



**HAL**  
open science

# Impact du colorant alimentaire E171 et de nanoparticules de dioxyde de titane sur des modèles cellulaires, *in vitro*, d'épithélium intestinal

Marie Dorier

## ► To cite this version:

Marie Dorier. Impact du colorant alimentaire E171 et de nanoparticules de dioxyde de titane sur des modèles cellulaires, *in vitro*, d'épithélium intestinal. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV082 . tel-01690732

**HAL Id: tel-01690732**

**<https://theses.hal.science/tel-01690732>**

Submitted on 23 Jan 2018

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Marie DORIER**

Thèse dirigée par **Marie Carrière**

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

# Impact du colorant alimentaire E171 et de nanoparticules de dioxyde de titane sur des modèles cellulaires, *in vitro*, d'épithélium intestinal.

Thèse soutenue publiquement le **16 novembre 2016**  
devant le jury composé de :

**Pr. Armelle BAEZA-SQUIBAN**

Professeur à l'Université Paris Diderot, Rapporteur

**Pr. Xavier COUMOUL**

Professeur à l'Université Paris Descartes, Rapporteur

**Dr. Thierry RABILLOUD**

Directeur de recherche CNRS au CEA-Grenoble, Président du jury

**Dr. Anna BENCSIK**

Directeur de recherche à l'ANSES, Examineur

**Dr. Marie CARRIERE**

Directeur de recherche au CEA-Grenoble, Directrice de thèse

**Dr. Hélène DESQUEYROUX**

Ingénieure de recherche à l'ADEME, Invitée



Merci à mes deux financeurs de thèse, L'ADEME et le CEA



## Remerciements

Je commencerai par remercier mes deux rapporteurs d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, le Pr Armelle BAEZA-SQUIBAN et le Pr Xavier COUMOUL, ainsi que les autres membres du jury, Dr Thiery RABILLOUD, Dr Anna BENCSIK et Dr Hélène DESQUEYROUX. Sans oublier les membres de mon comité de suivi de thèse, Frédérick BARREAU et Eric HOUDEAU pour leurs conseils avisés et leur expertise quant à mon sujet de thèse.

Un grand merci à Marie CARRIERE, ma directrice de thèse : pour ta confiance, ta patience, ainsi que ton expertise, ton aide et tes conseils durant ces trois années.

Je tiens également à remercier l'ADEME et le CEA d'avoir financé cette thèse ainsi que le labex Sérénade (ANR), le programme Tox du CEA (projet Imaginatox) et l'ANSES (projet Nanogut) d'avoir participé aux financements de mes travaux de thèse.

Je remercie tous les membres de ce projet, en particulier Nathalie HERLIN-BOIME et son équipe pour la caractérisation des lots de E171 et des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, Muriel DUBOSSON et Caroline MARIE-DESVERGNES pour leur aide précieuse dans les manipulations ICP-MS et inflammation, Karin PERNET-GALLEY et Anne BERTRAND pour les manipulations de microscopie électronique et Véronique COLLIN-FAURE pour les manipulations FACS.

C'était un plaisir de faire partie de l'équipe des filles nanos ! Ce fut toujours une équipe de choc, Lucie et Mathilde pour commencer, c'était chouette de travailler avec vous les filles ! Puis Laure et Adeline, merci beaucoup pour tout, vous êtes des filles en or. Je leur souhaite à toutes beaucoup de réussite dans leurs projets professionnels et personnels.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire du LAN, que j'ai côtoyés durant ces 5 années, et grâce à qui j'ai eu plaisir à venir travailler. Thierry

DOUKI, Jean-Luc RAVANAT, respectivement chef du service et du laboratoire, Jean, Walid, Christine, Didier, Morgane, Aurélie, Camille G, Ewa, Amandine, Izabel, Camille C, Stéphanie Silerme. Merci pour les bons moments partagés, au labo ou en dehors. Un grand merci à Zohra TERMACHE, pour ton aide précieuse dans les aléas de l'administratif et tes petits mots gentils. Je remercie aussi chaleureusement Sylvain et David pour leur aide technique, pratique, logistique... et j'en passe. Merci également à Sylvie SAUVAIGO, avec qui j'ai effectué mon stage de fin d'étude, je garde de très bons souvenirs du labo jaune ! Je remercie en particulier Sarah, Anne, Simona, Laure, Carine, Adeline pour les bons moments que nous avons partagés.

Merci à toute l'équipe du LAN pour vos petits mots gentils, en particulier pendant les derniers mois de rédaction !

Mais le doctorat ne se limite pas aux frontières du laboratoire, la vie associative m'a en particulier beaucoup apportée. Ces trois années ont aussi été l'occasion de belles rencontres, grâce à l'aventure Glob'Alps, l'association des doctorants de chimie et Sciences du vivant et l'organisation du forum BIOTechno, pour une édition grenobloise du tonnerre en 2016 ! Mikaël, Souad, Carine, Félix et Lisa, merci pour tous ces bons moments.

J'ai une pensée pour mes camarades à Grenoble, colocataires, skieurs, randonneurs, coureurs,

Pour mes amies de longue date, Manon, Adeline, Elodie, Marion, Marie-Amédée, Carole, Mathilde, Soukaina.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour mes parents, ma sœur Pauline et Antoine. Vous qui me connaissez le mieux, merci beaucoup pour votre affection et votre soutien.

# Sommaire

Sommaire.....	1
Principales abréviations .....	5
Liste des figures .....	8
Liste des tableaux .....	11
Chapitre 1.....	12
Contexte de l'étude.....	12
Partie I : Particules et nanoparticules de TiO <sub>2</sub> .....	12
1. Particules de TiO <sub>2</sub> micrométriques.....	12
2. Nanoparticules de TiO <sub>2</sub> .....	16
3. Le TiO <sub>2</sub> dans l'alimentation .....	21
4. Voies d'exposition aux particules et nanoparticules, valeurs limites d'exposition.....	27
Partie II : Barrière intestinale humaine .....	31
1. Les éléments de la barrière intestinale .....	31
2. Modèles cellulaires <i>in vitro</i> d'épithélia intestinaux .....	54
Partie III : Effets biologiques des particules de TiO <sub>2</sub> sur l'intestin, état de l'art .....	62
1. Propriétés physico-chimiques et activité biologique des NPs .....	62
2. Impact biologique des NPs de TiO <sub>2</sub> après leur ingestion .....	64
3. Le E171 en particulier .....	84
4. Impact sur la barrière intestinale et lien avec les maladies intestinales..	86
Partie IV : Maladies de l'intestin .....	89
1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) .....	89
2. Cancers .....	93
objectifs et démarche.....	98
Chapitre 2.....	100
matériels et méthodes .....	100
1. Particules de TiO <sub>2</sub> utilisées .....	100

2. Modèle cellulaires .....	102
3. Modalités d'exposition des cellules aux particules.....	107
4. Techniques utilisées pour évaluer des effets des particules