *28*, 339–352.

Fei Yin, Z., Wu, L., Gui Yang, H., and Hua Su, Y. (2013). Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. Physical Chemistry Chemical Physics *15*, 4844.

Fong, Y.W., Cattoglio, C., and Tjian, R. (2013). The Intertwined Roles of Transcription and Repair Proteins. Molecular Cell *52*, 291–302.

Forestier, A., Douki, T., Sauvaigo, S., De Rosa, V., Demeilliers, C., and Rachidi, W. (2012). Alzheimer's Disease-Associated Neurotoxic Peptide Amyloid-B Impairs Base Excision Repair in Human Neuroblastoma Cells. International Journal of Molecular Sciences *13*, 14766–14787.

Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L., and Audus, K.L. (1998). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. Experimental Cell Research *243*, 359–366.

Fousteri, M., and Mullenders, L.H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. Cell Research *18*, 73–84.

Franchi, L.P., Manshian, B.B., de Souza, T.A.J., Soenen, S.J., Matsubara, E.Y., Rosolen, J.M., and Takahashi, C.S. (2015). Cyto- and genotoxic effects of metallic nanoparticles in untransformed human fibroblast. Toxicology in Vitro.

Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J.L., Pouget, J.P., Tornabene, C., and Cadet, J. (2000). High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. Chem. Res. Toxicol. *13*, 1002–1010.

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

Fu, P.P., Xia, Q.S., Hwang, H.M., Ray, P.C., and Yu, H.T. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. J. Food Drug Anal. *22*, 64–75.

Gangwal, S., Brown, J.S., Wang, A., Houck, K.A., Dix, D.J., Kavlock, R.J., and Hubal, E.A.C. (2011). Informing Selection of Nanomaterial Concentrations for ToxCast in Vitro Testing Based on Occupational Exposure Potential. Environ. Health Perspect. *119*, 1539–1546.

Garabrant, D.H., Fine, L.J., Oliver, C., Bernstein, L., and Peters, J.M. (1987). Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers. Scand J Work Environ Health *13*, 47–51.

Ge, Y., Bruno, M., Wallace, K., Winnik, W., and Prasad, R.Y. (2011). Proteome profiling reveals potential toxicity and detoxification pathways following exposure of BEAS-2B cells to engineered nanoparticle titanium dioxide. PROTEOMICS *11*, 2406–2422.

Geiser, M., and Kreyling, W. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. Particle and Fibre Toxicology C7 - 2 *7*, 1–17.

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

Geiser, M., Casaulta, M., Kupferschmid, B., Schulz, H., Semmler-Behnke, M., and Kreyling, W. (2008). The Role of Macrophages in the Clearance of Inhaled Ultrafine Titanium Dioxide Particles. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology *38*, 371–376.

Gheshlaghi, Z.N., Riazi, G.H., Ahmadian, S., Ghafari, M., and Mahinpour, R. (2008). Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. Acta Biochimica et Biophysica Sinica *40*, 777–782.

Ghosh, M., Chakraborty, A., and Mukherjee, A. (2013). Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. Journal of Applied Toxicology n/a – n/a.

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. *51*, 1417–1423.

Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. The Journal of Pathology *221*, 3–12.

Golbamaki Bakhtyari, N., Rasulev, B., Cassano, A., Marchese Robinson, R.L., Leszczynski, J., Benfenati, E., and Cronin, M.T.D. (2015). Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: Review of Recent data and discussion of possible mechanisms. Nanoscale *7*, 2154–2198.

Gong, F., and Miller, K.M. (2013). Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis *750*, 23–30.

Gong, C., Tao, G., Yang, L., Liu, J., Liu, Q., Li, W., and Zhuang, Z. (2012). Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of nano-SiO2-induced decrease of PARP-1 mRNA expression. Toxicology Letters *209*, 264–269.

González-Esquivel, A.E., Charles-Niño, C.L., Pacheco-Moisés, F.P., Ortiz, G.G., Jaramillo-Juárez, F., and Rincón-Sánchez, A.R. (2015). Beneficial effects of quercetin on oxidative stress in liver and kidney induced by titanium dioxide (TiO2) nanoparticles in rats. Toxicology Mechanisms and Methods 1–35.

Goodman, M.F., and Woodgate, R. (2013). Translesion DNA polymerases. Cold Spring Harb Perspect Biol *5*, a010363.

Gou, N., Onnis-Hayden, A., and Gu, A.Z. (2010). Mechanistic Toxicity Assessment of Nanomaterials by Whole-Cell-Array Stress Genes Expression Analysis. Environmental Science & Technology *44*, 5964–5970.

Gui, S., Sang, X., Zheng, L., Ze, Y., Zhao, X., Sheng, L., Sun, Q., Cheng, Z., Cheng, J., Hu, R., et al. (2013a). Intragastric exposure to titanium dioxide nanoparticles induced nephrotoxicity in mice, assessed by physiological and gene expression modifications. Particle and Fibre Toxicology *10*, 4.

Gui, S., Li, B., Zhao, X., Sheng, L., Hong, J., Yu, X., Sang, X., Sun, Q., Ze, Y., Wang, L., et al. (2013b). Renal Injury and Nrf2 Modulation in Mouse Kidney Following Chronic Exposure to TiO2 Nanoparticles. Journal of Agricultural and Food Chemistry *61*, 8959–8968.

Guirouilh-Barbat, J., Lambert, S., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is homologous recombination really an error-free process? Frontiers in Genetics *5*.

Gupta, S.M., and Tripathi, M. (2011). A review of TiO2 nanoparticles. Chinese Science Bulletin *56*, 1639–1657.

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

Halappanavar, S., Jackson, P., Williams, A., Jensen, K.A., Hougaard, K.S., Vogel, U., Yauk, C.L., and Wallin, H. (2011). Pulmonary Response to Surface-Coated Nanotitanium Dioxide Particles Includes Induction of Acute Phase Response Genes, Inflammatory Cascades, and Changes in MicroRNAs: A Toxicogenomic Study. Environmental and Molecular Mutagenesis *52*, 425–439.

Halappanavar, S., Saber, A.T., Decan, N., Jensen, K.A., Wu, D., Jacobsen, N.R., Guo, C., Rogowski, J., Koponen, I.K., Levin, M., et al. (2015). Transcriptional profiling identifies physicochemical properties of nanomaterials that are determinants of the in vivo pulmonary response: Genomic Responses of Titanium Dioxide Nanoparticles. Environmental and Molecular Mutagenesis *56*, 245–264.

Hämeri, K., Lähde, T., Hussein, T., Koivisto, J., and Savolainen, K. (2009). Facing the key workplace challenge: assessing and preventing exposure to nanoparticles at source. Inhal Toxicol *21 Suppl 1*, 17–24.

Hamzeh, M., and Sunahara, G.I. (2013). In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. Toxicol In Vitro *27*, 864–873.

Hegde, M.L., Hazra, T.K., and Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. Cell Res. *18*, 27–47.

Helmy, A.M., Sharaf-El-Din, N.A., Abd-El-Moneim, R.A., and Rostom, D.M. (2015). Histological study of the renal cortical proximal and distal tubules in adult male albino rats following prolonged administration of titanium dioxide nanoparticles and the possible protective role of l-carnosine: The Egyptian Journal of Histology *38*, 126–142.

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

Hillegass, J.M., Shukla, A., Lathrop, S.A., MacPherson, M.B., Fukagawa, N.K., and Mossman, B.T. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol *2*, 219–231.

Hinderliter, P., Minard, K., Orr, G., Chrisler, W., Thrall, B., Pounds, J., and Teeguarden, J. (2010). ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. Particle and Fibre Toxicology *7*, 36.

Hoeijmakers, J.H.J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature *411*, 366–374.

Hong, F., Hong, J., Wang, L., Zhou, Y., Liu, D., Xu, B., Yu, X., and Sheng, L. (2015). Chronic Exposure to Nanoparticulate TiO2 Causes Renal Fibrosis Involving Activation of the Wnt Pathway in Mouse Kidney. Journal of Agricultural and Food Chemistry *63*, 1639–1647.

Horie, M., Nishio, K., Fujita, K., Endoh, S., Miyauchi, A., Saito, Y., Iwahashi, H., Yamamoto, K., Murayama, H., Nakano, H., et al. (2009). Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. Chem. Res. Toxicol. *22*, 543–553.

Hou, Y., Lai, M., Chen, X., Li, J., Hu, Y., Luo, Z., Ding, X., and Cai, K. (2014). Effects of mesoporous SiO2, Fe3O4, and TiO2 nanoparticles on the biological functions of endothelial cells in vitro. Journal of Biomedical Materials Research Part A *102*, 1726–1736.

Huang, K.-T., Wu, C.-T., Huang, K.-H., Lin, W.-C., Chen, C.-M., Guan, S.-S., Chiang, C.-K., and Liu, S.-H. (2014). Titanium nanoparticles inhalation induces renal fibrosis in mice via an oxidative stress-up-regulated transforming growth factor-β pathway. Chemical Research in Toxicology 141118194646006.

Huang, S., Chueh, P.J., Lin, Y.-W., Shih, T.-S., and 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.

Husain, M., Saber, A.T., Guo, C., Jacobsen, N.R., Jensen, K.A., Yauk, C.L., Williams, A., Vogel, U., Wallin, H., and Halappanavar, S. (2013). Pulmonary instillation of low doses of titanium dioxide nanoparticles in mice leads to particle retention and gene expression changes in the absence of inflammation. Toxicology and Applied Pharmacology.

Husain, M., Wu, D., Saber, A.T., Decan, N., Jacobsen, N.R., Williams, A., Yauk, C.L., Wallin, H., Vogel, U., and Halappanavar, S. (2015). Intratracheally instilled titanium dioxide nanoparticles translocate to heart and liver and activate complement cascade in the heart of C57BL/6 mice. Nanotoxicology 1–10.

Iavicoli, I., Fontana, L., Leso, V., and Bergamaschi, A. (2013). The Effects of Nanomaterials as Endocrine Disruptors. Int. J. Mol. Sci. *14*, 16732–16801.

Imamura, H., Wakabayashi, M., and Ishihama, Y. (2012). Analytical strategies for shotgun phosphoproteomics: Status and prospects. Seminars in Cell & Developmental Biology *23*, 836–842.

Ischenko, A.A., and Saparbaev, M.K. (2002). Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. Nature *415*, 183–187.

Itoh, S., Sato, S., Ono, J., Okada, H., and Nagasaka, T. (2006). Feasibility study of the new rutile extraction process from natural ilmenite ore based on the oxidation reaction. Metallurgical and Materials Transactions B *37*, 979–985.

Iyama, T., and Wilson, D.M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair *12*, 620–636.

Jeong, M., Park, J.M., Lee, E.J., Cho, Y.S., Lee, C., Kim, J.M., and Half, S.S. (2013). Cytotoxicity of Ultra-pure TiO2 and ZnO Nanoparticles Generated by Laser Ablation. Bull. Korean Chem. Soc. *34*, 3301–3306.

Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E.M.V., Godwin, H., et al. (2010). Dispersion and Stability Optimization of TiO2 Nanoparticles in Cell Culture Media. Environmental Science & Technology *44*, 7309–7314.

Jiricny, J. (2013). Postreplicative Mismatch Repair. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology *5*, a012633–a012633.

Johnston, H., Hutchison, G., Christensen, F., Peters, S., Hankin, S., and Stone, V. (2009). Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO2 particulates: the contribution of physicochemical characteristics. Particle and Fibre Toxicology C7 - 33 *6*, 1–27.

Jovanović, B. (2014). Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive: Titanium Dioxide in Human Food. Integrated Environmental Assessment and Management *11*, 10–20.

Jugan, M.-L., Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., and Carriere, M. (2012). Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. Nanotoxicology *6*, 501–513.

Kamileri, I., Karakasilioti, I., and Garinis, G.A. (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. Trends in Genetics *28*, 566–573.

Kansara, K., Patel, P., Shah, D., Shukla, R.K., Singh, S., Kumar, A., and Dhawan, A. (2014). TiO2 nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells: DNA Double Strand Breaks and Cell Cycle Arrest. Environmental and Molecular Mutagenesis n/a – n/a.

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

Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P., and Moller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. Toxicology Letters *188*, 112–118.

Karran, P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. Curr. Opin. Genet. Dev. *10*, 144–150.

Kazak, L., Reyes, A., and Holt, I.J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 659–671.

Kermanizadeh, A., Chauché, C., Brown, D.M., Loft, S., and Møller, P. (2014). The role of intracellular redox imbalance in nanomaterial induced cellular damage and genotoxicity: A review: NM Induced Redox Status Imbalance and Genotoxicity. Environmental and Molecular Mutagenesis n/a – n/a.

Kim, T.-H., Shin, S.-W., Park, J.-S., and Park, C.-S. (2013). Genome wide identification and expression profile in epithelial cells exposed to TiO2 particles. Environmental Toxicology n/a – n/a.

Kim, Y., Boykin, E., Stevens, T., Lavrich, K., and Gilmour, M. (2014). Comparative lung toxicity of engineered nanomaterials utilizing in vitro, ex vivo and in vivo approaches. Journal of Nanobiotechnology *12*, 47.

Koivisto, A.J., Lyyränen, J., Auvinen, A., Vanhala, E., Hämeri, K., Tuomi, T., and Jokiniemi, J. (2012). Industrial worker exposure to airborne particles during the packing of pigment and nanoscale titanium dioxide. Inhalation Toxicology *24*, 839–849.

Kottemann, M.C., and Smogorzewska, A. (2013). Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. Nature *493*, 356–363.

Kouranti, I., and Peyroche, A. (2012). Protein degradation in DNA damage response. Seminars in Cell & Developmental Biology *23*, 538–545.

Krogh, D. (2011). Biology: a guide to the natural world (Boston: Benjamin Cummings).

Kubo-Irie, M., Uchida, H., Mastuzawa, S., Yoshida, Y., Shinkai, Y., Suzuki, K., Yokota, S., Oshio, S., and Takeda, K. (2014). Dose–dependent biodistribution of prenatal exposure to rutile-type titanium dioxide nanoparticles on mouse testis. Journal of Nanoparticle Research C7 - 2284 *16*, 1–8.

Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2005). DNA MISMATCH REPAIR. Annual Review of Biochemistry *74*, 681–710.

Lahtz, C., and Pfeifer, G.P. (2011). Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. Journal of Molecular Cell Biology *3*, 51–58.

Lamoureux, D.P., Kobzik, L., and Fedulov, A.V. (2010). Customized PCR-Array Analysis Informed by Gene-Chip Microarray and Biological Hypothesis Reveals Pathways Involved in Lung Inflammatory Response to Titanium Dioxide in Pregnancy. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A *73*, 596–606.

Lan, J., Gou, N., Gao, C., He, M., and Gu, A.Z. (2014). Comparative and Mechanistic Genotoxicity Assessment of Nanomaterials via a Quantitative Toxicogenomics Approach across Multiple Species. Environ. Sci. Technol. *48*, 12937–12945.

Landsiedel, R., Sauer, U.G., Ma-Hock, L., Schnekenburger, J., and Wiemann, M. (2014). Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. Nanomedicine (Lond) *9*, 2557–2585.

Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G., and Hoet, P. (2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. Particle and Fibre Toxicology *6*, 14.

Lara, P.C., Pruschy, M., Zimmermann, M., and Henríquez-Hernández, L.A. (2011). MVP and vaults: a role in the radiation response. Radiat Oncol *6*, 148.

Laulier, C., and Lopez, B.S. (2012). The secret life of Bcl-2: Apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. Mutation Research/Reviews in Mutation Research *751*, 247–257.

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

Lee, Y.S., Yoon, S., Yoon, H.J., Lee, K., Yoon, H.K., Lee, J.H., and Song, C.W. (2009). Inhibitor of differentiation 1 (Id1) expression attenuates the degree of TiO2-induced cytotoxicity in H1299 non-small cell lung cancer cells. Toxicol. Lett. *189*, 191–199.

Lemeer, S., and Heck, A.J. (2009). The phosphoproteomics data explosion. Current Opinion in Chemical Biology *13*, 414–420.

Li, B., Ze, Y., Sun, Q., Zhang, T., Sang, X., Cui, Y., Wang, X., Gui, S., Tan, D., Zhu, M., et al. (2013). Molecular Mechanisms of Nanosized Titanium Dioxide - Induced Pulmonary Injury in Mice. PLoS ONE *8*, e55563.

Li, N., Ma, L., Wang, J., Zheng, L., Liu, J., Duan, Y., Liu, H., Zhao, X., Wang, S., Wang, H., et al. (2010). Interaction Between Nano-Anatase TiO2 and Liver DNA from Mice In Vivo. Nanoscale Research Letters *5*, 108–115.

Li, Y., Zhang, Y., and Yan, B. (2014). Nanotoxicity Overview: Nano-Threat to Susceptible Populations. International Journal of Molecular Sciences *15*, 3671–3697.

Lindberg, H.K., Falck, G.C.-M., Catalán, J., Koivisto, A.J., Suhonen, S., Järventaus, H., Rossi, E.M., Nykäsenoja, H., Peltonen, Y., Moreno, C., et al. (2012). Genotoxicity of inhaled nanosized TiO(2) in mice. Mutat. Res. *745*, 58–64.

Lindquist, S.L., and Kelly, J.W. (2011). Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. Cold Spring Harb Perspect Biol *3*.

Liu, W., Rose, J., Plantevin, S., Auffan, M., Bottero, J.-Y., and Vidaud, C. (2013). Protein corona formation for nanomaterials and proteins of a similar size: hard or soft corona? Nanoscale *5*, 1658–1668.

Longerich, S., Li, J., Xiong, Y., Sung, P., and Kupfer, G.M. (2014). Stress and DNA repair biology of the Fanconi anemia pathway. Blood *124*, 2812–2819.

Lövestam, G., Rauscher, H., Roebben, G., Klüttgen, B.S., Gibson, N., Putaud, J.-P., and Stamm, H. (2010). Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes (Publications Office).

Lundqvist, M. (2013). Nanoparticles: Tracking protein corona over time. Nat Nanotechnol *8*, 701–702.

Lynch, I., Ahluwalia, A., Boraschi, D., Byrne Hugh, J., Fadeel, B., Gehr, P., Gutleb Arno, C., Kendall, M., and Papadopoulos Manthos, G. (2013). The bio-nano-interface in predicting nanoparticle fate and behaviour in living organisms: towards grouping and categorising nanomaterials and ensuring nanosafety by design. BioNanoMaterials *14*, 195.

Määttä, K., and Arstila, A.U. (1975). Pulmonary deposits of titanium dioxide in cytologic and lung biopsy specimens. Light and electron microscopic x-ray analysis. Lab. Invest. *33*, 342–346.

Mader, S.S. (2012). Human biology (New York, NY: McGraw-Hill).

Magdolenova, Z., Bilanicova, D., Pojana, G., Fjellsbo, L.M., Hudecova, A., Hasplova, K., Marcomini, A., and Dusinska, M. (2012). Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity. J. Environ. Monit. *14*, 455–464.

Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., and Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. Nanotoxicology *8*, 233–278.

Manning, G. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. Science *298*, 1912–1934.

Mao, Z., Xu, B., Ji, X., Zhou, K., Zhang, X., Chen, M., Han, X., Tang, Q., Wang, X., and Xia, Y. (2015). Titanium dioxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the microtubule dynamics. Nanoscale *7*, 8466–8475.

Marquez-Ramirez, S.G., Delgado-Buenrostro, N.L., Chirino, Y.I., Iglesias, G.G., and Lopez-Marure, R. (2012). Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. Toxicology *302*, 146–156.

Mason, K.A., Losos, J.B., Singer, S.R., Raven, P.H., and Johnson, G.B. (2011). Biology (New York N.Y.: McGraw-Hill).

Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. Science *316*, 1160–1166.

McCracken, S., Longman, D., Marcon, E., Moens, P., Downey, M., Nickerson, J.A., Jessberger, R., Wilde, A., Caceres, J.F., Emili, A., et al. (2005). Proteomic Analysis of SRm160-containing Complexes Reveals a Conserved Association with Cohesin. Journal of Biological Chemistry *280*, 42227–42236.

Medema, R.H., and Macůrek, L. (2012). Checkpoint control and cancer. Oncogene *31*, 2601–2613.

Medina-Reyes, E.I., Bucio-López, L., Freyre-Fonseca, V., Sánchez-Pérez, Y., García-Cuéllar, C.M., Morales-Bárcenas, R., Pedraza-Chaverri, J., and Chirino, Y.I. (2014). Cell cycle synchronization reveals greater G2/M-phase accumulation of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. Environmental Science and Pollution Research.

Meena, R., Kumar, S., and Paulraj, R. (2015). Titanium oxide (TiO2) nanoparticles in induction of apoptosis and inflammatory response in brain. Journal of Nanoparticle Research *17*.

Meier, R., Eeftens, M., Aguilera, I., Phuleria, H.C., Ineichen, A., Davey, M., Ragettli, M.S., Fierz, M., Schindler, C., Probst-Hensch, N., et al. (2015). Ambient Ultrafine Particle Levels at Residential and Reference Sites in Urban and Rural Switzerland. Environmental Science & Technology *49*, 2709–2715.

Moe, B., Gabos, S., and Li, X.-F. (2013). Real-time cell-microelectronic sensing of nanoparticle-induced cytotoxic effects. Analytica Chimica Acta *789*, 83–90.

Mohammadipour, A., Fazel, A., Haghir, H., Motejaded, F., Rafatpanah, H., Zabihi, H., Hosseini, M., and Bideskan, A.E. (2014). Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. Environmental Toxicology and Pharmacology.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods *65*, 55–63.

Moulin, G., Favergeon, J., and Béranger, G. (2008). Zircone - Céramique fonctionnelle.

Msiska, Z., Pacurari, M., Mishra, A., Leonard, S.S., Castranova, V., and Vallyathan, V. (2010). DNA double-strand breaks by asbestos, silica, and titanium dioxide: possible biomarker of carcinogenic potential? American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology *43*, 210–219.

Napierska, D., Thomassen, L.C., Lison, D., Martens, J.A., and Hoet, P.H. (2010). The nanosilica hazard: another variable entity. Particle and Fibre Toxicology *7*, 39.

Naya, M., Kobayashi, N., Ema, M., Kasamoto, S., Fukumuro, M., Takami, S., Nakajima, M., Hayashi, M., and Nakanishi, J. (2012). In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. Regul. Toxicol. Pharmacol. *62*, 1–6.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1833*, 3448–3459.

NIOSH (2011). Occupational exposure to titanium dioxide.

Niture, S.K., and Jaiswal, A.K. (2012). Nrf2 Protein Up-regulates Antiapoptotic Protein Bcl-2 and Prevents Cellular Apoptosis. Journal of Biological Chemistry *287*, 9873–9886.

Numano, T., Xu, J.G., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D.B., Furukawa, F., Kanno, J., Hirose, A., Tsuda, H., and Suzui, M. (2014). Comparative Study of Toxic Effects of Anatase and Rutile Type Nanosized Titanium Dioxide Particles in vivo and in vitro. Asian Pac. J. Cancer Prev. *15*, 929–935.

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

Ohno, T., Sarukawa, K., Tokieda, K., and Matsumura, M. (2001). Morphology of a TiO2 Photocatalyst (Degussa, P-25) Consisting of Anatase and Rutile Crystalline Phases. Journal of Catalysis *203*, 82–86.

Ophus, E.M., Rode, L., Gylseth, B., Nicholson, D.G., and Saeed, K. (1979). Analysis of titanium pigments in human lung tissue. Scand J Work Environ Health *5*, 290–296.

Ostling, O., and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *123*, 291–298.

Oya, N., Zölzer, F., Werner, F., and Streffer, C. (2003). Effects of serum starvation on radiosensitivity, proliferation and apoptosis in four human tumor cell lines with different p53 status. Strahlenther Onkol *179*, 99–106.

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

Park, E.-J., Yoon, J., Choi, K., Yi, J., and Park, K. (2009). Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. Toxicology *260*, 37–46.

Park, E.-J., Lee, S.Y., Lee, G.-H., Kim, D.-W., Kim, Y., Cho, M.-H., and Kim, J.-H. (2014a). Sheet-type titania, but not P25, induced paraptosis accompanying apoptosis in murine alveolar macrophage cells. Toxicol. Lett. *230*, 69–79.

Park, E.J., Lee, G.H., Shim, H.W., Kim, J.H., Cho, M.H., and Kim, D.W. (2014b). Comparison of toxicity of different nanorod-type TiO2 polymorphs in vivo and in vitro. J. Appl. Toxicol. *34*, 357–366.

Patil, M., Pabla, N., and Dong, Z. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. Cell. Mol. Life Sci. *70*, 4009–4021.

Paur, H.-R., Cassee, F.R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., Kreyling, W.G., HÃ¤nninen, O., Kasper, G., Riediker, M., et al. (2011). In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung - A dialog between aerosol science and biology. Journal of Aerosol Science *42*, 668–692.

Peña-Diaz, J., and Jiricny, J. (2012). Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? Trends Biochem. Sci. *37*, 206–214.

Petersen, E.J., and Nelson, B.C. (2010). Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. Anal. Bioanal. Chem. *398*, 613–650.

Petruseva, I.O., Evdokimov, A.N., and Lavrik, O.I. (2014). Molecular Mechanism of Global Genome Nucleotide Excision Repair. Acta Naturae *6*, 23–34.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. *29*, 6.

Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters *26*, 509–515.

Piao, M.J., Kim, K.C., Choi, J.-Y., Choi, J., and Hyun, J.W. (2011). Silver nanoparticles down-regulate Nrf2-mediated 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human Chang liver cells. Toxicology Letters *207*, 143–148.

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., and Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. Journal of Nanoparticle Research *14*.

Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. Oncogene *21*, 437–446.

Polo, S.E., and Jackson, S.P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. Genes & Development *25*, 409–433.

Polo, S.E., Blackford, A.N., Chapman, J.R., Baskcomb, L., Gravel, S., Rusch, A., Thomas, A., Blundred, R., Smith, P., Kzhyshkowska, J., et al. (2012). Regulation of DNA-end resection by hnRNPU-like proteins promotes DNA double-strand break signaling and repair. Mol. Cell *45*, 505–516.

Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. Nat Biotech *28*, 1057–1068.

Prasad, R.Y., Wallace, K., Daniel, K.M., Tennant, A.H., Zucker, R.M., Strickland, J., Dreher, K., Kligerman, A.D., Blackman, C.F., and DeMarini, D.M. (2013). Effect of Treatment Media on the Agglomeration of Titanium Dioxide Nanoparticles: Impact on Genotoxicity, Cellular Interaction, and Cell Cycle. Acs Nano.

Prasad, R.Y., Simmons, S.O., Killius, M.G., Zucker, R.M., Kligerman, A.D., Blackman, C.F., Fry, R.C., and DeMarini, D.M. (2014). Cellular interactions and biological responses to titanium dioxide nanoparticles in HepG2 and BEAS-2B cells: Role of cell culture media. Environmental and Molecular Mutagenesis n/a – n/a.

Pujalte, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Treguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtes, C., and L'Azou, B. (2011). Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. Particle and Fibre Toxicology *8*.

Putman, B., Van der Meeren, P., and Thierens, D. (1997). Reduced bovine serum albumin adsorption by prephosphatation of powdered zirconium oxide. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects *121*, 81–88.

Ramanakumar, A.V., Parent, M.-E., Latreille, B., and Siemiatycki, J. (2008). Risk of lung cancer following exposure to carbon black, titanium dioxide and talc: results from two case-control studies in Montreal. Int. J. Cancer *122*, 183–189.

Rass, U., Ahel, I., and West, S.C. (2007). Actions of aprataxin in multiple DNA repair pathways. J. Biol. Chem. *282*, 9469–9474.

Rauch, J., Kolch, W., Laurent, S., and Mahmoudi, M. (2013). Big Signals from Small Particles: Regulation of Cell Signaling Pathways by Nanoparticles. Chemical Reviews.

Rauscher, H., and Roebben, G. (2014). Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term" nanomaterial.

Reddy, B.M., and Khan, A. (2005). Recent Advances on TiO2 -ZrO2 Mixed Oxides as Catalysts and Catalyst Supports. Catalysis Reviews *47*, 257–296.

Reece, J.B. (2011). Campbell biology / Jane B. Reece ... [et al.] (Boston: Benjamin Cummings / Pearson).

Rehn, B., Seiler, F., Rehn, S., Bruch, J., and Maier, M. (2003). Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. Toxicol. Appl. Pharmacol. *189*, 84–95.

Rode, L.E., Ophus, E.M., and Gylseth, B. (1981). Massive pulmonary deposition of rutile after titanium dioxide exposure: Light-microscopical and physico-analytical methods in pigment identification. Acta Pathol Microbiol Scand A *89*, 455–461.

Rosati, A., Graziano, V., De Laurenzi, V., Pascale, M., and Turco, M.C. (2011). BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. Cell Death Dis *2*, e141.

Saha, T., Rih, J.K., Roy, R., Ballal, R., and Rosen, E.M. (2010). Transcriptional Regulation of the Base Excision Repair Pathway by BRCA1. Journal of Biological Chemistry *285*, 19092–19105.

Saquib, Q., Al-Khedhairy, A.A., Siddiqui, M.A., Abou-Tarboush, F.M., Azam, A., and Musarrat, J. (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. Toxicology in Vitro *26*, 351–361.

Sarangi, P., and Zhao, X. (2015). SUMO-mediated regulation of DNA damage repair and responses. Trends Biochem. Sci.

Sauer, U.G., Vogel, S., Aumann, A., Hess, A., Kolle, S.N., Ma-Hock, L., Wohlleben, W., Dammann, M., Strauss, V., Treumann, S., et al. (2014). Applicability of rat precision-cut lung slices in evaluating nanomaterial cytotoxicity, apoptosis, oxidative stress, and inflammation. Toxicology and Applied Pharmacology *276*, 1–20.

Scharer, O.D. (2013). Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology *5*, a012609–a012609.

Schmidt, M., and Finley, D. (2014). Regulation of proteasome activity in health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1843*, 13–25.

Seabra, A., and Durán, N. (2015). Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. Metals *5*, 934–975.

Setyawati, M.I., Tay, C.Y., and Leong, D.T. (2015). Mechanistic Investigation of the Biological Effects of SiO2, TiO2, and ZnO Nanoparticles on Intestinal Cells. Small n/a – n/a.

Sha, B., Gao, W., Wang, S., Gou, X., Li, W., Liang, X., Qu, Z., Xu, F., and Lu, T.J. (2013). Oxidative stress increased hepatotoxicity induced by nano-titanium dioxide in BRL-3A cells and Sprague–Dawley rats. Journal of Applied Toxicology *34*, 345–356.

Sheng, L., Wang, L., Sang, X., Zhao, X., Hong, J., Cheng, S., Yu, X., Liu, D., Xu, B., Hu, R., et al. (2014). Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: a biological pathway explored using microarray technology. J. Hazard. Mater. *278*, 180–188.

Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., and Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and Fibre Toxicology *10*, 15.

Shi, Y.L., Wang, F., He, J.B., Yadav, S., and Wang, H. (2010). Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. Toxicol. Lett. *196*, 21–27.

Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 197–210.

Shiotani, B., and Zou, L. (2009). ATR signaling at a glance. Journal of Cell Science *122*, 301–304.

Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., and Flora, S.J.S. (2014). Effects of sub-acute exposure to TiO2, ZnO and Al2O3 nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. Drug and Chemical Toxicology *37*, 336–347.

Shukla, R.K., Sharma, V., Pandey, A.K., Singh, S., Sultana, S., and Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicology in Vitro *25*, 231–241.

Shukla, R.K., Kumar, A., Vallabani, N.V.S., Pandey, A.K., and Dhawan, A. (2014). Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. Nanomedicine (Lond) *9*, 1423–1434.

Siemiatycki, J. (1991). Risk factors for cancer in the workplace. Boca Raton, FL:CRC Press.

Siemiatycki, J., Dewar, R., Nadon, L., and Gérin, M. (1994). Occupational risk factors for bladder cancer: results from a case-control study in Montreal, Quebec, Canada. Am. J. Epidemiol. *140*, 1061–1080.

Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., and Carriere, M. (2008). In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. Toxicology *253*, 137–146.

Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R.K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M.O., Herman, J.G., Baylin, S.B., Sidransky, D., Gabrielson, E., et al. (2006). Dysfunctional KEAP1–NRF2 Interaction in Non-Small-Cell Lung Cancer. PLoS Medicine *3*, e420.

Singh, S., Kumar, A., Karakoti, A., Seal, S., and Self, W.T. (2010). Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. Molecular BioSystems *6*, 1813.

Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., and Novak, S. (2011). Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? Radiol. Oncol. *45*, 227–247.

Smolkova, B., El Yamani, N., Collins, A.R., Gutleb, A.C., and Dusinska, M. (2014). Nanoparticles in food. epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. Food and Chemical Toxicology.

Song, J.W., and Chung, K.C. (2010). Observational Studies: Cohort and Case-Control Studies: Plastic and Reconstructive Surgery *126*, 2234–2242.

Srivastava, R.K., Rahman, Q., Kashyap, M.P., Lohani, M., and Pant, A.B. (2011). Ameliorative effects of dimetylthiourea and N-acetylcysteine on nanoparticles induced cyto-genotoxicity in human lung cancer cells-A549. PLoS ONE *6*, e25767.

Srivastava, R.K., Rahman, Q., Kashyap, M.P., Singh, A.K., Jain, G., Jahan, S., Lohani, M., Lantow, M., and Pant, A.B. (2013). Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. Human & Experimental Toxicology *32*, 153–166.

Stapleton, P.A., Minarchick, V.C., Yi, J., Engels, K., McBride, C.R., and Nurkiewicz, T.R. (2013). Maternal engineered nanomaterial exposure and fetal microvascular function: does the Barker hypothesis apply? American Journal of Obstetrics and Gynecology *209*, 227.e1–e227.e11.

Stern, S.T., Adiseshaiah, P.P., and Crist, R.M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. Particle and Fibre Toxicology *9*, 20.

Sund, J., Alenius, H., Vippola, M., Savolainen, K., and Puustinen, A. (2011). Proteomic Characterization of Engineered Nanomaterial - Protein Interactions in Relation to Surface Reactivity. Acs Nano *5*, 4300–4309.

Sund, J., Palomäki, J., Ahonen, N., Savolainen, K., Alenius, H., and Puustinen, A. (2014). Phagocytosis of nano-sized titanium dioxide triggers changes in protein acetylation. J Proteomics *108*, 469–483.

Tardif, F., Sicard, Y., Shakesheff, A., Moehlmann, C., and Backman, U. (2008). Is it possible to easily measure the engineered nanoparticles at workplaces?

Tassinari, R., Cubadda, F., Moracci, G., Aureli, F., D'Amato, M., Valeri, M., De Berardis, B., Raggi, A., Mantovani, A., Passeri, D., et al. (2014). Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. Nanotoxicology *8*, 654–662.

Taurozzi, J.S., Hackley, V.A., and Wiesner, M.R. (2011). Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment - issues and recommendations. Nanotoxicology *5*, 711–729.

Tay, C.Y., Cai, P., Setyawati, M.I., Fang, W., Tan, L.P., Hong, C.H.L., Chen, X., and Leong, D.T. (2014). Nanoparticles Strengthen Intracellular Tension and Retard Cellular Migration. Nano Letters *14*, 83–88.

Tedja, R., Lim, M., Amal, R., and Marquis, C. (2012). Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. ACS Nano *6*, 4083–4093.

Tessitore, A., Cicciarelli, G., Del Vecchio, F., Gaggiano, A., Verzella, D., Fischietti, M., Vecchiotti, D., Capece, D., Zazzeroni, F., and Alesse, E. (2014). MicroRNAs in the DNA Damage/Repair Network and Cancer. Int J Genomics *2014*, 820248.

Thai, S.-F., Wallace, K.A., Jones, C.P., Ren, H., Prasad, R.Y., Ward, W.O., Kohan, M.J., and Blackman, C.F. (2015). Signaling Pathways and MicroRNA Changes in Nano-TiO2 Treated Human Lung Epithelial (BEAS-2B) Cells. Journal of Nanoscience and Nanotechnology *15*, 492–503.

Tilton, S.C., Karin, N., Tolic, A., xie, Y., Lai, X., Hamilton, R.F., Waters, K., Holian, A., Witzmann, F.A., and Orr, G. (2014). Three human cell types respond to multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanobelts with cell-specific transcriptomic and proteomic expression patterns. Nanotoxicology *0*, 1–40.

Toyooka, T., Amano, T., and Ibuki, Y. (2012). Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis *742*, 84–91.

Tuomela, S., Autio, R., Buerki-Thurnherr, T., Arslan, O., Kunzmann, A., Andersson-Willman, B., Wick, P., Mathur, S., Scheynius, A., Krug, H.F., et al. (2013). Gene Expression Profiling of Immune-Competent Human Cells Exposed to Engineered Zinc Oxide or Titanium Dioxide Nanoparticles. PLoS ONE *8*, e68415.

Ubersax, J.A., and Ferrell Jr, J.E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. Nature Reviews Molecular Cell Biology *8*, 530–541.

Ursini, C.L., Cavallo, D., Fresegna, A.M., Ciervo, A., Maiello, R., Tassone, P., Buresti, G., Casciardi, S., and Iavicoli, S. (2014). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory response in human alveolar and bronchial epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles: Cyto-genotoxicity and inflammation by TiO2 NPs in respiratory cells. Journal of Applied Toxicology n/a – n/a.

Val, S., Hussain, S., Boland, S., Hamel, R., Baeza-Squiban, A., and Marano, F. (2009). Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. Inhal Toxicol *21 Suppl 1*, 115–122.

Vales, G., Rubio, L., and Marcos, R. (2014). Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. Nanotoxicology 1–11.

Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 134–146.

Veranth, J.M., Kaser, E.G., Veranth, M.M., Koch, M., and Yost, G.S. (2007). Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. Part Fibre Toxicol *4*, 2.

Villén, J., and Gygi, S.P. (2008). The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. Nature Protocols *3*, 1630–1638.

Vlachostergios, P.J., Patrikidou, A., Daliani, D.D., and Papandreou, C.N. (2009). The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 2: transcriptional regulation. J. Cell. Mol. Med. *13*, 3019–3031.

Walden, H., and Deans, A.J. (2014). The Fanconi anemia DNA repair pathway: structural and functional insights into a complex disorder. Annu Rev Biophys *43*, 257–278.

Wallace, S.S. (2014). Base excision repair: a critical player in many games. DNA Repair (Amst.) *19*, 14–26.

Wan, R., Mo, Y.Q., Feng, L.F., Chien, S.F., Tollerud, D.J., and Zhang, Q.W. (2012). DNA Damage Caused by Metal Nanoparticles: Involvement of Oxidative Stress and Activation of ATM. Chem. Res. Toxicol. *25*, 1402–1411.

Wang, J.J., Sanderson, B.J.S., and Wang, H. (2007). Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis *628*, 99–106.

Wang, S., Hunter, L.A., Arslan, Z., Wilkerson, M.G., and Wickliffe, J.K. (2011). Chronic exposure to nanosized, anatase titanium dioxide is not cyto- or genotoxic to Chinese hamster ovary cells. Environ. Mol. Mutagen. *52*, 614–622.

Wang, Y., Sun, H., Wang, Z., Liu, M., Qi, Z., Meng, J., Sun, J., and Yang, G. (2014). Aurora-A: a potential DNA repair modulator. Tumor Biology *35*, 2831–2836.

Wang, Y., Cui, H., Zhou, J., Li, F., Wang, J., Chen, M., and Liu, Q. (2015a). Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. Environmental Science and Pollution Research.

Wang, Y., Yao, C., Li, C., Ding, L., Liu, J., Dong, P., Fang, H., Lei, Z., Guosheng, S., and Wu, M. (2015b). Excess Titanium Dioxide Nanoparticles on Cell Surface Induce Cytotoxicity by Hindering Ion Exchange and Disrupting Exocytosis Processes. Nanoscale.

Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature *171*, 737–738.

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., and von Goetz, N. (2012). Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. Environmental Science & Technology *46*, 2242–2250.

Williams, J.S., and Kunkel, T.A. (2014). Ribonucleotides in DNA: origins, repair and consequences. DNA Repair (Amst.) *19*, 27–37.

Winton, Wan, Cannell, Gruenert, J. Thompson, Garrod, Stewart, and Robinson (1998). Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability. Clinical and Experimental Allergy *28*, 1273–1285.

Wu, J., Sun, J., and Xue, Y. (2010). Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. Toxicology Letters *199*, 269–276.

Wu, S., Wan, P., Li, J., Li, D., Zhu, Y., and He, F. (2006). Multi-modality of pI distribution in whole proteome. Proteomics *6*, 449–455.

Yamadori, I., Ohsumi, S., and Taguchi, K. (1986). Titanium dioxide deposition and adenocarcinoma of the lung. Acta Pathol. Jpn. *36*, 783–790.

Yamaguchi, T. (1994). Application of ZrO2 as a catalyst and a catalyst support. Catalysis Today *20*, 199–217.

Yang, K., Weinacht, C.P., and Zhuang, Z. (2013). Regulatory role of ubiquitin in eukaryotic DNA translesion synthesis. Biochemistry *52*, 3217–3228.

Yi, C., and He, C. (2013). DNA repair by reversal of DNA damage. Cold Spring Harb Perspect Biol *5*, a012575.

Yokel, R.A., Hussain, S., Garantziotis, S., Demokritou, P., Castranova, V., and Cassee, F.R. (2014). The yin: an adverse health perspective of nanoceria: uptake, distribution, accumulation, and mechanisms of its toxicity. Environ. Sci.: Nano *1*, 406–428.

Yu, K.-N., Chang, S.-H., Park, S.J., Lim, J., Lee, J., Yoon, T.-J., Kim, J.-S., and Cho, M.-H. (2015). Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death via Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane Disruption in Normal Lung Cells. PLOS ONE *10*, e0131208.

Ze, Y., Zheng, L., Zhao, X., Gui, S., Sang, X., Su, J., Guan, N., Zhu, L., Sheng, L., Hu, R., et al. (2013). Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. Chemosphere.

Ze, Y., Hu, R., Wang, X., Sang, X., Ze, X., Li, B., Su, J., Wang, Y., Guan, N., Zhao, X., et al. (2014). Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. J Biomed Mater Res A *102*, 470–478.

Zhang, C., Zhai, S., Wu, L., Bai, Y., Jia, J., Zhang, Y., Zhang, B., and Yan, B. (2015). Induction of Size-Dependent Breakdown of Blood-Milk Barrier in Lactating Mice by TiO2 Nanoparticles. PLOS ONE *10*, e0122591.

Zhang, Q., Kusaka, Y., Sato, K., Nakakuki, K., Kohyama, N., and Donaldson, K. (1998). Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. J. Toxicol. Environ. Health Part A *53*, 423–438.

Zhang, W., Zhu, Z., and Cheng, C.Y. (2011). A literature review of titanium metallurgical processes. Hydrometallurgy *108*, 177–188.

Zhou, H., Tian, R., Ye, M., Xu, S., Feng, S., Pan, C., Jiang, X., Li, X., and Zou, H. (2007). Highly specific enrichment of phosphopeptides by zirconium dioxide nanoparticles for phosphoproteome analysis. Electrophoresis *28*, 2201–2215.

Zhou, X., Wang, B., Jiang, P., Chen, Y., Mao, Z., and Gao, C. (2015). Uptake of cerium oxide nanoparticles and its influence on functions of mouse leukemic monocyte macrophages. Journal of Nanoparticle Research *17*.

Annexes :

Annexe 1 : Articles collaboratifs

Journal of Proteomics xxx (2015) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view

Lucie Armand [a,b], Mathilde Biola-Clier [a,b], Laure Bobyk [a,b], Véronique Collin-Faure [c], Hélène Diemer [d,e], Jean-Marc Strub [d,e], Sarah Cianferani [d,e], Alain Van Dorsselaer [d,e], Nathalie Herlin-Boime [f], Thierry Rabilloud [g,*], Marie Carriere [a,b,**]

[a] Université Grenoble-Alpes, INAC-LCIB, Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, 17 rue des Martyrs, F-38000 Grenoble, France
[b] CEA, INAC-SCIB, Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France
[c] CEA Grenoble, iRTSV/CBM, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, Grenoble, France
[d] Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), Université de Strasbourg, IPHC, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg, France
[e] CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France
[f] UMR3685 CEA-CNRS, NIMBE, LEDNA, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France
[g] CNRS UMR 5249, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 April 2015
Received in revised form 5 August 2015
Accepted 7 August 2015
Available online xxxx

Keywords:
Nanoparticle
Toxicity
Whole-proteome expression
Long-term exposure
Chronic exposure
A549

ABSTRACT

Although the biological effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO_2-NPs) have been studied for more than two decades, the mechanisms governing their toxicity are still unclear. We applied 2D-gel proteomics analysis on A549 epithelial alveolar cells chronically exposed for 2 months to 2.5 or 50 μg/mL of deeply characterized TiO_2-NPs, in order to obtain comprehensive molecular responses that may reflect functional outcomes. We show that exposure to TiO_2-NPs impacts the abundance of 30 protein species, corresponding to 22 gene products. These proteins are involved in glucose metabolism, trafficking, gene expression, mitochondrial function, proteasome activity and DNA damage response. Besides, our results suggest that p53 pathway is activated, slowing down cell cycle progression and reducing cell proliferation rate. Moreover, we report increased content of chaperones-related proteins, which suggests homeostasis re-establishment. Finally, our results highlight that chronic exposure to TiO_2-NPs affects the same cellular functions as acute exposure to TiO_2-NPs, although lower exposure concentrations and longer exposure times induce more intense cellular response.

Biological significance: Our results make possible the identification of new mechanisms that explain TiO_2-NP toxicity upon long-term, in vitro exposure of A549 cells. It is the first article describing -omics results obtained with this experimental strategy. We show that this long-term exposure modifies the cellular content of proteins involved in functions including mitochondrial activity, intra- and extracellular trafficking, proteasome activity, glucose metabolism, and gene expression. Moreover we observe modification of content of proteins that activate the p53 pathway, which suggest the induction of a DNA damage response. Technically, our results show that exposure of A549 cells to a high concentration of TiO_2-NPs leads to the identification of modulations of the same functional categories than exposure to low, more realistic concentrations. Still the intensity differs between these two exposure scenarios. We also show that chronic exposure to TiO_2-NPs induces the modulation of cellular functions that have already been reported in the literature as being impacted in acute exposure scenarios. This proves that the exposure protocol in in vitro experiments related to nanoparticle toxicology might be cautiously chosen since inappropriate scenario may lead to inappropriate and/or incomplete conclusions.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Titanium dioxide microparticles (TiO_2) have been used for over a century as a pigment in paints and cements. Since the use of TiO_2 nanoparticles (TiO_2-NPs) is continuously increasing, for instance as a catalyst or in self-cleaning surfaces, the production of TiO_2-NPs is predicted to soon overtake that of TiO_2 microparticles [1]. Original properties of nanoscale particles imply that they may cause different types of adverse effects [2]. So far, the mechanisms governing TiO_2-NP toxicity are not

* Correspondence to: T. Rabilloud, CNRS-LCBM ProMD team, CEA Grenoble, Bât C3, 38054 Grenoble Cedex 9, France.
** Correspondence to: M. Carriere, CEA Grenoble, LAN, Bât C5, Pce 632, 38054 Grenoble Cedex 9, France.
E-mail addresses: thierry.rabilloud@cnrs.fr (T. Rabilloud), marie.carriere@cea.fr (M. Carriere).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.006
1874-3919/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

totally understood. Studies related to the toxicity of particulate matter have mainly focused on the lung, as it is the most problematic exposure route [2]. They were historically based on results obtained by the community working on the impact of environmental pollution with ultrafine particles. On this target, ultrafine particles (less than 2.5 μm in diameter) are known to induce oxidative stress, inflammation, genotoxicity, apoptosis, cytotoxicity and eventually cancer [3]. Therefore in vitro and in vivo studies related to TiO_2-NP toxicity have focused on the same endpoints, and particularly oxidative stress, inflammation and genotoxicity, leading to conflicting results [4]. Besides these endpoints, original effects of TiO_2-NP have also been described, e.g. impairment of cellular adhesion as well as autophagy [5–7]. Contrary to ultrafine particles, epidemiology failed to demonstrate a direct link between exposure to TiO_2-NPs and cancer. Large-scale -omics techniques, particularly proteomics, have been used in order to identify new pathways and endpoints for TiO_2-NP toxicity. These studies report that acute exposure to TiO_2-NPs induces a marginal cellular response [8], still it impacts cytoskeleton organization, cell metabolism, and mitochondrial activity and induces a global stress response [9–12].

Most of the toxicology studies related to TiO_2-NPs have been conducted on cell lines exposed to very high concentrations of NPs and for very short times [4]. The cellular response to chronic exposure to low concentrations of TiO_2-NPs has only been approached very recently in a couple of articles. Briefly, long-term exposure to TiO_2-NPs alters cell cycle progression [13–15] and genome segregation during mitosis due to interference with mitotic spindle assembly and centrosome maturation [13]. It causes reactive oxygen species accumulation in exposed cells [15] as well as chromosomal instability [13] and cell transformation [13,16].

In this context, the present study aimed at investigating proteome perturbations in A549 cells exposed for 2 months to a low or a high TiO_2-NP concentration, i.e. 2.5 μg/mL and 50 μg/mL, respectively. For cell exposure we used NM105 TiO_2-NPs from the nanoparticle library at Joint Research Center of the European Commission (JRC, Ispra, Italy), i.e. AEROXIDE® P25 TiO_2-NPs from Evonik. The rationale for using epithelial alveolar cells in this study is that, due to their physico-chemical properties, NPs are prone to deposit in the alveolar region of the lung [2,17]. We used 2D-gel proteomics to achieve this goal, because this technique investigates changes in protein abundances on a large scale, thereby providing a wider and untargeted view of the cellular functions impacted by biological stimuli of interest [18] while keeping the analysis at the protein level and not only at the peptide level. To the best of our knowledge, proteomics have never been used to assess cell response to a chronic exposure to TiO_2-NPs.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Unless otherwise indicated, all chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich and were >99% pure.

2.2. Nanoparticle dispersion and characterization

TiO_2-NPs (AEROXIDE® P25, Evonik, Germany; NM105 as referenced in JRC, European Commission) were dispersed in ultrapure sterile water, to the concentration of 10 mg/mL, by applying high energy sonication at 4 °C for 30 min (1 s on/1 s off), as described previously [19], using a probe sonicator equipped with a 3-mm microtip. The energy delivered by our sonicator was measured, amplitude of 28% corresponds to 16.7 W [20]. The physico-chemical properties of these TiO_2-NPs have already been described in our previous articles [19,21]. Briefly, their crystalline structure is mixed anatase/rutile (86%/14%) [21], their primary diameter is 25 ± 7 nm and their specific surface area is 46 ± 1 m^2/g [19]. Upon dispersion in water they form a stable suspension with average diameter (in number) of 44 ± 25 nm and polydispersity index (PdI) 0.146 ± 0.009 (data not shown). Suspensions in ultrapure water were stored in the darkness at room temperature. Just before cell exposure they were diluted in cell culture medium containing 10% FBS after vigorous vortexing. The average hydrodynamic diameter then reached 342 ± 15 nm (in number) and PdI increased to 0.236 ± 0.048, indicating that NPs agglomerated (data not shown).

2.3. Cell culture

A549 human lung carcinoma cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA, reference CCL-185). Cells were subcultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 2 mM/L glutamine, penicillin/streptomycin (50 IU/mL and 50 mg/mL respectively, Life Technologies) and 10% vol/vol FBS (Life Technologies). They were maintained at 37 °C in a 5% CO_2/air incubator.

2.4. Exposure to NPs

During 2 months, cells were passed twice a week in 58 cm^2 petri dishes in cell culture medium containing NPs, using the following protocol: they were rinsed with PBS, trypsinized and counted after trypan blue staining. 1.25×10^6 cells per condition were then seeded in a new 58 cm^2 petri dish, using one petri dish per condition i.e. one petri dish per TiO_2-NP exposure concentration (0, 1, 2.5, 5, 10 or 50 μg/mL TiO_2-NPs). Therefore cells were exposed twice a week to a fresh suspension of NPs. The 10 mg/mL NP stock suspension was the same during the whole exposure period.

2.5. Proteomics

Sample preparation, 2D gel analysis and mass spectrometry were performed as already described [22]. Only the specific methods are described here.

2.5.1. Sample preparation

Cells exposed for 2 months to 2.5 or 50 μg/mL TiO_2-NPs (10^7 cells per condition, with three independent biological replicates per condition, i.e. per exposure concentration) as well as control cells (also 10^7 cells in triplicate, not exposed to TiO_2-NPs) were collected by scraping and washed three times with PBS. They were then washed with TSE buffer (Tris–HCl 10 mM pH 7.5, sucrose 0.25 M, EDTA 1 mM), and the volume of the cell pellet was estimated by resuspension of the pellet in a known volume of TSE buffer and measurement of the suspension volume. Then 4 volumes of lysis buffer (urea 8.75 M, thiourea 2.5 M, CHAPS 5% w/v, TCEP-HCl, 6.25 mM, spermine base 12.5 mM) was added. After 1 h of incubation at room temperature, nucleic acids were removed by ultracentrifugation (270,000 *g* at room temperature for 1 h), and protein concentration in the supernatant was measured using the Bradford assay. Carrier ampholytes (Pharmalytes pH 3–10) were added to a final concentration of 0.4% (w/v). Samples were stored at −20 °C until proteomic analysis.

2.5.2. Isoelectric focusing

Homemade long 4–8 linear pH gradient gels [23] were cast according to published procedures [24]. This pH interval was chosen as a good compromise between resolution and scope. Four mm-wide strips were cut, and rehydrated overnight with the sample, diluted in a final volume of 0.6 mL of rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% carrier ampholytes (Pharmalytes pH 3–10) and 100 mM dithiodiethanol [25,26]). Strips were then placed in a Multiphor plate (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), and isoelectric focusing (IEF) was carried out with the following electrical parameters: 100 V for 1 h, then 300 V for 3 h, then 1000 V for 1 h, then 3400 V up to 60–70 kVh. After IEF, the gels were equilibrated for 20 min in Tris 125 mM, HCl 100 mM, SDS 2.5%, glycerol 30% and urea 6 M [27]. They were then

Please cite this article as: L. Armand, et al., Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view, J Prot (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.006

transferred on top of SDS gels and sealed in place with 1% agarose dissolved in Tris 125 mM, HCl 100 mM, SDS 0.4% and 0.005% (w/v) bromophenol blue.

2.5.3. SDS electrophoresis and protein detection

Ten percent gels (160 × 200 × 1.5 mm) were used for protein separation [28]. The lower electrode buffer was Tris 50 mM, glycine 200 mM, SDS 0.1%. The gels were run at 25 V for 1 h then 12.5 W per gel until the dye front has reached the bottom of the gel. Detection was carried out by fast silver staining [29].

2.5.4. Image analysis

Gel images were analyzed using Delta 2D software v 3.6 (Decodon, Greifswald, Germany). Three gels were prepared from 3 independent cultures for each experimental group. Spots that were never present above 100 ppm of the total spots were first filtered out. Then, significantly-varying spots were selected on the basis of their Student T-test p-value between the different groups. Spots with a p-value lower than 0.05 were selected.

2.5.5. Mass spectrometry

Spots selected for identification were excised from the gels and analyzed using a NanoLC-MS/MS performed by a nanoLC-QTOF-MS system (Synapt G1 from Waters) and a nanoLC-QTOF-MS system (TripleTOF 6600 from ABSciex). For protein identification, MS/MS data were interpreted using a local Mascot server with MASCOT 2.4.0 algorithm (Matrix Science, London, UK) against UniProtKB/SwissProt (version 2012_08, 537,505 sequences [30]). Research was carried out in all species. A maximum of 1 trypsin missed cleavage was allowed. Spectra from QTOF were searched with a mass tolerance of 15 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS data. Carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were specified as variable modifications. Protein identifications were validated with at least 2 peptides with Mascot ion score above 20 or with 1 peptide with Mascot ion score above 30 and 5 consecutive fragment ions in MS/MS spectrum.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium [31] via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD002662.

2.6. Enolase activity

To confirm our proteomics results, α-enolase activity was measured by monitoring the conversion of 2-phosphoglycerate (2-PGA) into phosphoenolpyruvate (PEP) [32] in extracts from cells exposed to 0, 2.5 or 50 μg/mL NPs. Cell extracts were prepared by lysing 1.5×10^7 cells for 20 min at 0 °C in 500 μL of Hepes 20 mM (pH 7.5) containing $MgCl_2$ 2 mM, KCl 50 mM, EGTA 1 mM and SB 3–14 (3-tetradecyldimethylammonio propane 1-sulfonate) 0.15% w./v., followed by centrifugation at 15,000 *g* for 15 min. Protein concentration was measured using Bradford assay. 200 μg of protein extract (40 μL) was then mixed with 400 μL of reaction buffer composed of 50 mM Tris–HCl, 1.5 mM 2-PGA and 1.5 mM $MgCl_2$ (pH 7.4). The appearance of PEP was followed by continuously measuring the absorbance at 240 nm at 20 ± 1 °C, on a Cary 60 UV–vis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) spectrophotometer, using an absorption coefficient of 1400 M^{-1} cm^{-1}. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that converted 1 μmol 2-PGA into PEP in 1 min at 20 °C. For calibration we used enolase from Baker's yeast (Sigma-Aldrich, reference E6126-500 UN).

2.7. Proteasome function

In order to evaluate the influence of proteasome on NP biological response, we evaluated the impact of MG132, a proteasome inhibitor, on the viability of cells exposed to 0, 2.5 or 50 μg/mL NPs [33]. After 2 months of exposure to NPs, cells were seeded at sub-confluence in 96-well plates, at 45,000 cells per well (6 wells per condition). Sixteen hours after plating, they were rinsed in fresh medium then exposed for 6 h to 100 μL of 1, 10 or 50 nM of MG132 (Ready-made solution, Sigma-Aldrich reference M7449). Cell viability was determined using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay as described previously [21].

2.8. Mitochondrial activity

We used rhodamine 123 to evaluate mitochondrial membrane potential, as a marker of mitochondrial activity [34]. After 2 months of cell exposure to 0, 1, 2.5, 5, 10, and 50 μg/mL TiO_2-NPs, cells seeded in 12-well plates at 70,000 cells per well (3 wells per condition). After 16 h, they were rinsed with fresh medium, then exposed to 200 μL of 1 μM rhodamine 123 (Life Technologies) for 30 min. Cells were then washed in PBS and collected by scraping. Fluorescence intensity was measured with excitation at 480 nm and emission at 530 nm, using a Spectramax M2 spectrophotometer (Molecular Devices, Wokingham, UK) and normalized with respect to protein concentration. Data were normalized with respect to protein concentration, reflecting cell number, measured using Bradford assay.

2.9. Western Blot analyses

To investigate DNA damage response pathway activation, we determined phosphorylation and acetylation of the tumor suppressor protein p53 in cells chronically exposed to 0, 1, 2.5, 5, 10 or 50 μg/mL TiO_2-NP. 25×10^7 cells were lysed in a CellLytic™ M solution (Sigma-Aldrich) to which was added protease inhibitors (Complete Mini protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Bâle, Switzerland, one tablet for 10 mL CellLytic solution) and Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA, 100 μL for 10 mL lysing mix), then centrifuged at 20,000 rcf for 10 min at 4 °C. Supernatants were kept at −80 °C. Samples (30 μg protein content) were loaded in TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide 12% gels (Biorad, Hercules, CA, USA) and migrated at 100 V for 2 h. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using the Trans-Blot® Turbo™ Transfert System (Biorad). These membranes were then blocked in 5% non-fat milk prepared in TBS/Tween 0.5% for 1 h. They were then incubated for 1 h30 at room temperature with primary antibodies diluted in 5% non-fat dry milk prepared in TBS/Tween 0.5%: anti-phospho-p53 (Rabbit polyclonal to p53, phospho S15, Abcam, Cambridge, UK, reference ab1431, dilution 1/500 vol/vol), anti-acetylated-p53 (Rabbit monoclonal EPR358(2) to p53 acethyl K382, Abcam, Cambridge, UK, reference ab75754, dilution 1/100 vol/vol) and anti-p53 antibodies (Mouse monoclonal anti-p53, clone DO-1, Sigma-Aldrich, dilution 1/1000 vol/vol). After rinsing in TBS-Tween 0.5%, membranes were incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies diluted in TBS/Tween 0.5% (Amersham ECL anti-mouse IgG HRP-linked, whole antibody, reference NA931 and Amersham ECL anti-rabbit IgG HRP-linked, whole antibody, reference NA934, dilution 1/20,000 vol/vol for both of them). Images were acquired on a Chemidoc XRS+ (Biorad) and band intensities were quantified with ImageLab software (Biorad). Results were normalized with respect to total protein content.

We also used Western Blot to determinate autophagy in control cells and cells exposed to 2.5 et 50 μg/mL NPs, by the conversion of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 from its cytosolic form (LC3-I) to LC3-phosphatidylethanolamine conjugate (LC3-II). The protocol was identical to what is described above using anti-LC3 antibody as primary antibody (LC3A/B (D3U4C) XP Rabbit mAb #12741, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1/1000 vol/vol) and anti-rabbit IgG as secondary antibody (Amersham ECL anti-rabbit IgG HRP-linked, whole antibody, reference NA934, dilution 1/20,000 vol/vol).

Please cite this article as: L. Armand, et al., Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view, J Prot (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.006

2.10. Cell cycle assessment

We assessed cell cycle as a possible consequence of the DNA damage pathway activation. After exposure to 0, 1, 2.5, 5, 10, and 50 μg/mL TiO_2-NP cells were collected (10^6 cells per condition) and rinsed in PBS containing 2 mM EDTA (PBS-EDTA). Cells were fixed in ice-cold 70% ethanol for 30 min then washed with PBS-EDTA. They were suspended in PBS-EDTA containing 25 μg/mL propidium iodide (Life Technologies) and 25 μg/mL RNAse A (Sigma-Aldrich). A minimum of 20,000 events per condition was measured by flow cytometry using a FacsCalibur analyzer (BD Biosciences, Franklin Lanes, NJ, USA) equipped with the CXP software (Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA, USA). Cell cycle data were fit using Flowing Software 2.5.1 (http://www.flowingsoftware.com/).

2.11. Cell proliferation assay

Proliferation was monitored using the 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay (Roche) in cells exposed to 0, 1, 2.5, 5, 10, and 50 μg/mL TiO_2-NP according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 96-well plates. They were exposed to BrdU for 16 h before being fixed with FixDenat solution from the assay kit. They were then incubated in the anti-BrdU-POD antibody for 15 min (provided in the assay kit), then in the substrate solution for 5 min. BrdU labeling was then inferred from absorbance at 370 nm, measured using a Spectramax M2 spectrophotometer at 370 nm (Molecular Device), and corrected with respect to the absorbance at 490 nm.

2.12. Electron microscopy

After exposure, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde, post-fixed with OsO4 and dehydrated in graded concentrations of ethanol then embedded in Epon. Ultra-thin sections were cut (80 nm), counterstained with uranyl acetate and observed with a JEOL 1200 EX transmission electron microscope (TEM) operated at 80 kV (Grenoble Institut des Neurosciences, France) [35].

2.13. Statistical analysis

Experiments were repeated at least 3 times (biological replicates). Statistical tests were run using the Statistica 8.0 software (Statsoft, Chicago, IL, USA). Non-parametric one-way analyses of variance on ranks approach (Kruskal–Wallis) were used. When significance was demonstrated ($p < 0.05$), paired comparisons were run using Mann–Whitney tests.

3. Results

3.1. Proteomic analyses

Quantitative analysis of the proteome was carried out on whole cell extracts prepared from control cells (i.e. not exposed to TiO_2-NPs) or cells exposed for 2 months to either 2.5 or 50 μg/mL NPs (Fig. 1). Three biological replicates per condition prepared from independent cell cultures were analyzed on 2D-gels (Fig. 1A–C). We reproducibly detected 2310 spots on a pH 4–8 range, which was selected as a compromise between resolution (which decreases when the pH window increases) and scope (which increases when the pH window increases); since the literature reports that each protein corresponds to approximately 3 spots [36] these 2310 spots represent about 770 proteins species. The median coefficient of variation of spot intensity was 21%; it ranged between 13% and 25% depending on the sample i.e. within the range of typical 2D gel-based experiments [22,37,38].

Despite this rather limited proteome coverage, the abundance of at least one protein species from 22 gene products changed significantly in cells exposed to NPs, whatever the concentration, as compared to control cells. More precisely, the abundance of 17 and 16 gene products changed when comparing control cells to cells exposed to 2.5 μg/mL or 50 μg/mL TiO_2-NPs, respectively (Fig. 1D). The abundance of 11 gene products was commonly modulated in cells exposed to both TiO_2-NP concentrations (Fig. 1D). Increased content of 9, 7 and 5 proteins and decreased content of 8, 9 and 5 proteins were measured in cells exposed to 2.5 μg/mL TiO_2-NPs, 50 μg/mL TiO_2-NPs and both concentrations, respectively (Fig. 1E). Except for one gene product (serine-threonine kinase receptor-associated protein), the fold-change was always higher in cells chronically exposed to 2.5 μg/mL as compared to cells exposed to 50 μg/mL TiO_2-NPs (Table 1).

We classified these proteins with respect to their function (Table 1). This classification made possible the identification of 6 main categories, corresponding to 6 main cellular functions that were impacted by TiO_2-NP exposure at the protein level. These categories are trafficking (5 proteins) glucose metabolism (3 proteins) gene expression (3 proteins) chaperones (2 proteins) mitochondrial activity (2 proteins) and DNA damage response (2 proteins). Protein abundances rather increased in the DNA damage response, chaperones and gene expression categories, while they rather decreased in the glucose metabolism and mitochondrial activity categories. In the trafficking category, the abundance of three proteins was reduced and the abundance of 2 proteins was increased. In addition to these 6 main categories, 5 gene products could not be classified in any category: peroxiredoxin-6 (spot U2) which is involved in oxidative stress response (note however that the most abundant spot of the same protein, spot U2, was not affected), 26-S proteasome non-ATP regulatory subunit 5, involved in proteasome activity; retinal dehydrogenase 1, implicated in the metabolism of vitamin A; chloride intracellular channel protein 4, which forms poorly selective ion channels in membranes and the NIT2 omega-amidase. These categories that we identified led us to investigate the functionality of their related cellular processes and structures.

3.2. Glucose metabolism perturbation

Our proteomics results showed decreased abundance of α-enolase (spots G1-G3 in Fig. 1) and cytoplasmic malate dehydrogenase (spot G4) which are implicated in glucose metabolism. The intensity of the 3 α-enolase spots detected here, taken individually, was not modified significantly. Still their combined modulation implies that global α-enolase content is significantly decreased in cells exposed to the high concentration of TiO_2-NPs. Therefore to address the functional implication of this decreased protein content we monitored the enolase activity in extracts of cells exposed to 0, 2.5 and 50 μg/mL NPs. As indicated in Fig. 2, our results also show that enolase activity was significantly reduced in cells exposed for 2 months to 50 μg/mL TiO_2-NPs. As we detected a rather small decrease in α-enolase amount in the proteomic screen, this does not mean necessarily that the activity is decreased. Indeed the diminution in amount can be compensated for by other mechanisms, including PTMs. Therefore to address the functional implication of this decreased protein content we monitored the enolase activity in extracts of cells exposed to 0, 2.5 and 50 μg/mL NPs. As indicated in Fig. 2, our results also show that enolase activity was significantly reduced in cells exposed for 2 months to 50 μg/mL TiO_2-NPs. Enolase is a metalloenzyme that is present in all tissues capable of glycolysis. It is responsible for the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate in the glycolysis metabolic pathway. The most abundant subunit in lung cells is the α subunit, the β and γ subunits being mostly present in muscle cells and neural tissues, respectively. In lung cells, decreased enolase activity is thus directly related to decreased α-enolase activity.

The case of triose phosphate is more complex and illustrative of a situation commonly encountered in 2D gel-based proteomics. One of the spots (G5) is statistically different between control and TiO_2-exposed cells, while the other spots, which are more abundant (G6–G7) do not show any significant difference. However, the global trend for these

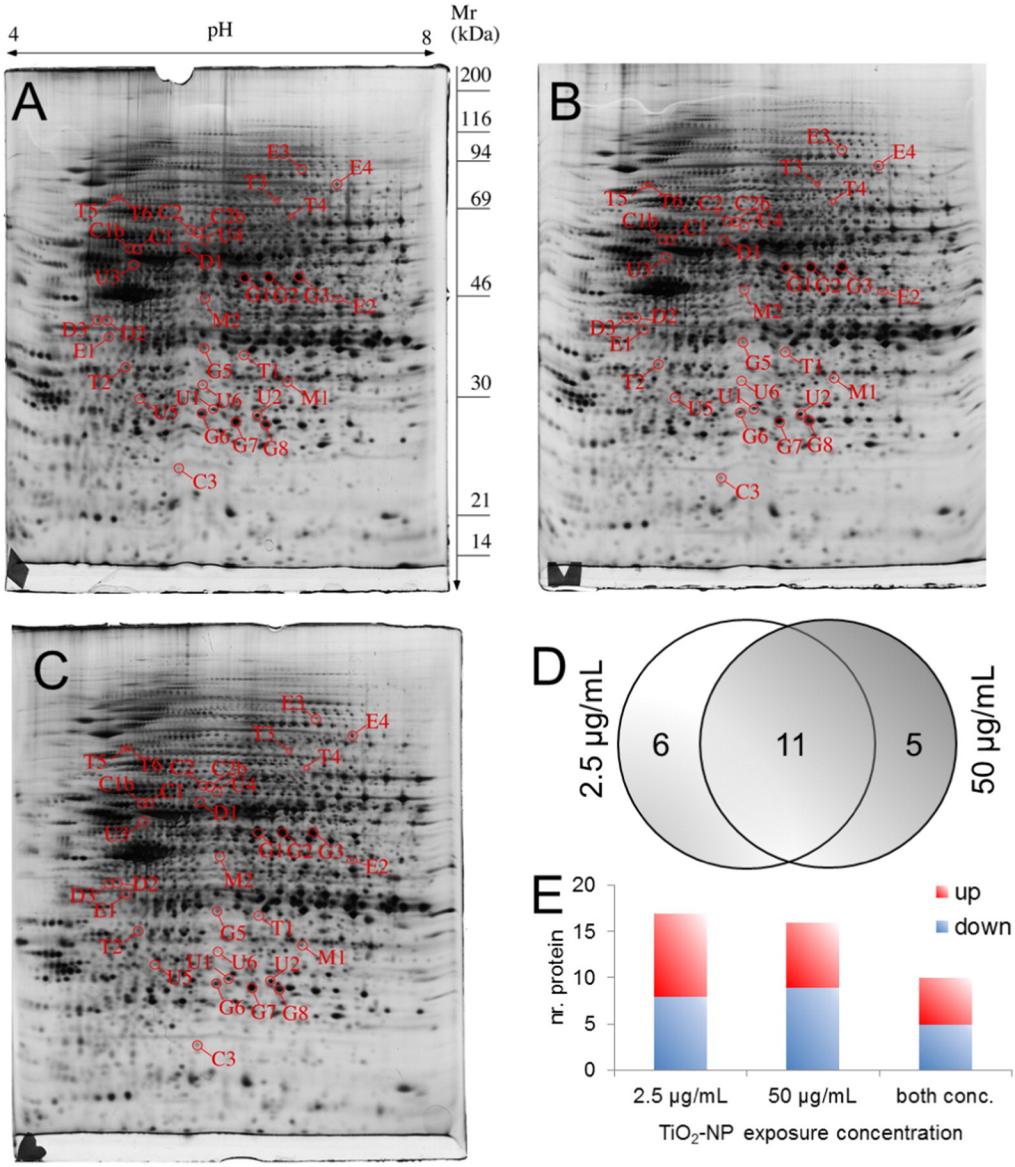


Fig. 1. Proteomic analysis of total cell extracts by 2D-gel electrophoresis. Total cell extracts were separated by two-dimensional gel electrophoresis. The first dimension covered a 4–8 pH range and the second dimension a 15–200 kDa range. Proteins were detected by silver staining. Total cellular proteins (150 µg) were loaded on the first dimension gel. (A) gel obtained from control cells; (B) gel obtained from cells treated with 2.5 µg/mL TiO_2-NPs for 2 months; (C) gel obtained from cells treated with 50 µg/mL TiO_2-NPs for 2 months. Arrows point to spots that show statistically significant changes between the different samples. Spot numbering is accessible in Table 1. (D) Venn diagram representing the number of gene products with modulated content in cells exposed for 2 months to 2.5 or 50 µg/mL TiO_2-NPs, as well as gene products modulated in common at both exposure concentrations. (E) Number of gene products with content up- or down-regulated in each exposure condition.

metabolic proteins is decreased abundance, suggesting that exposure to NPs could impair this function.

3.3. Proteasome activity

Since our proteomic results showed decreased content of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 (spot U3 in Fig. 1) we suspected that the activity of proteasome could be impacted in A549 cells chronically exposed to TiO_2-NPs, as already described in dopaminergic neurons acutely exposed to TiO_2-NPs [39]. Therefore we monitored the ability of cells chronically exposed to 2.5 or 50 µg/mL of TiO_2-NPs to survive to a non-lethal concentration of MG132, a potent proteasome inhibitor [40]. The objective was to detect cytotoxicity that would be due to additive proteasome inhibition by MG132 and by TiO_2-NPs, since excessive proteasome impairment is known to induce cell death [41]. On control cells, i.e. cells that were not exposed to TiO_2-NPs, MG132 was not cytotoxic (Fig. 3). Conversely, significant mortality was observed in cells previously exposed to 2.5 µg/mL TiO_2-NPs for 2 months then post-exposed to 10 and 50 nM MG132. In cells chronically exposed to 50 µg/mL TiO_2-NPs the mortality rate was higher as compared to 2.5 µg/mL TiO_2-NPs; in this condition MG132 was cytotoxic at both 10 and 50 nM. This confirms that NP exposure impaired proteasome activity, as anticipated from the proteomic results.

3.4. Mitochondrial activity

Two proteins implicated in mitochondrial transport were less abundant in cells chronically-exposed to TiO_2-NPs, according to our proteomic results: beta-lactamase-like protein 2 (spot M1 in Fig. 1) and mitochondrial import inner membrane translocase (spot M2). This suggests that mitochondrial activity may be impaired. We therefore measured mitochondrial membrane potential (ψ_m) which represents mitochondrial membrane polarization, a capital feature for ATP production. To do so, we measured the incorporation of rhodamine 123 in cells

Please cite this article as: L. Armand, et al., Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view, J Prot (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.006

Table 1
Proteins showing different contents in control cells vs. cells exposed to TiO_2-NPs, identified in the proteomic screen.[a]

Spot ID	Protein name	Accession number[a]	Molecular weight (Da)	Nr. unique peptide	Sequence coverage	2.5/Ctrl (Fold/T-test)	50/Ctrl (Fold/T-test)
DNA damage response							
D1	Serine/threonine-protein phosphatase 5	P53041	56,880	12	31.10%	1.644/0.02	1.235/0.21
D2	*Serine–threonine kinase receptor-associated protein*	Q9Y3F4	38,439	18	67.10%	1.503/0.043	1.637/0.004
D3	*Serine–threonine kinase receptor-associated protein*	Q9Y3F4	38,439	20	69.10%	1.322/0.115	1.536/0.014
Chaperones							
C1	Peptidyl–prolyl cis–trans isomerase FKBP4	Q02790	51,806	24	55.30%	1.544/0.034	1.185/0.047
C2	Peptidyl–prolyl cis–trans isomerase FKBP4	Q02790	51,806	23	62.70%	1.544/0.082	1.054/0.50
C3	T-complex protein 1 subunit gamma	P49368	60,535	22	42.40%	2.245/0.058	1.881/0.018
Mitochondrial activity							
M1	*Beta-lactamase-like protein 2*	Q53H82	32,807	13	54.90%	0.584/0.048	0.805/0.29
M2	*Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44*	O43615	51,357	10	24.80%	0.713/0.02	0.537/0.002
Gene expression							
E1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	P05198	36,113	22	64.40%	1.937/0.025	1.73/0.046
E2	Multifunctional protein ADE2	P22234	47,080	15	41.60%	0.964/0.91	1.891/0.032
E3	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	O43143	91,009	19	25.20%	1.692/0.027	1.195/0.244
Trafficking							
T1	Calponin-2	Q99439	33,698	7	31.40%	0.478/0.048	0.796/0.152
T2	Annexin A4	P09525	35,884	10	35.40%	0.501/0.031	0.768/0.021
T3	Vesicle-fusing ATPase	P46459	82,597	15	21.90%	2.263/0.024	1.524/0.15
T4	Kinesin light chain 2	Q9H0B6	68,936	10	17.40%	0.342/0.03	0.552/0.063
T5	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	Q13409	68,377	9	17.60%	1.619/0.034	1.446/0.068
T6	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	Q13409	68,377	9	19.80%	1.200/0.62	1.065/0.87
Glucose metabolism							
G1	*Alpha-enolase*	P06733	47,170	34	73%	1.12/0.58	0.81/0.16
G2	*Alpha-enolase*	P06733	47,170	33	75.00%	1.11/0.52	0.94/0.61
G3	*Alpha-enolase*	P06733	47,170	37	77%	1.14/0.53	0.9/0.63
G4	Malate dehydrogenase cytoplasmic	P40925	36,427	4	14.10%	0.513/0.026	0.798/0.11
G5	Triosephosphate isomerase	P60174	30,791	15	21.90%	0.592/0.01	0.759/0.017
G6	Triosephosphate isomerase	P60174	30,791	24	71.00%	0.86/0.17	1.0/1
G7	Triosephosphate isomerase	P60174	30,791	25	71%	0.94/0.7	1.07/0.65
Miscellaneous							
U1	Peroxiredoxin-6	P30041	25,036	11	48.20%	0.612/0.009	0.941/0.566
U2	Peroxiredoxin-6	P30041	25,036	16	56%	1.095/0.19	0.93/0.38
U3	*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5*	Q16401	56,197	17	44.20%	0.885/0.67	0.529/0.04
U4	Retinal dehydrogenase 1	P00352	54,863	16	40.50%	0.681/0.11	0.574/0.017
U5	Chloride intracellular channel protein 4	Q9Y696	28,774	14	67.20%	0.931/0.84	1.574/0.02
U6	Omega-amidase NIT2	Q9NQR4	30,609	10	45.30%	0.756/0.82	0.499/0.045

[a] The accession numbers are those of the SwissProt Database. The proteins directly or indirectly validated are in italics in the table.

exposed to 0, 1, 2.5, 5, 10 or 50 μg/mL of TiO_2-NPs. We observed a concentration-dependent increase of its incorporation in cells exposed to 5, 10 and 50 μg/mL TiO_2-NPs (Fig. 4A) which proves that long-term exposure to TiO_2-NPs induced mitochondrial membrane hyperpolarization. This increase confirms that NP exposure impairs global mitochondrial activity, as suggested by the proteomic results.

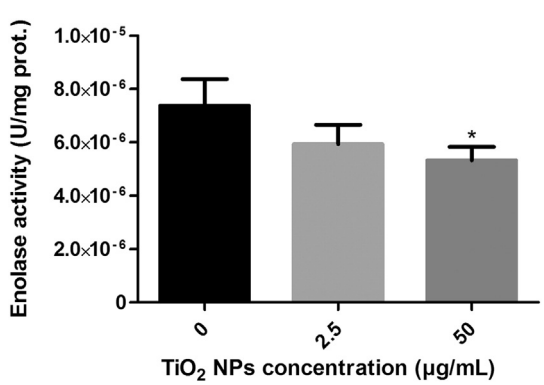


Fig. 2. Enolase activity. Enolase activity was measured in extracts of cells exposed to 0, 2.5 or 50 μg/mL TiO_2-NPs, and normalized with respect to protein content. Results are presented as the mean of 4 points ± SEM. *: $p < 0.05$ vs. control.

Classically, defective mitochondria are selectively removed from cells via mitophagy, which is a specific type of autophagy, in order to prevent cell degeneration [42]. The presence of mitochondria with

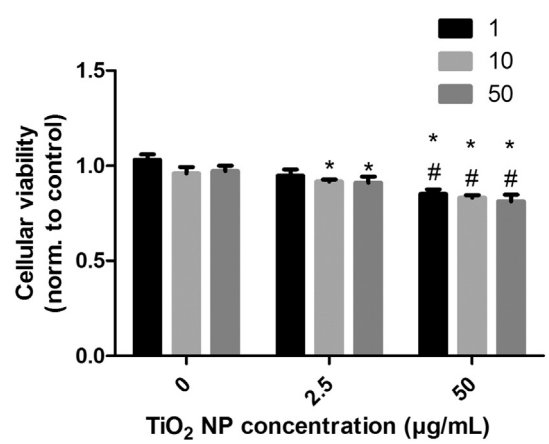


Fig. 3. Proteasome role as a survival factor during NPs treatment. Following exposure to 0, 2.5 or 50 μg/mL TiO_2-NPs, cells were treated for 6 additional hours with 1, 10 or 50 nM of the proteasome inhibitor MG132. Cell viability was measured using the MTT assay. Results were normalized to control (without NPs or MG132) and are presented as the mean of 6 points ± SEM. *: $p < 0.05$ vs. control; #: $p < 0.05$ vs. 2.5 μg/mL NP concentration at equivalent MG132 concentration.

Please cite this article as: L. Armand, et al., Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view, J Prot (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.006

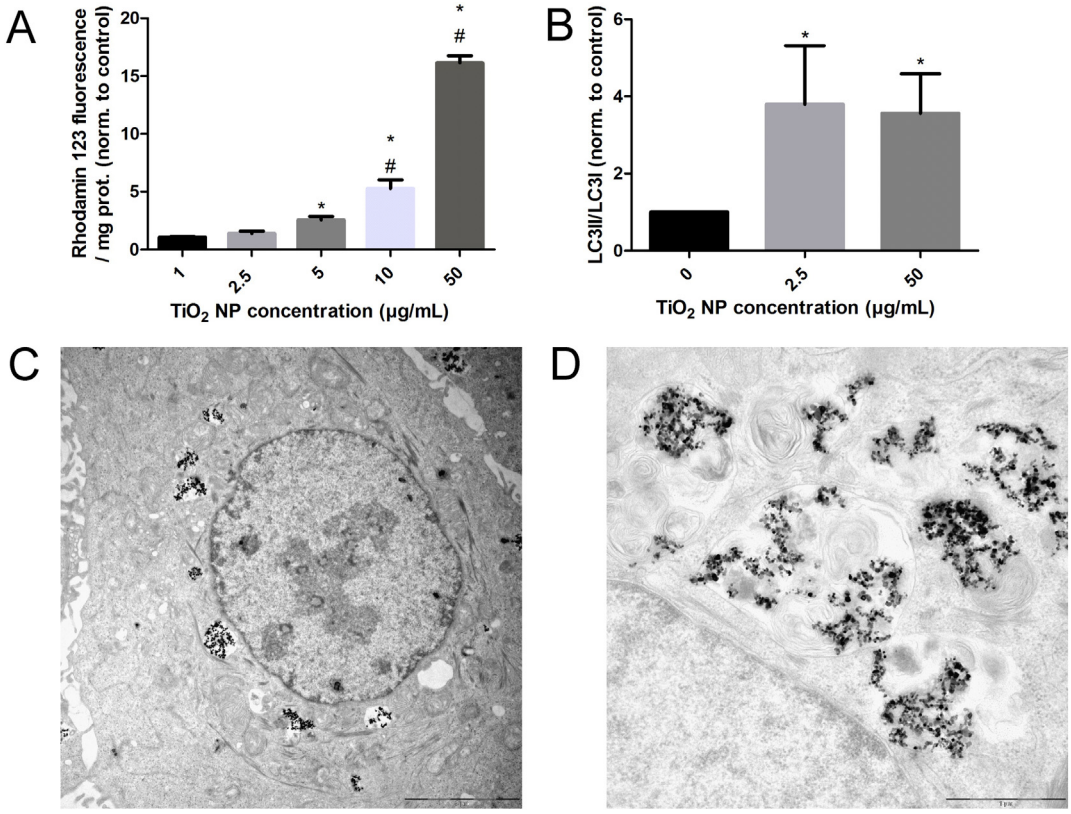


Fig. 4. Mitochondrial activity impairment and induction of autophagy. (A) Mitochondrial membrane potential of cells exposed to TiO_2-NPs assessed using rhodamine 123. After NP exposure, cells were exposed to 1 μM rhodamine 123 for 30 min. (B) LC3-I and LC3-II contents in A549 cells chronically exposed to 2.5 or 50 μg/mL TiO_2-NPs for 2 months. Results were normalized with respect to control data and are presented as the mean of 3 replicates ± SEM. *: $p < 0.05$ vs. control. (C–D) TEM images of A549 cells exposed to 50 μg/mL TiO_2-NPs for 2 months.

altered functions in cells chronically exposed to TiO_2-NPs suggests that autophagy might be defective. To confirm this hypothesis we monitored the conversion of the cytoplasmic LC3-I into LC3-phosphatidylethanolamine (LC3-II) which is then recruited to the membranes of autophagosomes (Fig. 4B). In addition we investigated the presence of autophagosomes by transmission electron microscopy (Fig. 4C–D) in cells chronically exposed to 2.5 or 50 μg/mL TiO_2-NPs and control cells. We observed the presence of multiple autolysosomes containing agglomerates of nanoparticles (Fig. 4B–C) together with multilamellar bodies. Moreover the conversion of LC3-II to LC3-I increased in cells exposed for 2 months to both 2.5 and 50 μg/mL TiO_2-NPs, suggesting that autophagy was induced.

3.5. DNA damage response and its consequences

Our proteomic results displayed increased levels of 2 protein species of serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP, spots D2-D3). STRAP has 2 roles: first, it stabilizes the tumor-suppressor p53 coactivators, p300 and JMY, so that they activate p53 [43]; second it acetylates p53 activating its inductive activity on DNA transcription [43]. Therefore, increased STRAP abundance could lead to p53 acetylation. As p53 acetylation is mediated by its phosphorylation [44], we monitored both p53 phosphorylation and acetylation by Western Blot after a 2 month exposure to 0, 1, 2.5, 5, 10 or 50 μg/mL TiO_2-NPs (Fig. 5A). We observed a significant increase in both post-translational modifications for all concentrations, except p53 phosphorylation at 1 μg/mL NPs. We therefore demonstrated the activation of the p53 signaling pathway in cells chronically exposed to TiO_2-NPs, confirming the effect that we anticipated from increased levels of STRAP.

Acetylation of p53 can lead to p21 activation, which in turn induces cell cycle arrest in G1 phase [45]. In addition another DNA damage-signaling protein highlighted by the proteomic results is protein phosphatase 5 (PP5, spot D1) which is also implicated in cell cycle regulation [46]. Taken together, these results suggest that NP exposure could impact cell cycle. To confirm this hypothesis we monitored the cell cycle in cells exposed to 0, 1, 2.5, 5, 10 or 50 μg/mL TiO_2-NPs (Fig. 5B). The proportion of cells in the G1 phase was moderately but significantly higher when cells had been chronically exposed to 50 μg/mL TiO_2-NPs, as compared to control cells. This increase was correlated with a decreased proportion of cells in the S phase after 2 months of exposure to 10 and 50 μg/mL NPs. This proves that cells encountered a moderate but significant slowdown of cell cycle progression following a concentration-dependent trend, confirming our hypothesis. We then investigated if this cell cycle slowing down had physiological consequences on cell proliferation (Fig. 5C). We observed a concentration-dependent decrease of the cell proliferation rate in cells exposed 2.5, 5, 10 or 50 μg/mL TiO_2-NPs, confirming the physiological consequences of cell cycle modification caused by chronic exposure to TiO_2-NPs.

4. Discussion

This article describes the effects of long-term exposure of A549 cells to 2.5 and 50 μg/mL TiO_2-NPs, two concentrations which can be considered as a low and a high exposure concentration. Cell response was assessed using 2D-gel proteomics analyses coupled to functional validation which, to enrich their strength, were for some of them also carried out in cells exposed for 2 months to 1, 5 and 10 μg/mL TiO_2-NPs.

We report significant modulation of abundance of only 22 protein species. In this respect, we observed several different cases when proteins were represented by several spots on the 2D gels. In the case of enolase, all the three spots decreased each in a weakly significant way, but the congruence of all variations became much more significant on

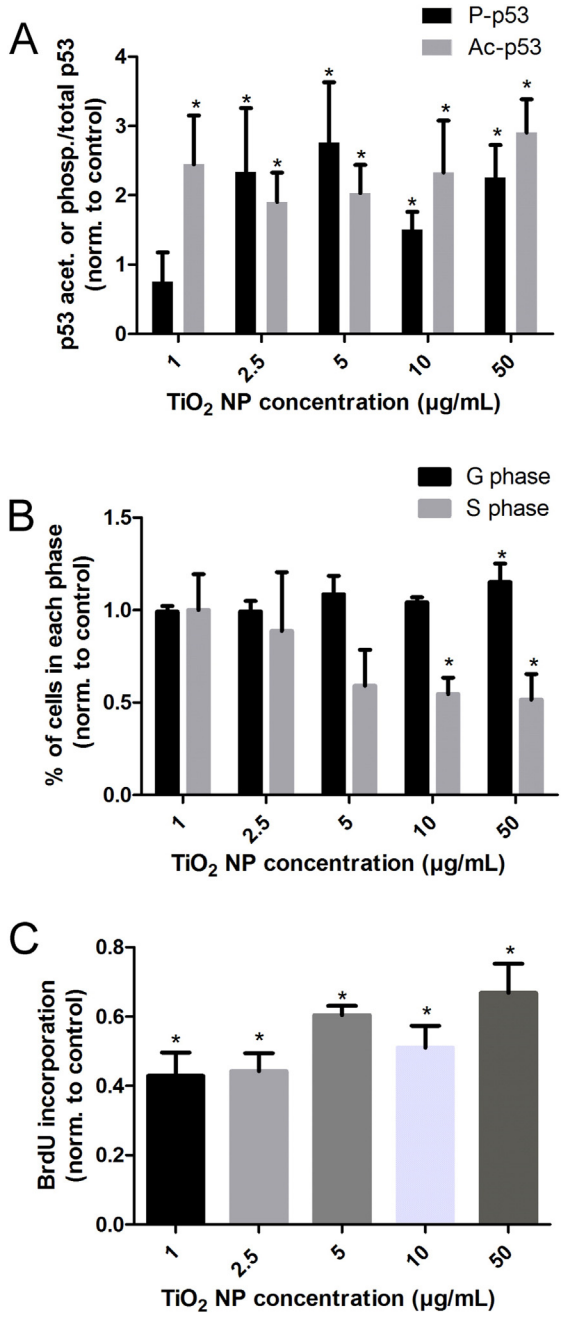


Fig. 5. Induction of a DNA damage response. Post-translational modifications of p53 were assessed by Western Blot after exposure TiO_2-NPs. (A) Phosphorylation and acetylation data were reported to total p53 content, and normalized with respect to protein quantification using Stain-Free™ technology and to extracts of control cells. Results are presented as the mean of 3 points ± SEM. *: $p < 0.05$ vs. control. (B) Cell cycle analysis, showing percentage cells in the G1 phase and in the S phase compared to total cell number. Data were reported to the control. Results are presented as mean of 4 points ± SEM. *: $p < 0.05$ vs. control. (C) Cell proliferation after exposure to TiO_2-NPs, monitored by the BrdU incorporation assay. Results were reported to control data and are presented as the mean of 4 points ± SEM. *: $p < 0.05$ vs. control.

a statistical point of view. We also observed cases where one modified (altered pI) spot was statistically significantly modulated, but the most abundant, basic spot(s) was(were) unchanged (dynein, triosephosphate isomerase, FKBP4, peroxiredoxin 6). Lastly, we also observed cases where all detected spots were significantly changed in the same direction (STRAP). This shows the complexity of the regulations phenomena that can be detected at the protein species level.

Compared to these 22 protein species, most proteomic studies related to the impact of acute exposure to TiO_2-NPs report a more intense cellular response, this discrepancy can easily be explained by the different exposure protocols, i.e. acute vs. chronic exposure and exposure medium containing vs. lacking FBS [9–12]. Moreover, this is certainly explained by the different cell models used in these different studies. Indeed, none of them were carried out on A549 cells. The different responses of different cell lines, but also of cell lines as compared to primary cells, have been largely reported. For instance a recent article shows that, among lung cell models, A549 and BEAS-2B respond differently and also respond differently from normal human primary bronchial epithelial cells (NHBE) [47]. A549 is from alveolar origin while BEAS-2B and NHBE originate from bronchial tubes. Moreover A549 originate from a lung carcinoma while BEAS-2B is a normal cell line transformed by SV40 and NHBE are non-immortalized, normal cells. Moreover A549 cells carry a number of mutations (for details see the COSMIC database, http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic). All these differences can explain their different responses.

We show that the cellular response to chronic exposure to both concentrations of TiO_2-NPs mostly consists in common elements. Indeed the content of 11 proteins, related to 6 functional categories, is modulated in both exposure conditions. The content of 6 and 5 proteins, related to the same 6 functional categories, is modulated in cells exposed to 2.5 µg/mL TiO_2-NPs only or 50 µg/mL TiO_2-NPs only, respectively. Interestingly, the modulation follows the same trend at both concentrations, i.e. when protein content was increased in cells exposed to 2.5 µg/mL TiO_2-NPs it was generally also increased in cells exposed to 50 µg/mL and reversely. Still the modulation is more intense in cells exposed to 2.5 µg/mL TiO_2-NPs than in cells exposed to 50 µg/mL TiO_2-NPs. Chronicity and low TiO_2-NP concentration would thus induce a stronger molecular response of exposed cells, possibly because at this low concentration cells maintain their optimal capacity to adapt to this external repeated stress. This underlines the necessity to use realistic, low-concentrations of NPs when assessing the biological impact of NPs, particularly when probing the level of modulation of a specific pathway. This also highlights that exposure to a high concentration of NPs makes possible the identification of cellular structures and functions that are also affected at more realistic, low concentrations. Consequently, in our exposure conditions, high exposure concentration is predictive of the cellular pathways that are affected in the more realistic, low concentration exposure condition. Our functional experiments also show that the same functions are affected in cells exposed at high and low concentrations of NPs.

We report here that chronic exposure to TiO_2-NPs causes activation of the DNA damage response pathway, via p53 activation, leading to impairment of cell cycle progression and cell proliferation. In this context, an important point to keep in mind is that A549 cells present a p53 wild type phenotype (http://www.lgcstandards-atcc.org/~/media/2B3C84F951E24E668C78EB70809C7613.ashx) even though they arise from a carcinoma. Thus, investigating the function of p53 with this model is appropriate. P53 is a central player in the DNA damage response. Its activation can be directly caused by the DNA damage that we and others previously reported in cells exposed to TiO_2-NPs either acutely [4,21,48] or chronically [13] and which is characterized by oxidative lesions and DNA strand breaks, including double-strand breaks that may result from the duplication of cells with replication fork blockade [48]. It may also be linked to the impaired glucose metabolism that our proteomics results reveal; indeed p53 is also activated upon cell starvation and metabolic stress [49]. Its activation can lead to cell cycle arrest, senescence or apoptosis, depending on the mode of activation and DNA damage duration [50]. In our experiments, activation of p53 is correlated with increased content of STRAP in cells chronically exposed to TiO_2-NPs, which suggest that p53 is activated via the ATM pathway [51]. STRAP is a cofactor of p53 which stabilizes it by antagonizing Mdm2 and by stabilizing JMY and p300, two other cofactors of p53. Moreover STRAP activity enhances p53 acetylation, which activates p53-mediated transcription. By increasing STRAP intracellular content, chronic exposure to TiO_2-NPs thus induces DNA damage response,

which may lead to the transcription of DNA repair genes. Finally phosphorylation of p53 [52] cell proliferation impairment [53] and activation of the ATM pathway [54] have already been observed in targeted, non-proteomic studies, evaluating the impact of acute exposure to NPs on other cell models. We thus show here that activation of p53 is also a significant determinant of the impact of long-term exposure to TiO_2-NPs of A549 lung cells.

We also report here decreased contents of two mitochondrial enzymes, together with hyperpolarization of mitochondrial membrane which signs mitochondrial activity impairment. Hyperpolarization of mitochondria also occurs in cells exposed to a variety of small molecules [55], to rapamycin [56], salinomycin [57] and glutamate [58]. It can be due to either increased proton pumping by increased activity of respiratory enzyme complexes, blockade of electron transfer, blockade of the use of protons by enzymes within the mitochondria or change in the mitochondrial pH, leading to membrane potential modifications. Mitochondrial damage is often correlated with the onset of autophagy [56,57] which has largely been described as a mechanism of NP toxicity upon acute exposure of mammalian cells, in vitro [59] and particularly in cells acutely exposed to TiO_2-NPs [60]. It may be an attempt to eliminate damaged organelles, particularly the damaged mitochondria. Indeed damaged mitochondria are classically eliminated via mitophagy, which is a specialized type of autophagy [42]. It may also be a way to sequester and discard NPs accumulated in the cytoplasm, which is supported by our TEM observations showing cells containing numerous autolysosomes filled with NPs. Mitochondrial damage is related to oxidative stress, since mitochondria and the respiration are the main source of endogenous reactive oxygen species (ROS) in mammalian cells. Perturbation of mitochondrial activity may lead to the accumulation of ROS that was previously reported after acute [4,21,48] or chronic [13,15] exposure to TiO_2-NPs, which correlated well with the onset of oxidative damage of DNA [21,48]. Still, here we report decreased abundance of only one protein species related to oxidative stress response, peroxiredoxin-6. However, neither the more abundant spot of the same protein nor the levels of the other peroxiredoxins were modified upon TiO_2 treatment suggesting a low level of oxidative stress, i.e. efficient scavenging of the ROS produced in cells upon long-term exposure to TiO_2-NPs.

Broadly speaking, decreased glucose metabolism, along with decreased proteasome and mitochondrial activity suggests global cell impairment. Increased content of molecular chaperones confirms the presence of a context of cellular stress [61] which might be linked with the activation of the DNA damage response pathway. All these modifications might lead to the decrease of cell proliferation that we report here. However the absence of overt cytotoxicity, associated with the increased content of proteins involved in gene expression also suggest that cells are fighting this stress and might recover over time. Moreover, in addition to being a general stress response, increased chaperone contents might be linked either with increased gene expression or with the compensation of decreased proteasome activity. Indeed a decrease of proteasomal activity will result in higher levels of unfolded proteins to be handled by chaperones, as previously described in other contexts of cellular stress [62] and among them in neuron cells acutely exposed to TiO_2-NPs [39]. It again suggests that the cellular response to acute TiO_2-NP exposure reflects well the cellular response to a more realistic long-term exposure.

Lastly, we report modulations of abundances of proteins involved in cell trafficking. We observed a decreased content of calponin-2, a protein that is involved in cell motility and cytokinesis [63] and a decreased abundance of annexin A4, which plays a role in exocytosis [64]. These two proteins are involved in exchange mechanisms with the environment of the cell; the results reported here thus suggest that cells chronically-exposed to TiO_2-NPs reduce their communication with the extracellular compartment due to the intracellular stress [65]. On the other hand, we observe a decreased content of vesicle-fusing ATPase, kinesin light chain 2 and increased content of the acidic, activated form of dynein [66]. These proteins are involved in intracellular transport [66,67]. This suggests that cells chronically exposed to TiO_2-NPs tend to limit their interactions with their environment and to modulate intracellular transport. It can be interpreted as a defense mechanism, comparable to the increased abundance of chaperones proteins.

The categories of proteins reported here as being impacted by long-term exposure to TiO_2-NPs, particularly mitochondrial activity, trafficking, and glucose metabolism have also been identified by proteomics in cells acutely exposed to TiO_2-NPs [9–12]. In spite of these similarities, the DNA damage response activation that we observe here was either absent or very attenuated in these other studies. The only study mentioning DNA damage is the one by Tilton et al. [12]. Instead, these papers displayed increased contents of proteins involved in the apoptotic pathway [9–12] which is a feature that we do not observe. Apoptosis often occurs in cells encountering non-repaired DNA damage, and one could speculate that cells chronically exposed to TiO_2-NPs might to some extent efficiently repair DNA damage therefore preventing apoptosis, contrary to cells acutely exposed to higher, toxic concentrations of TiO_2-NPs. This observation is in line with the hypothesis that cells exposed to a low, sub-toxic concentration of NPs are able to efficiently face this stress that may eventually trigger an adaptive response.

Lastly, new mechanisms emerge from this study when comparing the pathways identified here by proteomics analysis to those already described and resulting from targeted experiments [13–16]. The principal mechanisms described to date were over-production (or not) of ROS [13,15,16], genotoxicity or no DNA damage [13,16], tumorigenesis and cell transformation [13,16], as well as impairment of cell cycle progression [13–15] by inhibition of mitotic progression [13]. We report here that cell cycle progression impairment is certainly linked to the DNA damage response which is activated via production of STRAP and phosphorylation/acetylation of p53; and that it ultimately leads to reduced cell proliferation and DNA repair. We also show mitochondrial impairment, which might cause or be caused by the oxidative stress that is very classically reported in cells exposed to TiO_2-NPs and which might itself cause the initiation of autophagy and/or mitophagy. In this global scene we also show altered proteasome activity and glucose metabolism, activation of the production of chaperones as well as reduced trafficking towards the extracellular compartment, signing a defense mechanism. This study thus made possible the identification of new modes of action of TiO_2-NPs upon chronic exposure.

5. Conclusions

This study gives new insights in TiO_2-NP toxicity upon long-term exposure. At rather small, non-cytotoxic concentrations, several biological pathways are altered including mitochondrial activity or glucose metabolism. In addition the activation of DNA damage responses and its biological consequences in terms of p53 activation, cell cycle modification and cell proliferation strongly suggest a cellular stress, even at the lowest concentration of NPs. However, the absence of apoptosis-related protein induction and cytotoxicity, along with the increased contents of proteins and chaperone-related proteins, suggests that cells are fighting against this stress. Finally we show that the use of high exposure concentrations is predictive of the cellular response to lower, more realistic exposure concentrations. Still we observed that the lowest concentrations and longest exposure periods induced the more intense cellular response. Taken together, these data suggest that long-term exposure to low concentrations of TiO_2-NPs may induce cell adaptation but not overt mortality.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Please cite this article as: L. Armand, et al., Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view, J Prot (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.006

Acknowledgments

This work was funded by CEA through the Nanoscience and Toxicology research programs, and via the European Commission's 7th Framework Programme project NanoMILE (Contract No. NMP4-LA-2013-310451). It is a contribution to the Labex Serenade (no. ANR-11-LABX-0064) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program of the French National Research Agency (ANR) through the A*MIDEX project (no. ANR-11-IDEX-0001-02). We also thank the Proteomexchange/PRIDE team for providing public access to our data [67].

References

[1] C.O. Robichaud, A.E. Uyar, M.R. Darby, L.G. Zucker, M.R. Wiesner, Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO_2 production as a basis for exposure assessment, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 4227–4233.
[2] G. Oberdorster, E. Oberdorster, J. Oberdorster, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, Environ. Health Perspect. 113 (2005) 823–839.
[3] D. Loomis, Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, et al., The carcinogenicity of outdoor air pollution, Lancet Oncol. 14 (2013) 1262–1263.
[4] H. Shi, R. Magaye, V. Castranova, J. Zhao, Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data, Part. Fibre Toxicol. 10 (2013).
[5] M.C. Bernier, M. Besse, M. Vayssade, S. Morandat, K. El Kirat, Titanium dioxide nanoparticles disturb the fibronectin-mediated adhesion and spreading of pre-osteoblastic cells, Langmuir 28 (2012) 13660–13667.
[6] S.G. Zarogiannis, A.S. Filippidis, S. Fernandez, A. Jurkuvenaite, N. Ambalavanan, A. Stanishevsky, et al., Nano-TiO(2) particles impair adhesion of airway epithelial cells to fibronectin, Respir. Physiol. Neurobiol. 185 (2013) 454–460.
[7] Y. Zhao, J.L. Howe, Z. Yu, D.T. Leong, J.J. Chu, J.S. Loo, et al., Exposure to titanium dioxide nanoparticles induces autophagy in primary human keratinocytes, Small 9 (2013) 387–392.
[8] S. Triboulet, C. Aude-Garcia, L. Armand, V. Collin-Faure, M. Chevallet, H. Diemer, et al., Comparative proteomic analysis of the molecular responses of mouse macrophages to titanium dioxide and copper oxide nanoparticles unravels some toxic mechanisms for copper oxide nanoparticles in macrophages, PLoS One 10 (2015) 2015.
[9] Y. Ge, M. Bruno, K. Wallace, W. Winnik, R.Y. Prasad, Proteome profiling reveals potential toxicity and detoxification pathways following exposure of BEAS-2B cells to engineered nanoparticle titanium dioxide, Proteomics 11 (2011) 2406–2422.
[10] Y. Gao, N.V. Gopee, P.C. Howard, L.R. Yu, Proteomic analysis of early response lymph node proteins in mice treated with titanium dioxide nanoparticles, J. Proteomics 74 (2011) 2745–2759.
[11] J. Sund, J. Palomaki, N. Ahonen, K. Savolainen, H. Alenius, A. Puustinen, Phagocytosis of nano-sized titanium dioxide triggers changes in protein acetylation, J. Proteomics 108 (2014) 469–483.
[12] S.C. Tilton, N.J. Karin, A. Tolic, Y. Xie, X. Lai, R.F. Hamilton Jr., et al., Three human cell types respond to multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanobelts with cell-specific transcriptomic and proteomic expression patterns, Nanotoxicology 8 (2014) 533–548.
[13] S. Huang, P.J. Chueh, Y.-W. Lin, T.-S. Shih, S.-M. Chuang, Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO_2 long-term exposure, Toxicol. Appl. Pharmacol. 241 (2009) 182–194.
[14] P. Kocbek, K. Teskac, M.E. Kreft, J. Kristl, Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO_2 nanoparticles, Small 6 (2010) 1908–1917.
[15] S. Wang, L.A. Hunter, Z. Arslan, M.G. Wilkerson, J.K. Wickliffe, Chronic exposure to nanosized, anatase titanium dioxide is not cyto- or genotoxic to Chinese hamster ovary cells, Environ. Mol. Mutagen. 52 (2011) 614–622.
[16] G. Vales, L. Rubio, R. Marcos, Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells, Nanotoxicology 19 (2014) 1–11.
[17] Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection, Ann. ICRP 24 (1994) 1–482.
[18] T. Rabilloud, P. Lescuyer, Proteomics in mechanistic toxicology: history, concepts, achievements, caveats, and potential, Proteomics 15 (2015) 1051–1074.
[19] A. Simon-Deckers, B. Gouget, M. Mayne-L'Hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud, M. Carriere, In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes, Toxicology 253 (2008) 137–146.
[20] E. Brun, F. Barreau, G. Veronesi, B. Fayard, S. Sorieul, C. Chaneac, et al., Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia, Part. Fibre Toxicol. 11 (2014) 1743–8977.
[21] M.-L. Jugan, S. Barillet, A. Simon-Deckers, N. Herlin-Boime, S. Sauvaigo, T. Douki, et al., Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells, Nanotoxicology 6 (2012) 501–513.
[22] S. Triboulet, C. Aude-Garcia, L. Armand, A. Gerdil, H. Diemer, F. Proamer, et al., Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach, Nanoscale 6 (2014) 6102–6114.
[23] E. Gianazza, F. Celentano, S. Magenes, C. Ettori, P.G. Righetti, Formulations for immobilized pH gradients including pH extremes, Electrophoresis 10 (1989) 806–808.
[24] T. Rabilloud, C. Valette, J.J. Lawrence, Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension, Electrophoresis 15 (1994) 1552–1558.
[25] T. Rabilloud, C. Adessi, A. Giraudel, J. Lunardi, Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, Electrophoresis 18 (1997) 307–316.
[26] S. Luche, H. Diemer, C. Tastet, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner, et al., About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis, Proteomics 4 (2004) 551–561.
[27] A. Gorg, W. Postel, S. Gunther, J. Weser, J.R. Strahler, S.M. Hanash, et al., Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations, Electrophoresis 9 (1988) 37–46.
[28] C. Tastet, P. Lescuyer, H. Diemer, S. Luche, A. van Dorsselaer, T. Rabilloud, A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins, Electrophoresis 24 (2003) 1787–1794.
[29] M. Chevallet, S. Luche, T. Rabilloud, Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, Nat. Protoc. 1 (2006) 1852–1858.
[30] U. Consortium, UniProt: a hub for protein information, Nucleic Acids Res. 43 (2015) 27.
[31] J.A. Vizcaino, E.W. Deutsch, R. Wang, A. Csordas, F. Reisinger, D. Rios, et al., ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination, Nat. Biotechnol. 32 (3) (Mar 2014) 223–226, http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2839.
[32] I. Pal-Bhowmick, K. Sadagopan, H.K. Vora, A. Sehgal, S. Sharma, G.K. Jarori, Cloning, over-expression, purification and characterization of *Plasmodium falciparum* enolase, Eur. J. Biochem. 271 (2004) 4845–4854.
[33] A.S. Unnithan, H.J. Choi, A.M. Titler, J.M. Posimo, R.K. Leak, Rescue from a two hit, high-throughput model of neurodegeneration with N-acetyl cysteine, Neurochem. Int. 61 (2012) 356–368.
[34] S. Triboulet, C. Aude-Garcia, M. Carriere, H. Diemer, F. Proamer, A. Habert, et al., Molecular responses of mouse macrophages to copper and copper oxide nanoparticles inferred from proteomic analyses, Mol. Cell. Proteomics 12 (2013) 3108–3122.
[35] M. Dorier, E. Brun, G. Veronesi, F. Barreau, K. Pernet-Gallay, C. Desvergne, et al., Impact of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles on uptake carriers and efflux pumps in Caco-2 gut epithelial cells, Nanoscale 7 (2015) 7352–7360.
[36] C. Hoogland, K. Mostaguir, J.C. Sanchez, D.F. Hochstrasser, R.D. Appel, SWISS-2DPAGE, ten years later, Proteomics 4 (2004) 2352–2356.
[37] D.F. Winkler, P.L. McGeer, Protein labeling and biotinylation of peptides during spot synthesis using biotin p-nitrophenyl ester (biotin-ONp), Proteomics 8 (2008) 961–967.
[38] N. Jehmlich, K.H. Dinh, M. Gesell-Salazar, E. Hammer, L. Steil, V.M. Dhople, et al., Quantitative analysis of the intra- and inter-subject variability of the whole salivary proteome, J. Periodontal Res. 48 (2013) 392–403.
[39] J. Wu, H. Xie, Effects of titanium dioxide nanoparticles on alpha-synuclein aggregation and the ubiquitin–proteasome system in dopaminergic neurons, Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 11 (2014) 1–5.
[40] D.H. Lee, A.L. Goldberg, Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists, Trends Cell Biol. 8 (1998) 397–403.
[41] Y.H. Han, W.H. Park, Proteasome inhibitor MG132 reduces growth of As4.1 juxtaglomerular cells via caspase-independent apoptosis, Arch. Toxicol. 84 (2010) 689–698.
[42] S.R. Yoshii, N. Mizushima, Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy, Biochim. Biophys. Acta (Jan 26 2015)http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.013 (pii: S0167-4889(15)00022-1).
[43] C. Demonacos, M. Krstic-Demonacos, L. Smith, D. Xu, D.P. O'Connor, M. Jansson, et al., A new effector pathway links ATM kinase with the DNA damage response, Nat. Cell Biol. 6 (2004) 968–976.
[44] K. Sakaguchi, J.E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, et al., DNA damage activates p53 through a phosphorylation–acetylation cascade, Genes Dev. 12 (1998) 2831–2841.
[45] K.F. Macleod, N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, et al., p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage, Genes Dev. 9 (1995) 935–944.
[46] T.D. Hinds Jr., E.R. Sanchez, Protein phosphatase 5, Int. J. Biochem. Cell Biol. 40 (2008) 2358–2362.
[47] B. Ekstrand-Hammarstrom, C.M. Akfur, P.O. Andersson, C. Lejon, L. Osterlund, A. Bucht, Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B, Nanotoxicology 6 (2012) 623–634.
[48] K. Kansara, P. Patel, D. Shah, R.K. Shukla, S. Singh, A. Kumar, et al., TiO_2 nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells, Environ. Mol. Mutagen. 56 (2015) 204–217.
[49] D. Khan, A. Katoch, A. Das, A. Sharathchandra, R. Lal, P. Roy, et al., Reversible induction of translational isoforms of p53 in glucose deprivation, Cell Death Differ. 2015 (2015) 220.
[50] D. Speidel, The role of DNA damage responses in p53 biology, Arch. Toxicol. 89 (2015) 501–517.
[51] Y. Shiloh, Y. Ziv, The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14 (2013) 197–210.
[52] E. Belade, S. Chrusciel, L. Armand, A. Simon-Deckers, C. Bussy, P. Caramelle, et al., The role of p53 in lung macrophages following exposure to a panel of manufactured nanomaterials, Arch. Toxicol. 2014 (2014) 7.

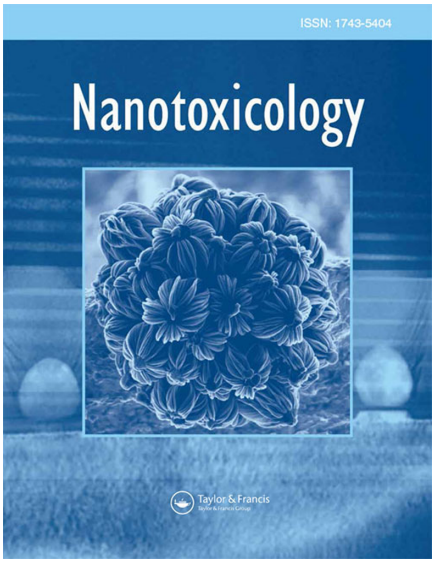
ARTICLE IN PRESS

[53] S.G. Marquez-Ramirez, N.L. Delgado-Buenrostro, Y.I. Chirino, G.G. Iglesias, R. Lopez-Marure, Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells, Toxicology 302 (2012) 146–156.
[54] R.Y. Prasad, P.D. Chastain, N. Nikolaishvili-Feinberg, L. Smeester, W.K. Kaufmann, R.C. Fry, Titanium dioxide nanoparticles activate the ATM-Chk2 DNA damage response in human dermal fibroblasts, Nanotoxicology 7 (2013) 1111–1119.
[55] C.R. Montague, A. Fitzmaurice, B.M. Hover, N.A. Salazar, J.P. Fey, Screen for small molecules increasing the mitochondrial membrane potential, J. Biomol. Screen. 19 (2014) 387–398.
[56] S. Paglin, N.Y. Lee, C. Nakar, M. Fitzgerald, J. Plotkin, B. Deuel, et al., Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells, Cancer Res. 65 (2005) 11061–11070.
[57] J.R. Jangamreddy, S. Ghavami, J. Grabarek, G. Kratz, E. Wiechec, B.A. Fredriksson, et al., Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells, Biochim. Biophys. Acta 2013 (2013) 2057–2069.
[58] S. Kumari, S.L. Mehta, P.A. Li, Glutamate induces mitochondrial dynamic imbalance and autophagy activation: preventive effects of selenium, PLoS One 7 (2012) 19.
[59] S.T. Stern, P.P. Adiseshaiah, R.M. Crist, Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity, Part. Fibre Toxicol. 9 (2012) 1743–8977.
[60] Y. Tang, F. Wang, C. Jin, H. Liang, X. Zhong, Y. Yang, Mitochondrial injury induced by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats, Environ. Toxicol. Pharmacol. 36 (2013) 66–72.
[61] B. Kalmar, L. Greensmith, Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress, Adv. Drug Deliv. Rev. 61 (2009) 310–318.
[62] C. Esser, S. Alberti, J. Hohfeld, Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system, Biochim. Biophys. Acta 29 (2004) 1–3.
[63] K.C. Wu, J.P. Jin, Calponin in non-muscle cells, Cell Biochem. Biophys. 52 (2008) 139–148.
[64] A. Willshaw, K. Grant, J. Yan, N. Rockliffe, S. Ambavarapu, G. Burdyga, et al., Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin, FEBS Lett. 559 (2004) 13–21.
[65] D.J. Keating, Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases, J. Neurochem. 104 (2008) 298–305.
[66] P.S. Vaughan, J.D. Leszyk, K.T. Vaughan, Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin, J. Biol. Chem. 276 (2001) 26171–26179.
[67] N. Hirokawa, Y. Noda, Y. Tanaka, S. Niwa, Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10 (2009) 682–696.

Please cite this article as: L. Armand, et al., Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view, J Prot (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.006

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Just Accepted by *Nanotoxicology*



Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents

Lucie Armand, Adeline Tarantini, David Beal, Mathilde Biola-Clier, Laure Bobyk, Sephanie Sorieul, Karin Pernet-Gallay, Caroline Desvergne, Iseult Lynch, Nathalie Herlin-Boime, Marie Carriere

Doi: 10.3109/17435390.2016.1141338

Abstract

Titanium dioxide nanoparticles (TiO_2-NPs) are one of the most produced NPs in the world. Their toxicity has been studied for a decade using acute exposure scenarios, i.e. high exposure concentrations and short exposure times. In the present study, we evaluated their genotoxic impact using long-term and low concentration exposure conditions.

A549 alveolar epithelial cells were continuously exposed to 1-50 µg/mL TiO_2-NPs, 86% anatase/14% rutile, 24±6 nm average primary diameter, for up to two months. Their cytotoxicity, oxidative potential and intracellular accumulation were evaluated using MTT assay and reactive oxygen species measurement, transmission electron microscopy observation, micro-particle-induced X-ray emission and inductively-coupled plasma mass spectroscopy. Genotoxic impact was assessed using alkaline and Fpg-modified comet assay, immunostaining of 53BP1 foci and the cytokinesis-blocked micronucleus assay. Finally, we evaluated the impact of a subsequent exposure of these cells to the alkylating agent methyl methanesulfonate.

We demonstrate that long-term exposure to TiO_2-NPs does not affect cell viability but causes DNA damage, particularly oxidative damage to DNA and increased 53BP1 foci counts, correlated with increased intracellular accumulation of NPs. In addition, exposure over 2 months causes cellular responses suggestive of adaptation, characterized by decreased proliferation rate and stabilization of TiO_2-NP intracellular accumulation, as well as sensitization to MMS. Taken together, these data underline the genotoxic impact and sensitization effect of long-term exposure of lung alveolar epithelial cells to low levels of TiO_2-NPs.

© 2016 Taylor & Francis. This provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

DISCLAIMER: The ideas and opinions expressed in the journal's Just Accepted articles do not necessarily reflect those of Taylor & Francis (the Publisher), the Editors or the journal. The Publisher does not assume any responsibility for any injury and/or damage to persons or property arising from or related to any use of the material contained in these articles. The reader is advised to check the appropriate medical literature and the product information currently provided by the manufacturer of each drug to be administered to verify the dosages, the method and duration of administration, and contraindications. It is the responsibility of the treating physician or other health care professional, relying on his or her independent experience and knowledge of the patient, to determine drug dosages and the best treatment for the patient. Just Accepted articles have undergone full scientific review but none of the additional editorial preparation, such as copyediting, typesetting, and proofreading, as have articles published in the traditional manner. There may, therefore, be errors in Just Accepted articles that will be corrected in the final print and final online version of the article. Any use of the Just Accepted articles is subject to the express understanding that the papers have not yet gone through the full quality control process prior to publication.

Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents

Lucie Armand[1,2], Adeline Tarantini[1,2], David Beal[1,2], Mathilde Biola-Clier[1,2], Laure Bobyk[1,2], Sephanie Sorieul[3], Karin Pernet-Gallay[4,5], Caroline Desvergne[6], Iseult Lynch[7], Nathalie Herlin-Boime[8], Marie Carriere[1,2,§]

[1]Université Grenoble-Alpes, INAC-LCIB, Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, 17 rue des Martyrs, F-38000 Grenoble, France.

[2]CEA, INAC-SCIB, Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, 17 rue des Martyrs, F-38000 Grenoble, France.

[3]CENBG, Université Bordeaux 1, IN2P3, UMR5797, 33175 Gradignan Cedex, France.

[4]Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble F-38000, France

[5]INSERM U 836, F-38000 Grenoble, France.

[6]Université Grenoble-Alpes, CEA, Nanosafety Platform, Medical Biology Laboratory (LBM), 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France.

[7]School of Geography, Earth and Environmental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, B15 2TT Birmingham, United Kingdom

[8]UMR3685 CEA-CNRS, NIMBE, LEDNA, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France.

[§]Corresponding author: Marie Carrière, CEA Grenoble, LAN, Bât C5, pce 632, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Phone: +33 4 38 78 03 28, fax: +33 4 38 78 50 90. marie.carriere@cea.fr

JUST ACCEPTED

Keywords

Nanoparticle, TiO_2, toxicity, genotoxicity, chronic

Abstract

Titanium dioxide nanoparticles (TiO_2-NPs) are one of the most produced NPs in the world. Their toxicity has been studied for a decade using acute exposure scenarios, i.e. high exposure concentrations and short exposure times. In the present study, we evaluated their genotoxic impact using long-term and low concentration exposure conditions.

A549 alveolar epithelial cells were continuously exposed to 1-50 µg/mL TiO_2-NPs, 86% anatase / 14% rutile, 24±6 nm average primary diameter, for up to two months. Their cytotoxicity, oxidative potential and intracellular accumulation were evaluated using MTT assay and reactive oxygen species measurement, transmission electron microscopy observation, micro-particle-induced X-ray emission and inductively-coupled plasma mass spectroscopy. Genotoxic impact was assessed using alkaline and Fpg-modified comet assay, immunostaining of 53BP1 foci and the cytokinesis-blocked micronucleus assay. Finally, we evaluated the impact of a subsequent exposure of these cells to the alkylating agent methyl methanesulfonate.

We demonstrate that long-term exposure to TiO_2-NPs does not affect cell viability but causes DNA damage, particularly oxidative damage to DNA and increased 53BP1 foci counts, correlated with increased intracellular accumulation of NPs. In addition, exposure over 2 months causes cellular responses suggestive of adaptation, characterized by decreased proliferation rate and stabilization of TiO_2-NP intracellular accumulation, as well as sensitization to MMS. Taken together, these data underline the genotoxic impact and sensitization effect of long-term exposure of lung alveolar epithelial cells to low levels of TiO_2-NPs.

JUST ACCEPTED

Introduction

Titanium dioxide nanoparticles (TiO_2-NPs) are present in everyday products such as sunscreens, sweets and paints (Shi, 2013). Since their production volume is predicted to exceed that of TiO_2 microparticles (Robichaud, 2009), increased occupational and environmental exposure of the population to these NPs is expected. To date, NP toxicology studies have mainly focused on the lung, as inhalation is the most likely and most concerning NP exposure mode. NPs and ultrafine particles show similar physico-chemical properties, which suggests that NPs may be carcinogenic just like ultrafine particles (Loomis, 2013). Epidemiological studies so far failed to demonstrate a direct link between exposure to TiO_2-NPs and cancer development (Baan, 2007). This is why IARC, in its monograph on the evaluation of carcinogenic risks to human from carbon black, titanium dioxide and talc, concluded that "there is inadequate evidence in humans for the carcinogenicity of titanium dioxide", while they concluded on "sufficient evidence in experimental animals for the carcinogenicity of titanium dioxide", which supported the overall evaluation that "titanium dioxide is possibly carcinogenic to humans (Group 2B)" (IARC, 2010). Still many *in vitro* and *in vivo* studies focus on TiO_2-NP genotoxicity as a hallmark of early carcinogenicity. The conclusions of these genotoxicity or DNA damage studies are conflictive (IARC, 2010; Shi, 2013) probably because NPs with various physicochemical characteristics are used. Additionally, even if the same NP is used, the dispersion procedure, depending on the composition of the dispersion medium and the time of sonication, may lead to significant differences in NP agglomerate sizes and coatings and consequently in NP biological effects. In particular, it is now well documented that addition of proteins such as BSA or serum leads to coating of the NPs with proteins which stabilize the NP suspension but also may mask reactive sites on NP surface, thus reducing their short-term cyto- or genotoxicity (Carriere, 2014; Magdolenova, 2012). However, the situation may differ upon long-term exposure, since long-term NP accumulation in lysosomes may cause corona proteins degradation and consequently NP surface may get revealed again.

In addition to these conflicting results, *in vitro* exposure scenarios are most of the time unrealistic, i.e. exposure concentrations range between 5 µg/mL and 100 µg/mL and exposure times are very short, i.e. less than 24 h (Chen, 2014). This exposure concentration is 10^6-fold higher than human inhalation exposure even in a worst-case scenario (Paur, 2011), and individuals are exposed to TiO_2-NPs during their whole life (Weir, 2012). This therefore raises the question of the accuracy of acute exposure

JUST ACCEPTED

models, since biological effects and related mechanisms may differ depending on exposure concentration and time.

Interesting results recently emerged from long-term, chronic *in vitro* exposure scenarios, representing an important breakthrough in nanotoxicology literature. Exposure of a human keratinocyte cell line to 5 µg/mL of 25 nm anatase TiO_2-NPs for up to 3 months caused neither overt cytotoxicity nor reactive oxygen species accumulation (Kocbek, 2010). A 3-week exposure of human mesenchymal stem cells to TiO_2-NPs also did not induce significant cytotoxic impact (Hackenberg, 2013). However it induced the formation of nanotubular protrusions of the exposed cells' plasma membranes and increased the proportion of cells in the subG1 phase of the cell cycle (Kocbek, 2010). Modification of cell cycle progression was also observed in Chinese Hamster Ovary cells (CHO-K1) continuously exposed to 10-40 µg/mL of anatase TiO_2-NPs for 2 months, with an increased proportion of cells in the G2/M phase. In this cell line, chronic exposure to TiO_2-NPs impacted neither cell proliferation and survival nor caused genotoxic events, but correlated with reactive oxygen species accumulation in exposed cells (Wang, 2011). Exposure of NIH3T3 fibroblasts to 10 µg/mL TiO_2-NPs for up to 3 months impaired cell cycle progression and mitosis, and altered genome segregation due to interference of NPs with mitotic spindle assembly and with centrosome maturation. The authors concluded that long-term exposure to TiO_2-NPs thus induced cell transformation and chromosomal instability, via deregulation of PLK1 function (Huang, 2009). Finally, exposure of BEAS-2B bronchial cell line for 4 weeks to anatase TiO_2-NPs (NM102 representative material from the Joint Research Center, Ispra, Italy) induced neither primary lesions and oxidative damage to DNA, nor chromosomal damage. However, they induced cell transformation in the soft-agar plate assay (Vales, 2014).

In this context, the present study was designed to assess possible genotoxicity of TiO_2-NPs upon long-term, 8-week continuous exposure of A549 lung alveolar cells. The rationale for using this cell line is that 20 nm-diameter NPs are expected to reach the alveolar compartment of the lung rather than the bronchial compartment (Shi, 2013). Moreover we used TiO_2-NPs with mix anatase/rutile crystalline phases (NM105 from the Joint Research Center, Ispra, Italy, i.e. P25 Aeroxide from Evonik), which are more reactive than pure anatase TiO_2-NPs (Gerloff, 2009) and show the highest stability of well-dispersed suspensions upon dispersion via sonication (Jugan, 2012; Simon-Deckers, 2008). We previously demonstrated that these TiO_2-NPs caused cytotoxicity and genotoxicity in this cell line upon acute exposure, *in vitro* (Jugan, 2012; Simon-Deckers, 2008). Moreover they caused

JUST ACCEPTED

drastic reduction of cellular ability to repair damaged DNA (Jugan, 2012). Our previous work, using 2D-gel electrophoresis analysis together with functional validation to analyze the molecular response of A549 cells to 2 months, chronic exposure to these NPs, showed that this exposure scenario impacts the abundance of 22 gene products involved in glucose metabolism, trafficking, gene expression, mitochondrial function, proteasome activity and DNA damage response (Armand, 2015). This chronic exposure was also found to increase the intracellular content of the serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP) whose role is to stabilize p53 coactivators p300 and JMY so that they activate p53, which are indicative of DNA damage. Moreover, p53 phosphorylation and acetylation were increased, leading to cell cycle slowdown (Armand, 2015).

In the present study, we investigated the impact of these TiO_2-NPs on DNA stability, also using a chronical 2-months exposure scenario. Our initial aim was to analyze the impact of very low TiO_2-NP concentrations, in the range of 1 ng/mL to 50 µg/mL. However, since our first results showed that the biological response to 2 months exposure to 1 µg/mL TiO_2-NPs was insignificant, we decided to focus subsequent studies on the range inducing a dose-dependent cellular response, i.e. 1-50 µg/mL TiO_2-NPs. We characterized TiO_2-NP cellular accumulation and distribution using transmission electronic microscopy (TEM), micro particle-induced X-ray emission (µPIXE) and ICP-MS. Cell viability and redox status were assessed after exposure. Moreover, we characterized the genome instability caused by this exposure model, by using (1) the comet assay in its alkaline and Fpg-modified versions to probe DNA strand breaks, alkali-labile sites and Fpg-sensitive sites including 8-oxo-dGuo, (2) 53BP1 foci numeration to probe DNA double-strand breaks and DNA replication fork blockade, and (3) the cytokinesis-blocked micronucleus assay to probe clastogenic and aneugenic events. Finally, we assessed sensitization towards the alkylating agent methane-methyl sulfonate (MMS) that this long-term exposure to TiO_2-NPs provides, by first exposing cells for 2 months to TiO_2-NPs then exposing them to a sublethal concentration of MMS, and characterizing cell viability and DNA integrity.

Together these identify a large range of potential NP-induced DNA damage mechanisms and allow a very detailed picture of key steps to be elucidated.

JUST ACCEPTED

Methods

Nanoparticle dispersion and characterization

TiO_2-NPs (AEROXIDE® P25, Evonik) were obtained from the library of the Joint Research Center (JRC, Ispra, Italy) where they are designated NM105. They were dispersed in ultrapure sterile water to the concentration of 10 mg/mL, by high power probe sonication in pulsed mode (1s on/1s off), at 4°C and 28% of amplitude, over 30 min as described previously (Carriere, 2014; Simon-Deckers, 2008). The power delivered by our sonicator at 28% of amplitude is 16.8 W (Brun, 2014). Suspensions were stored in the dark at room temperature. Just before cell exposure, the suspension was vigorously vortexed and diluted in exposure medium, i.e. DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS). The hydrodynamic diameter of the TiO_2-NPs diluted to 5 µg/mL in ultrapure water or exposure medium was determined by dynamic light scattering (DLS) on a ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). Size and size distribution was analyzed immediately following dispersion and over the timecourse of the exposure (after 2 months).

Cell culture

A549 human lung carcinoma cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA, reference CCL-185) and grown in DMEM 4.5 g/L glucose (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing 2 mM/L glutamine, penicillin/streptomycin (50 IU/mL and 50 mg/ml respectively) and 10% FBS. They were maintained at 37°C in a 5% CO_2/air incubator.

NP exposure

Over a period of up to 2 months, cells were subcultured in cell culture medium containing freshly-diluted NPs twice a week (Figure S1), using the following protocol: wells were rinsed with PBS, trypsinized with trypsin-EDTA 0.25% and counted after trypan blue staining. Cells were then seeded in a new dish (seeding details described in the specific experimental protocols below), in cell culture medium containing 1, 2.5, 5, 10 or 50 µg/mL TiO_2-NPs, these concentrations being in line with those used in the previously published TiO_2-NP chronic exposure studies (Huang, 2009; Kocbek, 2010; Vales, 2014; Wang, 2011). The 10 mg/mL NP stock suspension (prepared in water) was the same during the whole exposure time. The dispersion state of the suspension was checked by DLS

JUST ACCEPTED

immediately after dispersion, then after 2 weeks, 1 month and 2 months; size distribution did not significantly evolve. Moreover TiO_2-NPs did not significantly dissolve over time, as attested by ICP-MS measurement of Ti ion content in the supernatant of the suspension (after ultracentrifugation at 400 000 *g* for 30 min; material and methods for ICP-MS are described in Electronic Supplementary Information) collected just after sonication and at the end of the 2 month experiments (not shown). After 24 hours, 1 week, 2 weeks, 1 month and 2 months of treatment, cells were seeded i) in well plates or microscope coverslips to carry out the cytotoxicity, genotoxicity, RT-qPCR and redox balance analyses experiments and ii) in petri dishes to continue the exposure experiment. Cells prepared for cytotoxicity, genotoxicity, RT-qPCR and redox balance analyses experiments were processed either immediately (MTT, trypan blue, H2DCFDA) or conditioned, stored and processed after completion of the 2 month exposure (ICP-MS, propidium iodide staining, redox enzyme activity, comet assay, 53BP1 and micronucleus assay). Storage conditions are described below and in Table S1. The whole chronic exposure experiment was repeated 4 times, independently, and most of the experiments described below were thus repeated 4 times independently, except TEM imaging which was performed once, and PIXE and ICP-MS measurement of TiO_2-NP intracellular accumulation which were repeated twice (for detailed number of independent experiment for each assay, see Table S1).

Cytotoxicity and cell proliferation

Cytotoxicity was assessed using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were seeded at sub-confluence in 96-well plates, in cell culture medium containing 1, 2.5, 5, 10 or 50 µg/mL TiO_2-NPs (6 wells per condition). After 16-hours, to allow cell adhesion, the medium in each well was replaced by 0.5 mg/mL MTT diluted DMEM. After 1 h of incubation at 37°C, formazan crystals were dissolved in 100 µL DMSO. To limit interference NPs were then allowed to sediment for 1 h, after which the plate was centrifuged at 450 × *g* for 5 min. 50 µL per well was transferred to a new 96-well plate. Absorbance was measured at 570 nm and cell viability was determined as percentage of absorbance of negative control (unexposed cells). Trypan blue count (2 replicates per condition) was used to calculate the population doubling level (PDL) at each exposure concentration and at each cell passage, using the following formula: $PDL = t*\log 2/(\log N_t - \log N_0)$ (N_0 and N_t being cell counts immediately after seeding and t days after seeding, respectively).

JUST ACCEPTED

We also used propidium iodide staining to assess cell viability. After exposure to 0, 1, 2.5, 5, 10, 50 µg/mL TiO_2-NP, cells were collected (10^6 cells per condition, 4 replicates) and rinsed with PBS containing 2 mM EDTA (PBS-EDTA). Cells were fixed in ice-cold 70% ethanol for 30 min then washed with PBS-EDTA. They were suspended in PBS-EDTA containing 25 µg/mL propidium iodide (Life Technologies) and 25 µg/mL RNAse A (Sigma-Aldrich). A minimum of 20 000 events per condition was measured by flow cytometry using a FacsCalibur analyzer (BD Biosciences, Franklin Lanes, NJ, USA) equipped with CXP software (Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA, USA). Median fluorescence was calculated using Flowing Software 2.5.1 (http://www.flowingsoftware.com/). Fluorescence intensity median results were normalized to untreated control.

Intracellular accumulation and distribution

NP accumulation and intracellular distribution were measured by µ-particle-induced X-ray emission (µPIXE) and Elastic Backscattering (EBS). Cells were seeded onto polycarbonate membranes and allowed to adhere for 16 h. They were then rinsed twice with PBS and cryofixed by immersion in isopentane chilled to -160°C in liquid nitrogen (Carriere, 2005). Samples were freeze-dried for 24 h at -10°C, 0.37 mbar. Micro-PIXE and EBS spectra were recorded simultaneously on the microbeam line of the AIFIRA platform (CENBG, Bordeaux, France) (Barberet, 2009). The 3.5 MV Singletron accelerator (HVEE) was adjusted in order to deliver a focused beam (2.5 µm in diameter) of 3 MeV protons with a beam current of 1 nA. X-rays were detected with an 80 mm^2 Si(Li) detector (Gresham) orientated at 135° with respect to the incident beam axis, and equipped with a 12 µm thick beryllium window. A funny filter (Al, thickness 200 µm, size hole = 1 mm) was used in order to limit the dead-time below 10%. Backscattered protons were recorded at 135° with a silicon PIPS detector (Canberra, 25 mm^2, thickness 100 µm, resolution: 17 keV). Four elemental maps of 100×100 μm^2 were recorded on each sample, and drawn using the SupaVISIO software (http://biopixe.free.fr). For Ti intracellular content measurement, data were fitted using SIMNRA (EBS) (Mayer, 2002) and Gupix (X-ray spectra) (Campbell, 2010) as described previously and normalized by analysis of standards, kindly provided by Dr. R. Ortega.

Intracellular distribution was observed by TEM. After exposure cells were rinsed twice with PBS, fixed with 2% glutaraldehyde and 1% osmium tetroxide. They were then gradually dehydrated with ethanol

JUST ACCEPTED

and embedded in Epon resin. Sections were cut by ultramicrotomy (80 nm) and observed on a JEOL 1200EX TEM operating at 80 kV (Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France).

Oxidative stress

Oxidative stress was first evaluated through measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS) formation, using the fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (H_2DCFDA, Life Technologies) probe. At each time-point of the long-term exposure (24 h, 1 week, 2 weeks, 1 months and 2 months) cells exposed to TiO_2-NPs were harvested and seeded in a new 12-well plate, in exposure medium containing the same concentration of TiO_2-NPs as during chronic exposure (4 replicates per condition). After 16 h, they were washed twice with PBS, incubated for 30 min at 37°C with 80 µM H_2DCFDA then harvested by scraping in 200 µL of PBS. 100 µL of each cell suspension was transferred to a black 96-well plate, and fluorescence intensity was immediately measured with excitation at 480 nm, emission at 530 nm and a cutoff at 515 nm, on a Spectramax M2 spectrophotometer (MTX Lab Systems, Vienna, VA, USA). Relative fluorescence was normalized with respect to protein concentration, which was measured on 20 µL of the cell suspensions to which was added 200 µL of Bradford reagent. Protein concentration was then established using a calibration curve prepared from 0-500 µg/mL of BSA. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was used as a positive control, with exposure for 30 min at 50 µM. In order to estimate interference of TiO_2-NPs with this assay, the same protocol was applied to cells seeded and treated in exactly the same conditions but not incubated with H_2DCFDA. Some fluorescence of TiO_2-NPs was observed, but it accounted for less than 10% of the total fluorescence signal in the H2DCF-DA + NP treated cells.

In cell samples exposed to NPs for 2 months, glutathione concentration, both total (GSH+GSSG) and reduced (GSH), as well as the activity of the 4 antioxidant enzymes glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were monitored as previously described (Barillet, 2010), with 3 replicates per condition. For detailed protocols, see the Electronic Supplementary Information.

DNA damage

NP-induced DNA strand breaks and alkali-labile sites were assessed through the alkaline version of the comet assay (Singh, 1988). Oxidatively damaged DNA was quantified by using the bacterial DNA

JUST ACCEPTED

repair enzyme formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) in the comet assay (Gurr, 2005). This enzyme converts oxidized purines, including the major purine oxidation product 8-oxoguanine, into single-strand breaks (SSB, therefore detectable by the comet assay) through a base-excision process (Collins, 2009). At the end of the exposure time, cells (1 well per condition) were rinsed three times with PBS, trypsinized, then pelleted by centrifugation for 5 min at 250 *g*. Cell pellets were then resuspended in sucrose 85.5 g/L, DMSO 50 mL/L prepared in citrate buffer (11.8 g/L), pH 7.6, and immediately frozen at -80°C. At the end of the 2 months exposure period, samples were thawn and processed as described hereafter for the comet assay. Six microscope slides per condition were coated with 1% normal melting point agarose (NMA) and allowed to dry. 10000 cells per slide were mixed with 0.6% low melting point agarose (LMPA) and deposited over the NMA layer. The cell/LMPA mix was then allowed to solidify on ice for 10 min. Slides were immersed in cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100) overnight at 4°C, before being rinsed in 0.4 M Tris pH 7.4. Then 3 slides were treated with 100 µL Fpg (5 U/slide, in enzyme buffer, Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) and 3 slides were incubated with Fpg enzyme buffer for 45 min at 37 °C. DNA was then allowed to unwind for 30 min in alkaline electrophoresis solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). Electrophoresis was performed in an electric field of 0.7 V/cm and 300 mA for 30 min. Slides were then neutralized in 0.4 M Tris pH 7.4 and were stained with 50 µL of 20 mg/ml ethidium bromide (Life Technologies). As a positive control for alkaline comet assay, we used 50 µM H_2O_2 directly deposited onto the agarose layer containing the cells, incubated for 5 min at room temperature. As a positive control for comet-Fpg we used A549 cells exposed for 20 min at 37 °C to 1 µM riboflavin, then exposed to 10 J/cm^2 of UVA. At least 50 comets per slide were analyzed under a fluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) connected to a charge-coupled device camera with a 350-390 nm excitation and 456 nm emission filter, at x20 magnification. Comets were measured and analyzed using Comet IV software (Perceptive Instruments, Suffolk, UK).

To evaluate DNA double strand breaks (DSB) or replication fork blockade, p53 binding protein 1 (53BP1) foci were revealed and counted in cell nuclei. 53BP1 is a non-enzymatic protein which is recruited shortly after primary DSB detection. This protein is homogeneously distributed in the nuclei of unperturbed cells then it is recruited within 1-2 min to DSB sites (Bekker-Jensen, 2010); like gamma-H2AX it can therefore serve as a marker for DSB. As a positive control, we exposed cells to 25 µM etoposide (Sigma-Aldrich) for 24 h. Cells were fixed for 20 min in 3% paraformaldehyde

JUST ACCEPTED

(Sigma-Aldrich), stained using anti-53BP1 antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA, 1/500 vol./vol.) and slides were mounted with Fluoroshield (Sigma-Aldrich) containing DAPI (1 slides per condition). 53BP1 foci were visualized on an Axio ImageA1 microscope coupled to an Axiocam MRm camera (Carl Zeiss). At least 15 images per condition were captured; on each image we determined both total number of 53BP1 foci and total number of nuclei. Apoptotic cells and dividing cells were rejected.

The micronucleus assay, probing aneuploidic and clastogenic events, was performed as described previously (Fenech, 2000). Cells exposed to TiO_2-NPs were seeded on glass coverslips (3 coverslips per condition, i.e. 3 independent replicates). As a positive control, we used A549 cells exposed for 24 h to 100 µM methyl methanesulfonate (MMS, Sigma-Aldrich) (3 replicates). They were then cultured for another 28 h in culture medium (without NPs) containing 4 µg/ml cytochalasin B (Sigma-Aldrich) to block cytokinesis. Cells were then immediately fixed for 20 min in 3% paraformaldehyde and stained with acridine orange (5 mg/mL, Life Technologies) for 15 min. Coverslips were mounted on microscope slides with Fluoroshield mounting medium containing DAPI. At least 20 images per coverslip were captured with an Axio ImageA1 microscope (Carl Zeiss). On each image, total nr. of cells, binucleated cells and micronuclei were counted.

Statistical analysis

For each assay, the number of biological replicates per experiment as well as the number of 2 months exposure experiment in which the assay was done is summarized in Table S1. Except for TEM, µPIXE and ICP-MS assays, data curation was carried out as follows: results from biological replicates of each independent experiment were averaged; results presented in figures are mean ± s.e.m. of these averages. For ICP-MS assay, the assay was performed only once, with 4 independent replicates. Data presented in Table S2 are thus mean ± s.e.m. of these 4 independent replicates. For µPIXE, 4 measurements were performed on each of the 2 independent samples (prepared during 2 independent 2 month exposure experiments); data presented in Figure 1 are the mean ± s.e.m. of the 8 values that were obtained. Statistical significance was assessed by Kruskal-Wallis non-parametric one-way analyses of variance by ranks, using the Statistica 8.0 software (Statsoft, Chicago, IL, USA). When significance was demonstrated ($p < 0.05$), paired comparisons were run using Mann-Whitney tests.

JUST ACCEPTED

Results

Characterization of TiO_2 nanoparticles

The TiO_2-NPs used in the present study, P25 Aeroxide, have already been characterized in terms of morphology, primary size, surface specific area and isoelectric point (Jugan, 2012; Simon-Deckers, 2008). Briefly they are round-shaped (Figure S2) with an average primary particle diameter of 24±6 nm (as measured by TEM) and average specific surface area of 46±1 m^2/g. Their crystalline phase is 86% anatase and 14% rutile. We dispersed these NPs in water, using high energy sonication as previously described (Carriere, 2014; Simon-Deckers, 2008). After this dispersion stage in water, their average hydrodynamic diameter, measured by DLS and expressed in number, was 44±25 nm (Figure S2). Their polydispersity index (PdI) was 0.146±0.009. This distribution did not evolve significantly during the 2 months of the experiment; distribution profiles were almost identical 24 h and 2 months after dispersion (not shown). Just before each cell passage, after vigorous vortexing this suspension was diluted in cell culture medium containing 10% FBS to reach NP concentrations of 1, 2.5, 5, 10 or 50 µg/mL. In this exposure medium their zeta potential was -11.2±0.8 mV; their hydrodynamic diameter increased to 342±15 nm and PdI increased to 0.236±0.048, indicating that NPs agglomerated somewhat (Figure S2).

NP accumulation and distribution in exposed cells

In order to characterize the interaction between TiO_2-NPs and cells, we evaluated their cellular accumulation and distribution. Micro-PIXE showed that every cell contained Ti whatever the exposure time (Figure 1A). Indeed Ti-rich areas co-localized with K/Ca-rich areas which represent the outlines of cells. Integration of PIXE spectra (Figure 1B), recorded on 4 different samples per condition, showed that Ti accumulation was significant at both 2.5 and 50 µg/mL and that it was higher in cells exposed to 50 µg/mL TiO_2-NPs than in cells exposed to 2.5 µg/mL TiO_2-NPs (Figure 1C). Moreover in cells exposed to 50 µg/mL TiO_2-NPs, Ti content was higher after 1 month of exposure than after 24 h of exposure. Then it did not increase further, the value after 2 months of exposure was comparable to that at 1 month of exposure, suggesting an adaptive response of cells which may exclude or expel TiO_2-NPs. This was confirmed by ICP-MS measurement of Ti accumulation in these cells, which also

JUST ACCEPTED

shows no statistically significant increase of intracellular Ti between 1 and 2 months of exposure (Table S1).

At the sub-cellular level, TEM observation of cells exposed for 2 months to 2.5 and 50 µg/mL TiO_2-NPs showed that NPs were accumulated inside the cells under both conditions, mostly in cytoplasmic vacuole-like compartments which may be lysosomes or autophagosomes. No NP was observed in the nucleus or mitochondria (Figure 2). No major accumulation of NPs was observed on cell membranes, confirming that the µPIXE and ICP-MS measurements reflected NP accumulation inside the cells rather than NPs adsorbed on cell membranes.

Cytotoxicity and cell proliferation

The MTT assay, assessing cell mitochondrial activity, demonstrated that chronic exposure to NPs did not affect cell survival, even after 2 months of exposure and at concentrations as high as 50 µg/mL TiO_2-NPs (Figure 3A). Interference of NPs with the assay was tested using a previously reported protocol (Brun, 2014) and turned out to be negative (data not shown). This result was confirmed by trypan blue staining and cell counting at each cell passage, that revealed no overt mortality (Table S2), as well as propidium iodide staining and flow cytometry analysis of live/dead cells (Figure 3B), that also did not reveal any overt mortality.

However, the population doubling level (PDL), inversely correlated to cell proliferation, was moderately but significantly increased for the 10 and 50 µg/mL TiO_2-NP exposure concentration and for the last passage (Figure 3C). This indicates that the highest exposure concentrations and the longest exposure time, even if non cytotoxic, significantly decreased cell proliferation.

Cellular redox status

As oxidative stress is both a known consequence of NP exposure and a demonstrated mechanism for genotoxicity, we evaluated the oxidative status of NP-exposed cells. ROS production, measured with the H_2DCFH-DA assay, was higher in cells exposed to 5, 10 and 50 µg/mL TiO_2-NPs than in control cells whatever the exposure time, as well as in cells exposed to 2.5 µg/mL TiO_2-NPs for 2 weeks and more (Figure 4). Increased intracellular ROS content was concentration-dependent, i.e. ROS content in cells exposed to 50 µg/mL TiO_2-NPs was significantly higher than in cells exposed to 5 and 10 µg/mL TiO_2-NPs. For our exposure condition we evaluated the interference of TiO_2-NPs with the assay

JUST ACCEPTED

as suggested by Guadagnini et al (Guadagnini, 2015); it did not account for more than 10% of the total DCF fluorescence even at the highest concentration, i.e. interference was not significant.

We did not observe any significant modulation of both total (GSH+GSSG) and reduced (GSSG) glutathione contents in cells continuously exposed to TiO_2-NPs for 2 months (Table S3). Neither did we observe any modulation of the activity of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) which are responsible for glutathione cycling between its reduced and oxidized form. The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), involved in hydrogen peroxide and oxygen superoxide radical dismutation, respectively, were also unchanged after 2 months of exposure (Table S3). Finally, we monitored mRNA expression of CAT, SOD1, SOD2, GPx1, GPx4 and GSR and observed no modulation of their expression (Table S4).

Genotoxicity

DNA damage was first evaluated via the alkaline version of the comet assay, which detects primary lesions of DNA i.e. single-strand breaks and double-strand breaks, as well as alkali-labile sites such as abasic sites. This assay showed increased DNA damage in cells exposed to 10 µg/mL TiO_2-NPs for 1 and 2 months, as well as in cells exposed to 50 µg/mL TiO_2-NPs regardless of the exposure time (Figure 5A). After 1 and 2 months of exposure, DNA damage was higher in cells exposed to 50 µg/mL TiO_2-NPs than in cells exposed to 10 µg/mL TiO_2-NPs.

We also used the -Fpg version of the comet assay, which additionally reveals Fpg sensitive sites, i.e. oxidative damage to DNA. In accordance with the recommendation of the European Standards Committee on Oxidative DNA damage (ESCODD) reported by Moller *et al.* (Moller, 2015) the number of Fpg-sensitive sites was very low in cells that were not exposed to TiO_2-NPs. Our positive control for this assay (cells not exposed to TiO_2-NPs, incubated for 30 min with riboflavin and exposed to UVA) resulted in 30-35% DNA in the tail, depending on the experiment (not shown). In this assay we observed higher % DNA in the comet tail than in the alkaline version of the assay, proving that exposure to TiO_2-NPs also caused oxidative damage to DNA. In Comet-Fpg, we observed a significant increase of DNA damage in cells exposed to 10 and 50 µg/mL TiO_2-NPs whatever the exposure time, as well as in cells exposed for 2 months at 1 µg/mL and 2.5 µg/mL TiO_2-NPs, and for 2 weeks and 1 month at 5 µg/mL TiO_2-NP (Figure 5B). Damage was higher in cells exposed to 50

JUST ACCEPTED

µg/mL TiO_2-NP than in cells exposed to any other concentration of NPs, confirming the concentration-dependence of DNA damage.

We also measured the specific presence of DSB or DNA replication fork blockade by counting 53BP1 foci in the nuclei of cells chronically exposed to TiO_2-NPs. We observed higher 53BP1 foci counts in cells exposed to 2.5 and 5 µg/mL NPs during 1 month, and in cells exposed to 10 and 50 µg/mL NPs for 1 and 2 months (Figure 5C).

Finally, in order to evaluate clastogenic and aneugenic effects of NPs we used the cytokinesis-blocked micronucleus assay. Due to the possibility that cytochalasin B blocked endocytosis and consequently NP cellular uptake, we used the modified version of the assay where cells are incubated with NPs before being treated with cytochalasin B (Magdolenova, 2012). The percentage of binucleated cells, after 28 h of exposure to cytochalasin B of cells chronically exposed to TiO_2-NPs, ranged between 55 and 65% and was not statistically different in control cells, as compared to TiO_2-NP-exposed cells. In binucleated cells, micronucleus counting did not reveal any chromosomal damage (Table S5). Moreover our positive control (100 µM of MMS for 24 h) significantly increased the number of micronuclei per binucleated cell (30.9±0.1 micronuclei per 1000 cells in cells exposed to MMS vs. 7.3±2.5 micronuclei per 1000 cells in unexposed cells, see Table S5). This proves that the mutagenicity and clastogenicity of TiO_2-NPs, under this exposure condition (i.e. chronic low level exposure, 1-50 µg/mL over 2 months), was insignificant.

Cell sensitization to post-exposure to a genotoxic agent

We previously showed that acute exposure to TiO_2-NPs impaired cellular ability to repair DNA lesions via NER and BER pathways (Jugan, 2012). Chronic exposure to TiO_2-NPs may thus sensitize cells to other genotoxic agents, particularly those which induce lesions that are classically repaired by the NER and the BER. We thus evaluated the impact of post-exposure to the alkylating agent methane-methyl sulfonate (MMS), which generates DNA lesions repaired by the BER, on cells continuously exposed to TiO_2-NPs for 2 months. First, these cells were exposed to a non-lethal concentration of MMS, i.e. 100 µM for 24 h. The MTT assay then demonstrated that cell mortality was higher in cells continuously exposed to 5 to 50 µg/mL NPs and subsequently acutely exposed to MMS, as compared to cells exposed to MMS without previous chronic exposure to NPs (Figure 6A). In order to confirm that this higher cell mortality was related to higher DNA damage, we quantified DNA strand break in

JUST ACCEPTED

cells chronically exposed to TiO_2-NPs and then acutely exposed to 50 µM or 100 µM of MMS. Post-exposure to 50 µM MMS did not increase the % tail DNA in alkaline comet assay (not shown). Conversely % tail DNA was increased by 14% in cells exposed to 50 µg/mL TiO_2-NPs for 2 months then post-exposed to 100 µM of MMS for 24 h, as compared to cells that were only exposed for 24 h to MMS (Figure 6B, grey bars). As a comparison, 2 months of exposure to 50 µg/mL TiO_2-NPs increased % tail DNA by 4%, as compared to unexposed cells (Figure 6B, white bars). In addition, 53BP1 foci were counted in cells exposed to TiO_2-NPs for 2 months, then post-exposed to 50 µM or 100 µM of MMS. No statistically significant difference was observed in this assay (Figure S3). Finally we analyzed the mRNA expression of genes encoding proteins involved in DNA repair processes, especially via the BER pathway, i.e. APE1, PARP1, PCNA, XRCC1, POLB, LIG3, as well as genes encoding TP53 and the proteins involved in cell cycle checkpoint ATM and ATR, in cells chronically exposed to TiO_2-NPs. Their expression was not modified in cells exposed for 2 weeks, 1 month or 2 months to 2.5, 10 or 50 µg/mL TiO_2-NPs (Table S6). This indicates that if cells are sensitized to MMS through reduction of their DNA repair capacities, as suggested by our previous results obtained after acute exposure to these TiO_2-NPs, this does not rely on the inhibition of expression of genes encoding DNA repair proteins.

JUST ACCEPTED

Discussion

In the present article, we report the impact of long-term exposure of A549 lung cells to TiO_2-NPs, particularly focusing on the genome instability that it may provide. Our previously published results show that this exposure scenario induces DNA damage response via activation of the p53 pathway, through increased levels of STRAP which is a stabilizer of the coactivators of p53, p300 and JMY (Armand, 2015). We also showed that p53 acetylation and phosphorylation levels are increased (Armand, 2015). In the present article we complement these data by showing that this exposure scenario causes the accumulation of reactive oxygen species, oxidative damage to DNA, as well as the formation of foci of 53BP1 on the DNA which suggestss the presence of double-strand breaks and/or DNA repair processes by excision/synthesis and/or replication fork blockade. These lesions to DNA may be the cause of the p53 pathway activation that we previously reported. In this previous study, we also report that chronic exposure induced mitochondrial damage and perturbation of

autophagy (Armand, 2015), which may be an explanation for the accumulation of ROS that we observe here. Indeed mitochondria and cellular respiration are the main source of endogenous ROS in mammalian cells. If these ROS are not appropriately scavenged, or if, as a result of mitochondrial damage, higher levels of ROS are produced, then these ROS would attack biomolecules including DNA. As discussed in our previous article (Jugan, 2012), oxidative damage to DNA may be created by weak oxidizing species such as hydroperoxides. These species may be produced in the cell cytoplasmic vacuole-like structures where TiO_2-NP accumulate, then migrate to the nucleus where they would oxidize DNA. Conversely the lifetime of OH°, the only ROS which is able to attack DNA backbone and create strand breaks (Pogozelski, 1998), is very short. Consequently, its migration from the cytoplasm/vacuoles to the nucleus, leading to direct DNA backbone attack, is improbable. The accumulation of 53BP1 foci that we observe might thus reflect the presence of double-strand breaks that result from secondary, indirect production of OH° in the nucleus. Alternatively, and more probably, it may result from the repair of oxidative lesions by excision-synthesis processes, or replication fork blockade during mitosis due to damaged DNA (Bekker-Jensen, 2010). This hypothesis is further suggested by the low number of 53BP1 foci that we observe: in control cells we counted 0.2-0.3 53BP1 foci per cell nucleus while in cells exposed for 1 month to 2.5, 5 or 10 µg/mL TiO_2-NPs we observe 0.5 to 0.7 foci per cell nucleus. If secondary production of OH° in the nucleus was the cause of DNA backbone attack and 53BP1 foci formation, then this number would certainly be higher. Moreover, since we did not detect any micronuclei, it appears that these DNA strand breaks are efficiently repaired.

Our results are in line with the generally accepted paradigm that oxidative mechanisms drive TiO_2-NP toxicity, which is widely accepted for acute exposure mode (Johnston, 2009; Shi, 2013). It confirms the conclusion of the IARC Working Group, i.e. in vitro studies show that titanium dioxide particles, both fine and ultrafine, induce DNA damage that is “suggestive of the generation of reactive oxygen species” (IARC, 2010). Finally, it confirms that ROS accumulation is one of the earliest events occurring in cells chronically exposed to TiO_2-NP, as already reported (Huang, 2009; Wang, 2011) and that this ROS accumulation may result from mitochondrial impairment, or altered elimination of damaged mitochondria due to autophagy impairment as we previously reported (Armand, 2015). We also confirm here that 2 months exposure to TiO_2-NPs causes decreased cell proliferation, which was also hinted in our previous study where we reported cell cycle slowdown with cell accumulation in the

JUST ACCEPTED

G1 phase due to activation of the p53 pathway (Armand, 2015). Such perturbation of the cell cycle has also previously been reported by others upon acute (Wu, 2010) or long-term (Wang, 2011) exposure to TiO_2-NPs.

We show that TiO_2-NPs accumulate in cells where they distribute in cytoplasmic vesicles. Their accumulation kinetics suggest cellular adaptation to NP exposure, since Ti intracellular content after 2 months of continuous exposure is not statistically higher than after 1 month of exposure. This observation is in line with the results of Wang *et al.,* who observed significant decrease of Ti content in 60-day exposed cells, as compared to 2-day exposed cells (Wang, 2011). This adaptation could either be expulsion of NPs from the cells, for instance by activation of the exocytosis of NP-containing vesicles, or exclusion, i.e. reduced accumulation while dividing cells also divide their Ti content between daughter cells. It was recently demonstrated that NPs are not exported out of cells, and that NP accumulation depends on the phase of the cell cycle, with more efficient uptake in G2/M phase than in S phase than in G0/G1 phase (Aberg, 2013; Kim, 2011). The cell cycle slowdown and cell accumulation in G1 phase thus supports the hypothesis of reduced intracellular accumulation rather than expulsion of TiO_2-NP from chronically-exposed cells.

Taken together, all these data can be summarized as follows:

Chronic exposure to TiO_2-NPs leads to their accumulation in cell cytoplasmic vesicles. Cells react to these exogenous compounds by activating autophagy, which fails to eliminate TiO_2-NPs. Autophagosomes then accumulate in cells, but no longer fulfil their role and do not eliminate altered mitochondria. Altered mitochondria accumulate in the cell cytoplasm, leading to increased release of ROS which induces oxidatively-generated DNA lesions. These lesions accumulate, together with strand breaks due to excision/resynthesis DNA repair processes and the replication fork blockade that they cause. Moreover the p53 pathway is activated by this mild stress, and leads to cell cycle slowdown and consequently decreased cell proliferation and decreased intracellular accumulation of TiO_2-NPs.

Another important issue highlighted in this study is that cells chronically exposed to TiO_2-NPs for 2 months are sensitized to the alkylating agent MMS, which is classically used as a positive control in genotoxicity experiments (Beranek, 1990). Indeed we observe MMS cytotoxicity when cells chronically exposed to TiO_2-NPs are then incubated with a sublethal dose of this alkylating agent, as well as

JUST ACCEPTED

increased levels of DNA strand breaks compared to the chronic controls (not exposed to MMS). This sensitization might be explained by two hypotheses. First, the DNA damage that we observed in our model can enhance the MMS-induced DNA damage to saturate DNA repair activity, leading to cell death. Second, TiO_2-NPs themselves can also impair cellular DNA repair activity, as we previously demonstrated upon acute exposure (Jugan, 2012). This observation underlines the need to deeply investigate the combined effects of NPs with other pollutants, particularly genotoxic compounds and alkylating agents.

Finally, our results show more drastic impacts from P25 TiO_2-NPs upon chronic exposure of A549 cells, particularly after 4 weeks of exposure, than those previously reported in the study of Vales et al. (Vales, 2014). This discrepancy may be due to the different cell lines that we used, BEAS-2B being bronchial cells while A549 are alveolar cells. Indeed alveolar cells, particularly A549 cells, produce and secrete pulmonary surfactant (Lieber, 1976), which changes the biochemical environment of the milieu around these cells and may be adsorbed on the surface of NPs, changing their properties. Another explanation lies in the fact that different NPs were used in these two studies: we used P25 NPs, which are mixed anatase-rutile crystal phase and which generate a highly stable suspension in water and in cell culture medium. Conversely, Vales et al. (2014) used NMP102 TiO_2-NPs which are pure anatase and very hard to disperse in aqueous medium. For their experiments, these NPs were dispersed in BSA before being diluted in cell culture medium. This probably leads to the formation of a dense protein corona on the surface of these NPs. This corona may be different from the one that forms on the NPs used in our study, which were first dispersed in water then diluted in FBS-containing cell culture medium then exposed to the surfactant secreted by A549 cells. Since the protein corona on the surface of NPs plays a role in their cellular accumulation and impact (Monopoli, 2012), and since direct comparison shows that TiO_2-NPs dispersed either in BSA or in water lead to non-genotoxic or genotoxic impact, respectively (Magdolenova, 2012), these different NPs and dispersion protocols may explain the different toxicological outcomes observed.

JUST ACCEPTED

Conclusions

We demonstrate here that long-term exposure to TiO_2-NPs (AEROXIDE® P25, Evonik; received as NM105 from the JRC) induces DNA damage in A549 cells and sensitizes these cells, as evidenced by the increased amount of DNA strand breaks induced by the alkylating agent MMS. Although this long-term exposure model is still far from the reality of human inhalation exposure, some genotoxicity endpoints appear positive even at very low exposure concentrations (as low as 1 µg/mL). Chronic exposure causes more severe DNA damage than acute exposure, particularly those revealed by 53BP1 foci immunostaining, i.e. double-strand breaks or replication fork blockade. This underlines the necessity to use chronic exposure scenarios in addition to acute exposure models in order to investigate NP impact, since these distinct models lead to different adverse outcomes, with additional triggering events and more intense effects in long-term exposure scenarios.

Acknowledgement

This work was funded by CEA through the Nanoscience and Toxicology research programs, and via the European Commission's 7th Framework Programme project NanoMILE (Contract No. NMP4-LA-2013-310451). It is a contribution to the Labex Serenade (n° ANR-11-LABX-0064) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program of the French National Research Agency (ANR) through the A*MIDEX project (n° ANR-11-IDEX-0001-02). This research received support from the QualityNano Project http://www.qualitynano.eu which is financed by the European Community Research Infrastructures under the FP7 Capacities Programme (Grant No. INFRA-2010-262163), and its partner University of Birmingham. The authors would like to thank Veronique Collin-Faure for flow cytometry analyses.

Declaration of interest

The authors declare that there are none.

JUST ACCEPTED

Legends

Figure 1. NP intracellular accumulation measured by µPIXE. Distribution maps of calcium and potassium (K/Ca, used as indicator of cell outlines) and titanium (Ti) together with their colour scale (counts): the hotter the color, the higher the concentration (A). Cells were analyzed after exposure to 0, 2.5 and 50 µg/mL NPs for 1 and 2 months. PIXE spectra displaying the regions of interest selected for mapping and quantification of Ti content in cells (B). Titanium concentration (ng/cm²) obtained by integration of PIXE spectra recorded on unexposed cells and cells exposed at 2.5 or 50 µg/mL for either 24 h, 1 month or 2 months (C). Results are presented as the mean of 8 points ± SEM. *: $p<0.05$ vs control cells; #: $p<0.05$ vs 2.5 µg/mL NP exposed cells.

Figure 2. TEM images of A549 cells exposed to TiO_2-NPs. (A) Control cells (unexposed cells); (B) Cells exposed to 2.5 µg/mL NPs for 2 months; (C) and (D) Cells exposed to 50 µg/mL NP for 2 months.

Figure 3. Cell viability after NP exposure. (A) Cellular metabolic activity, represented by the MTT assay; (B) cell viability, evaluated by propidium iodide staining; (C) Population doubling level (PDL), indicative of cell proliferation. Results are presented as the mean of 4 points ± SEM. *: $p<0.05$ vs control.

Figure 4. Intracellular ROS content after TiO_2-NP exposure. DCF fluorescence was normalized with respect to protein content, reflecting cell number. The obtained data were then normalized to untreated control. Value for positive control: H_2O_2 50 µM, 30 min: 2.1±0.3. Results are presented as the mean of 4 points ± SEM. *: $p<0.05$ vs control; #: $p<0.05$ vs lower dose for similar exposure period.

Figure 5: TiO_2-NP genotoxicity. (A) Alkaline comet assay, assessing single and double strand breaks as well as alkali-labile sites. Value for positive control: 50 µM H_2O_2 deposited on the slide 5 min before migration: 61.9%; (B) Fpg-modified comet assay, assessing single and double strand breaks, alkali-labile sites and oxidized bases. Value for positive control: riboflavin/UVA: 22.6%. Results are presented as the mean of % DNA in comet tail ± SEM (n=4). *: $p<0.05$ vs control; #: $p<0.05$ vs alkaline comet assay equivalent condition; $: $p<0.05$ vs lower dose for equivalent exposure period. (C) 53BP1

JUST ACCEPTED

foci counting, assessing double strand DNA breaks. Total 53BP1 foci per image was reported relative to total cell number, and normalized to control data. Results are presented as the mean of 15 images ± SEM. *: $p<0.05$ vs control (unexposed cells). Value for controls: unexposed cells 0.27%, 25 µM etoposide: 1.95%.

Figure 6: Cell sensitization to MMS due to long-term exposure to TiO_2-NPs. (A) Viability and (B) DNA strand breaks in cells exposed to NPs for 2 months and then to 100 µM MMS for 24h were assessed by MTT and alkaline comet assay, respectively. (A) Data were normalized to the results obtained in control cells, i.e. cells that were not exposed to MMS. Results are presented as the average of 6 points ± SEM. *: $p<0.05$ vs control (unexposed cells). (B) Results from alkaline comet assay, from cells exposed to TiO_2-NPs for 2 months (white bars) or to TiO_2-NPs for two months, then to 100 µM MMS for 24 h (grey bars). Data are expressed as % tail DNA and are the average of 3 comet slides (50 comets per slides) ± SEM. *: $p<0.05$ vs control (unexposed cells); the % indicates % increase as compared to control (unexposed) cells. Value for positive control: 50 µM H_2O_2 deposited on the slide 5 min before migration: 64.3%.

JUST ACCEPTED

References

Aberg C, Kim JA, Salvati A, Dawson KA. 2013. Theoretical framework for nanoparticle uptake and accumulation kinetics in dividing cell populations. Epl 101(3).

Armand L, Biola-Clier M, Bobyk L, Collin-Faure V, Diemer H, Strub J-M, Cianferani S, Van Dorsselaer A, Herlin-Boime N, Rabilloud T, Carriere M. 2015. Molecular responses of alveaolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: a proteomic view. Journal of Proteomics in press.

Baan RA. 2007. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: Recent evaluations by an IARC Monographs working group. Inhalation Toxicology 19: 213-228.

Barberet P, Incerti S, Andersson F, Delalee F, Serani L, Moretto P. 2009. Technical description of the CENBG nanobeam line. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms 267(12-13): 2003-2007.

Barillet S, Jugan ML, Laye M, Leconte Y, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carriere M. 2010. In vitro evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: Cyto-, genotoxicity and oxidative stress. Toxicology Letters 198(3): 324-330.

Bekker-Jensen S, Mailand N. 2010. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. DNA Repair 9(12): 1219-28.

Beranek DT. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating-agents. Mutation Research 231(1): 11-30.

Brun E, Barreau F, Veronesi G, Fayard B, Sorieul S, Chaneac C, Carapito C, Rabilloud T, Mabondzo A, Herlin-Boime N, Carriere M. 2014. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. Particle and Fibre Toxicology 11.

Campbell JL, Boyd NI, Grassi N, Bonnick P, Maxwell JA. 2010. The Guelph PIXE software package IV. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms 268(20): 3356-3363.

Carriere M, Gouget B, Gallien JP, Avoscan L, Gobin R, Verbavatz JM, Khodja H. 2005. Cellular distribution of uranium after acute exposure of renal epithelial cells: SEM, TEM and nuclear microscopy analysis. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms 231: 268-273.

JUST ACCEPTED

Carriere M, Pigeot-Remy S, Casanova A, Dhawan A, Lazzaroni J-C, Guillard C, Herlin-Boime N. 2014. Impact of titanium dioxide nanoparticle dispersion state and dispersion method on their toxicity towards A549 lung cells and Escherichia coli bacteria. Journal of translational toxicology 1: 10-20.

Chen T, Yan J, Li Y. 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. Journal of Food and Drug Analysis 22(1): 95-104.

Collins AR. 2009. Investigating Oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. Mutation Research-Reviews in Mutation Research 681(1): 24-32.

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 455(1-2): 81-95.

Gerloff K, Albrecht C, Boots AW, Forster I, Schins RP. 2009. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. Nanotoxicology 3(4): 355-364.

Guadagnini R, Halamoda Kenzaoui B, Walker L, Pojana G, Magdolenova Z, Bilanicova D, Saunders M, Juillerat-Jeanneret L, Marcomini A, Huk A, Dusinska M, Fjellsbo LM, Marano F, Boland S. 2015. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. Nanotoxicology 1: 13-24.

Gurr JR, Wang ASS, Chen CH, Jan KY. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. Toxicology 213(1-2): 66-73.

Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Froelich K, Hagen R, Kleinsasser N. 2013. Functional Responses of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells to Metal Oxide Nanoparticles In Vitro. Journal of Biomedical Nanotechnology 9(1): 86-95.

Huang S, Chueh PJ, Lin Y-W, Shih T-S, 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(2): 182-194.

IARC. 2010. Carbon black, titanium dioxide, and talc. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 93: 1-413.

Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO(2)particulates: the contribution of physicochemical characteristics. Part Fibre Toxicol 6(33): 1743-8977.

JUST ACCEPTED

Jugan M-L, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M. 2012. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. Nanotoxicology 6(5): 501-513.

Kim JA, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. 2011. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. Nat Nanotechnol 7(1): 62-8.

Kocbek P, Teskac K, Kreft ME, Kristl J. 2010. Toxicological Aspects of Long-Term Treatment of Keratinocytes with ZnO and TiO2 Nanoparticles. Small 6(17): 1908-1917.

Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. Int J Cancer 17(1): 62-70.

Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Baan R, Mattock H, Straif K, Iarc. 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution. Lancet Oncology 14(13): 1262-1263.

Magdolenova Z, Bilanicova D, Pojana G, Fjellsbo LM, Hudecova A, Hasplova K, Marcomini A, Dusinska M. 2012. Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity. J Environ Monit 14(2): 455-64.

Magdolenova Z, Lorenzo Y, Collins A, Dusinska M. 2012. Can standard genotoxicity tests be applied to nanoparticles? J Toxicol Environ Health A 75(13-15): 800-6.

Mayer M. 2002. Ion beam analysis of rough thin films. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms 194(2): 177-186.

Moller P, Jensen DM, Christophersen DV, Kermanizadeh A, Jacobsen NR, Hemmingsen JG, Danielsen PH, Karottki DG, Roursgaard M, Cao Y, Jantzen K, Klingberg H, Hersoug LG, Loft S. 2015. Measurement of oxidative damage to DNA in nanomaterial exposed cells and animals. Environ Mol Mutagen 56(2): 97-110.

Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. Nat Nanotechnol 7(12): 779-86.

Paur H-R, Cassee FR, Teeguarden J, Fissan H, Diabate S, Aufderheide M, Kreyling WG, Hanninen O, Kasper G, Riediker M, Rothen-Rutishauser B, Schmid O. 2011. In-vitro cell exposure studies

JUST ACCEPTED

for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung-A dialog between aerosol science and biology. Journal of Aerosol Science 42(10): 668-692.

Pogozelski WK, Tullius TD. 1998. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. Chem Rev 98(3): 1089-1108.

Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR. 2009. Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO2 Production As a Basis for Exposure Assessment. Environmental Science & Technology 43(12): 4227-4233.

Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and Fibre Toxicology 10.

Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'Hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carriere M. 2008. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. Toxicology 253(1-3): 137-146.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175(1): 184-191.

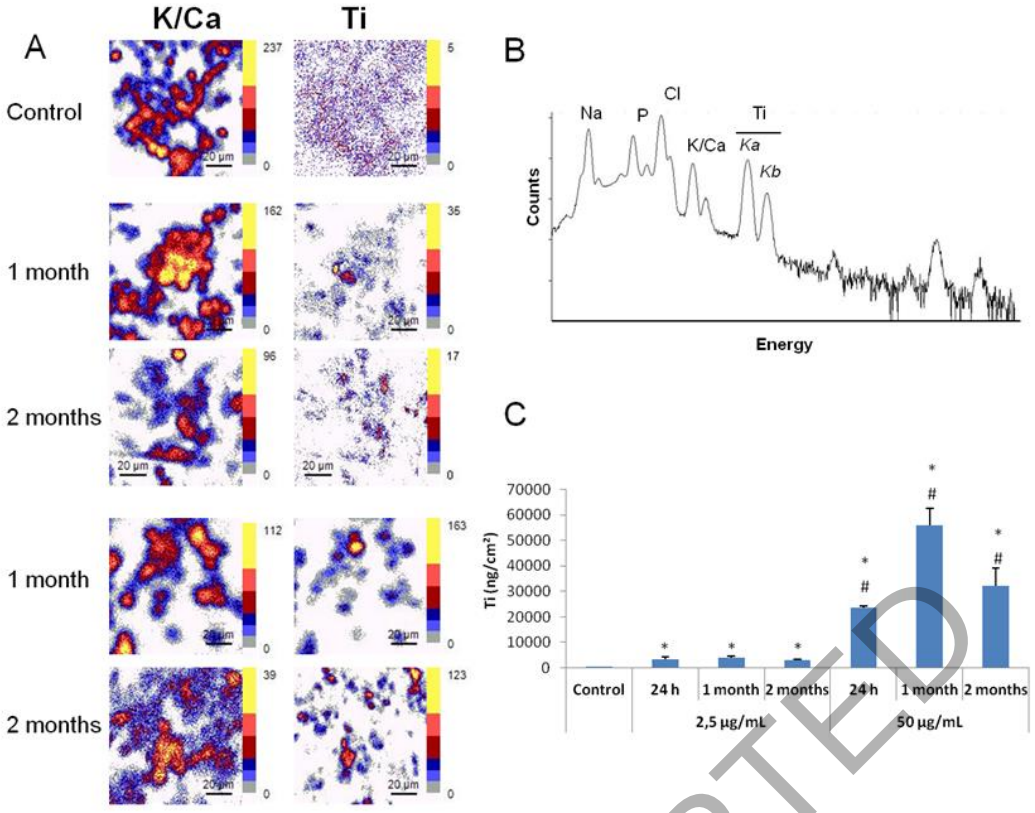
Vales G, Rubio L, Marcos R. 2014. Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. Nanotoxicology 19: 1-11.

Wang S, Hunter LA, Arslan Z, Wilkerson MG, Wickliffe JK. 2011. Chronic Exposure to Nanosized, Anatase Titanium Dioxide Is Not Cyto- or Genotoxic to Chinese Hamster Ovary Cells. Environmental and Molecular Mutagenesis 52(8): 614-622.

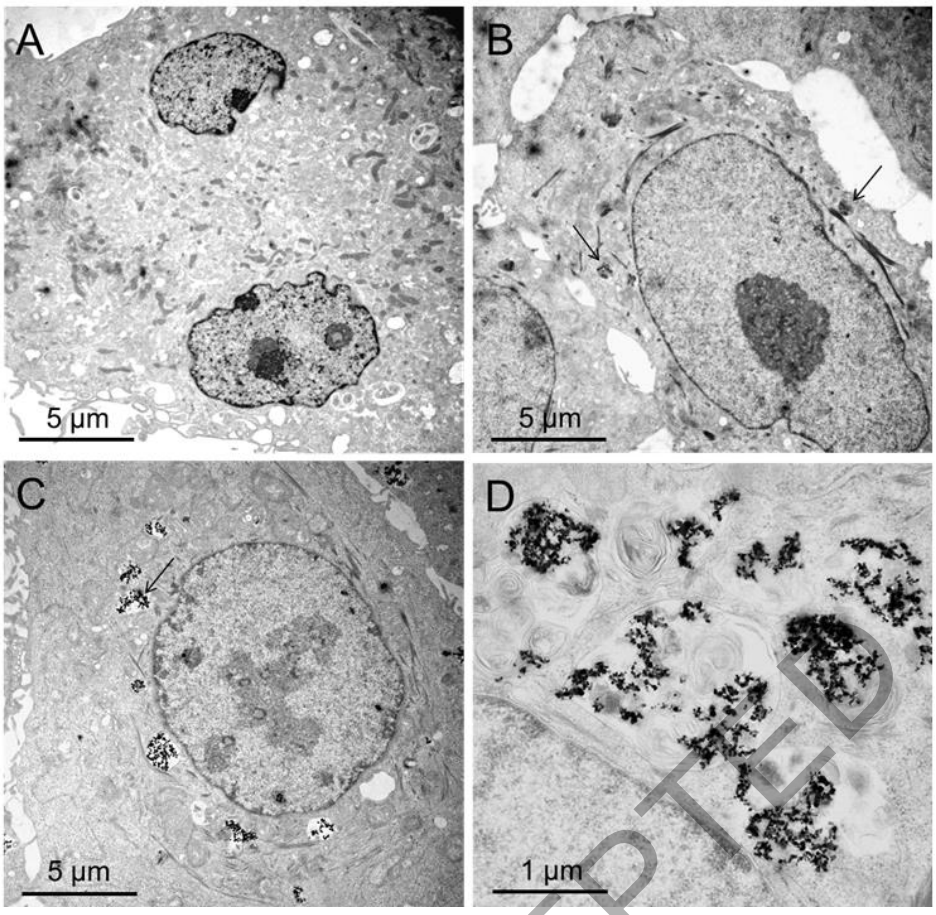
Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. Environmental Science & Technology 46(4): 2242-2250.

Wu J, Sun J, Xue Y. 2010. Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. Toxicology Letters 199(3): 269-276.

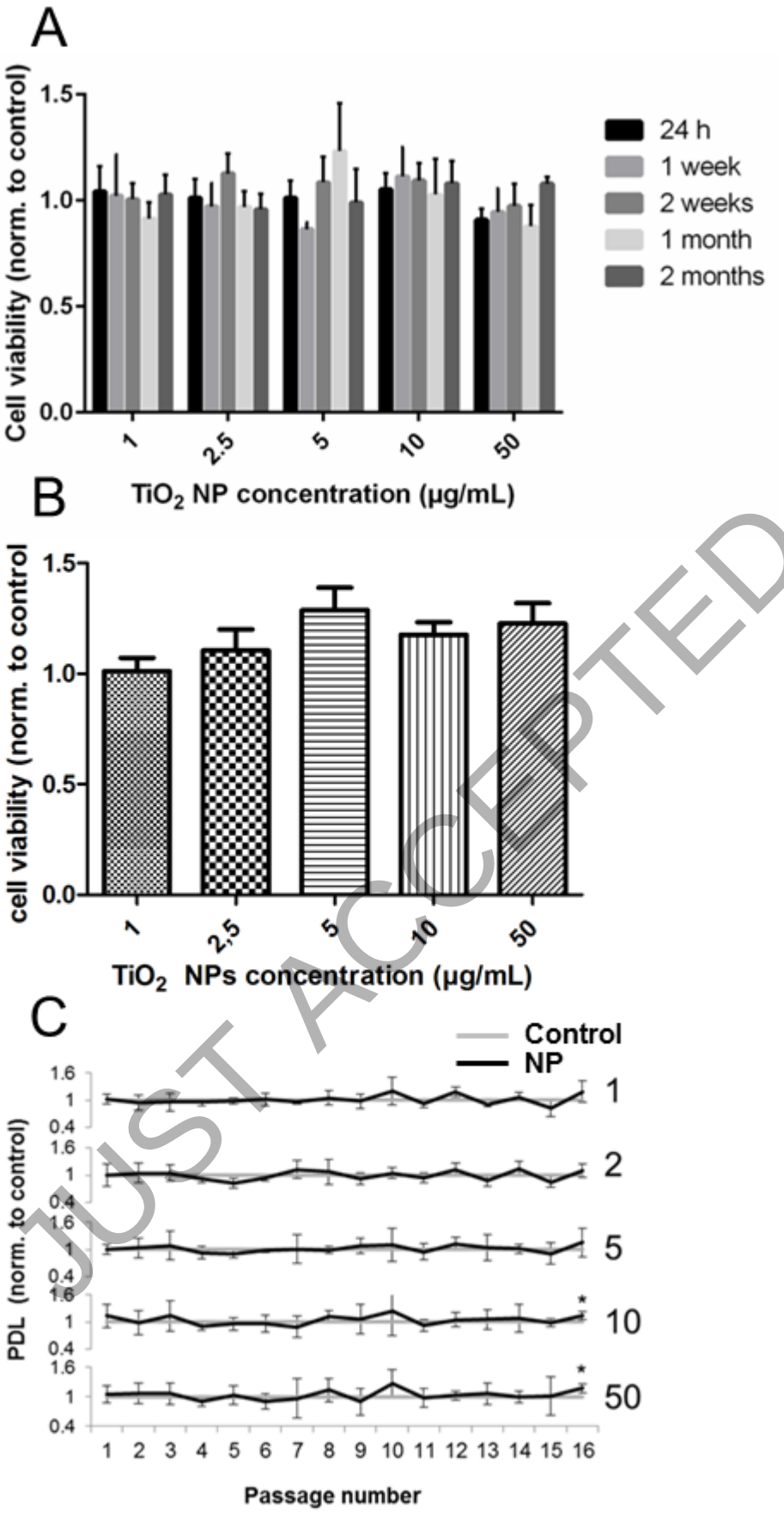
JUST ACCEPTED



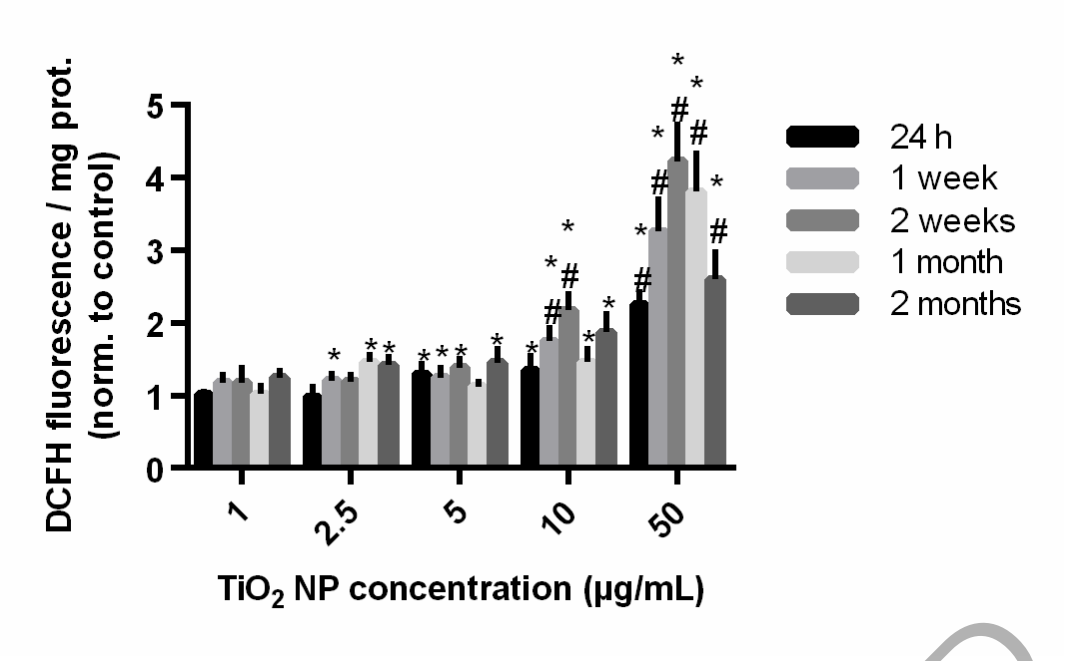
JUST ACCEPTED



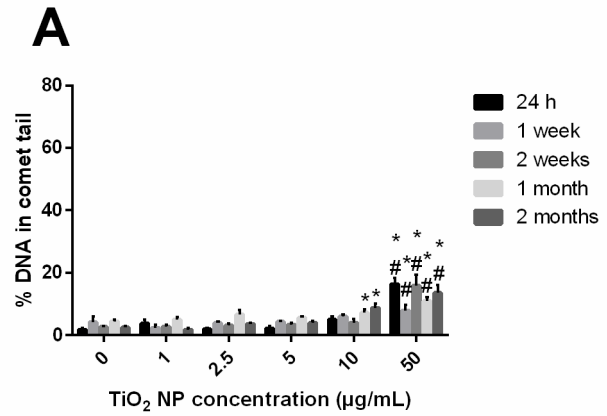
JUST ACCEPTED

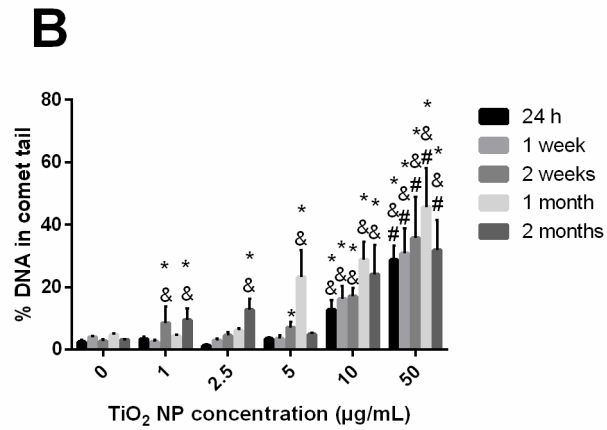


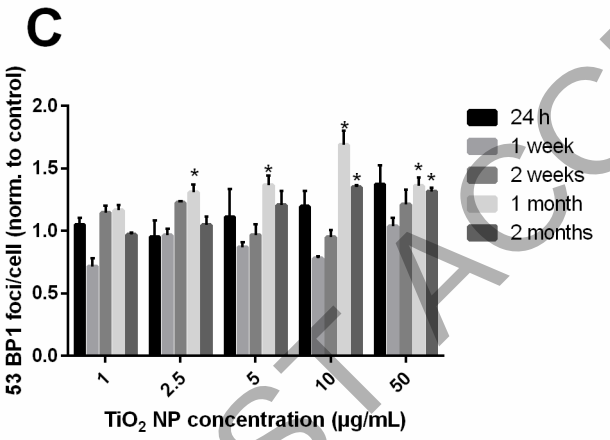
JUST ACCEPTED



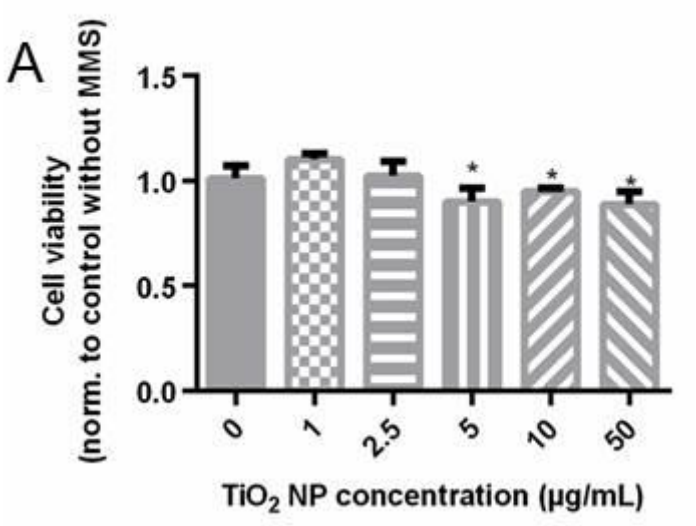
JUST ACCEPTED

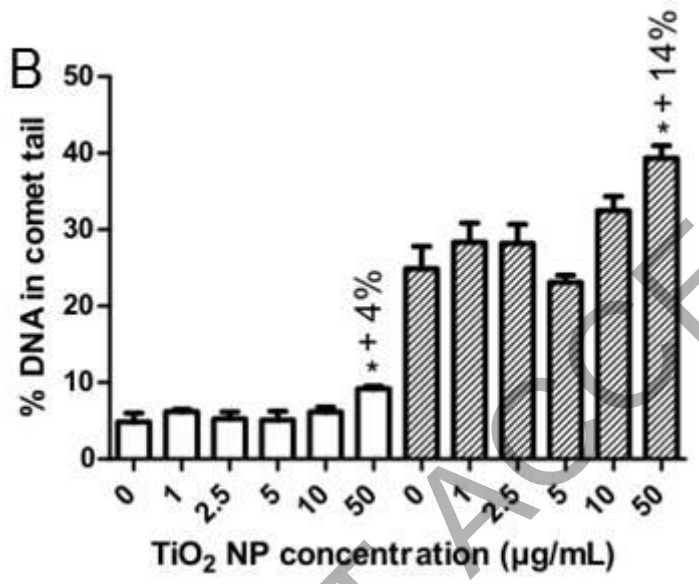






JUST ACCEPTED





JUST ACCEPTED

Annexe 2 : Protocole d'étude de la couronne protéique des NP dans un contexte cellulaire

A. Principe et objectif de l'étude

L'étude de la couronne protéique des NP de TiO_2 et SiO_2 fait l'objet d'un projet collaboratif entre plusieurs laboratoires du CEA (appelé « NaTom » - Tableau 17). L'objectif est d'étudier la nature des protéines adsorbées pour en déduire entre autres les déterminants physico-chimiques de l'adsorption et les dynamiques associées. D'une manière générale, les couronnes protéiques sont obtenues par 3h d'incubation des NP dans un mélange protéique (Figure 42). Les suspensions sont ensuite centrifugées pour en extraire les NP, qui sont lavées, avant d'être soumises à un traitement au dodécylsulfate de sodium (SDS) permettant de décrocher les protéines adsorbées. Ces protéines sont analysées par protéomique shotgun et comparées au mélange protéique de départ. Ce dernier peut être de plusieurs origines, i.e. sérum ou extrait protéique cellulaire, humain ou de levure, etc. Dans le cadre de cette thèse nous nous intéressons particulièrement aux résultats obtenus avec un extrait protéique total de cellules A549 provenant de notre laboratoire. Le protocole d'obtention de cet extrait est détaillé ci-après. L'objectif serait à terme de parvenir à étudier la composition de la couronne protéique de NP extraites de cellules exposées, ce qui serait encore plus représentatif des interactions surfaciques mises en jeu dans la cellule. Cela permettrait entre autres de déterminer si la nature de cette couronne évolue en fonction du temps d'exposition.

Tableau 17 : Liste des laboratoires et personnes impliquées dans le projet NaTom.[a]

Pôle	Département, Institut (Centre)	Nom du responsable	Collaborateurs impliqués
DSV	iBiTec-S (Saclay)	Jean LABARRE	Jean-Christophe AUDE (chercheur CEA) Gilles LAGNIEL (technicien CEA) Stéphane CHEDIN (chercheur CEA) Arach GOLDAR (chercheur CEA) Laurent MARICHAL (doctorant CEA)
DSM	IRAMIS (Saclay)	Serge PIN	Jean-Philippe RENAULT (chercheur CEA) Sandrine MOREAU (technicienne CEA) Laurent MARICHAL (doctorant CEA)
DSM	INAC (Grenoble)	Marie CARRIERE	Mathilde BIOLA-CLIER (doctorante CEA) Adeline TARANTINI (post-doctorante CEA)
DSV	IBEB (Marcoule)	Jean ARMENGAUD	Jean-Charles GAILLARD (technicien CEA)
DSV	iBiTec-S (Saclay)	Yves BOULARD	

[a]« DSV » : Division des Sciences du Vivant, « DSM » : Division des Sciences de la Matière, « iBiTec-S » : Institut de Biologie et de Technologie de Saclay, « IRAMIS » : Institut Rayonnement Matière de Saclay, « IBEB » : Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie, « CEA » : Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives.

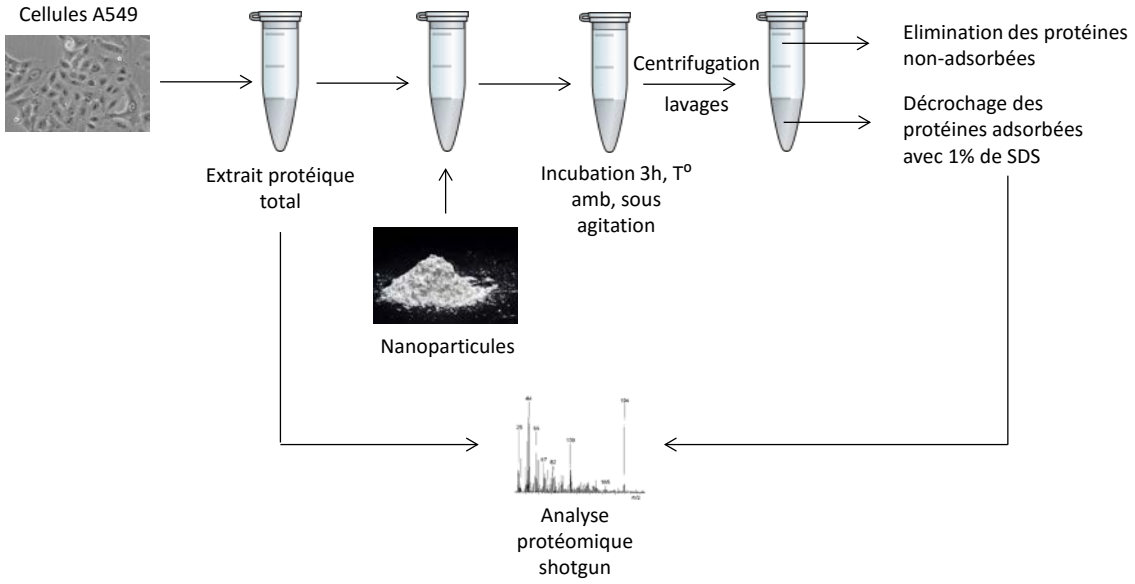


Figure 42 : Schéma du protocole d'analyse de la couronne protéique des NP dans un contexte cellulaire. « T°amb. » : température ambiante, « SDS » : dodécylsulfate de sodium.

B. Protocole d'obtention des extraits protéiques A549

Les cellules A549 sont cultivées dans du DMEM (Life Technologies, 11960-044), dans des conditions précédemment décrites (Jugan et al., 2012), c'est-à-dire avec ajout de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 50 IU/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. Elles sont maintenues dans une atmosphère à 37°C, contenant 5% de CO_2, à saturation d'humidité. Leur récolte est effectuée par trypsination, puis les cellules sont rincées trois fois dans du PBS (Life Technologies, Ref : 14190-094) pour éliminer les résidus de sérum et congelées en culots secs à -80°C. L'extraction protéique est réalisée dans un tampon de lyse contenant 1X d'inhibiteurs de protéases (Roche Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Ref : 11 836 153 001) et 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) dans du PBS 1X. Les culots cellulaires sont resuspendus dans ce tampon, puis soumis à trois cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide, la décongélation ayant lieu à 4°C. Les échantillons sont soniqués 1 min à 4°C, puis centrifugés 10 min à 16 000 rcf, 4°C. Les surnageants sont récupérés et leur concentration totale en protéines est dosée via l'utilisation de réactif de Bradford (Sigma, B6916), par lecture spectrophotométrique à 595 nm. Les extraits protéiques sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Résumé :

Le dioxyde de titane (TiO_2) compte parmi les nanoparticules (NP) les plus produites dans le monde. Ce constat soulève la question de sa toxicité, en particulier par inhalation, voie d'exposition la plus probable en milieu professionnel. Il a été montré précédemment *in vitro* que ces NP induisent des dommages à l'ADN et réduisent l'activité de réparation de l'ADN. L'objectif est ici d'étudier les mécanismes de toxicité sous-jacents à l'aide de cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 exposées à 1-100 µg/mL de NP de TiO_2 pendant 4-48 h. L'expression de 40 gènes et de 6 protéines de réparation de l'ADN a été étudiée par RT-qPCR et western-blot. L'impact des NP de TiO_2 sur des régulateurs amont comme la méthylation des promoteurs de certains de ces gènes, l'activité du protéasome et la signalisation cellulaire par phosphorylation a également été investigué. De plus les profils de cyto-/géno-toxicité et d'expression des gènes de réparation de l'ADN ont été comparés avec ceux des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B. Les résultats montrent une répression globale des gènes et des protéines dans l'ensemble des voies de réparation de l'ADN. Cette répression pourrait être due en partie à la répression de régulateurs transcriptionnels et à l'augmentation de la méthylation de certains promoteurs et de l'activité caspase du protéasome. Les NP de TiO_2 engendrent par ailleurs une perturbation du phosphoprotéome. Invisible à l'échelle du phosphoprotéome entier, celle-ci impacte de nombreuses protéines impliquées dans divers processus cellulaires, reflétant les effets toxiques connus de ces NP. On note en particulier un impact sur le cycle cellulaire, mais pas sur la prolifération, ainsi que la dérégulation du niveau de phosphorylation de quelques protéines liées à la réparation de l'ADN. Enfin on relève des profils de cyto-/géno-toxicité et d'expression des gènes de réparation de l'ADN similaires dans les cellules A549 et BEAS-2B, ce qui renforce la pertinence de ces modèles dans le cadre de l'étude de la génotoxicité des nanomatériaux. Dans l'ensemble, ces données apportent de nouvelles pistes d'explication des mécanismes de toxicité des NP de TiO_2, qui pourraient notamment expliquer la chute précédemment observée des capacités cellulaires de réparation de l'ADN.

Abstract:

Titanium dioxide (TiO_2) belongs to the top nanoparticles (NPs) most produced worldwide. This raises the question of their impact on human health, especially through inhalation, which is the main exposure route in occupational settings. It was previously shown *in vitro* that these NPs induce DNA damage and impair DNA repair activity. The aim here is to study the underlying toxicity mechanisms, in human A549 epithelial alveolar cells exposed to 1-100 µg/ml TiO_2 NPs during 4-48 h. The expression of 40 genes and 6 proteins involved in DNA repair was investigated by RT-qPCR and western-blotting. The impact of TiO_2 NPs on upstream regulators such as the methylation rate of some corresponding gene promoters, proteasome activity and cellular signaling through phosphorylation was assayed as well. Moreover cyto-/geno-toxicity and DNA repair gene expression patterns were compared with those of BEAS-2B bronchial epithelial cells. Results show a global down-regulation of genes and proteins in all DNA repair pathways. This could be partly explained by the down-regulation of transcriptional regulators and increased gene promoter methylation and caspase-like proteasome activity. TiO_2 NPs also scramble the phosphoproteome. While invisible on a global scale, this dysregulation affects numerous proteins involved in diverse cellular processes, which reflect the toxicity pathways reported for these NPs. Although cell proliferation is unaffected, a significant impact is observed on cell cycle, as well as on a few proteins involved in DNA repair. Finally cyto-/geno-toxicity and DNA repair gene expression profiles are similar in both A549 and BEAS-2B cells, thereby strengthening the relevance of using any of these cell lines in nanomaterial genotoxicity studies. On the whole these data bring novel insights into TiO_2-NP toxicity mechanisms, which could especially explain the previously observed impairment of DNA repair activity.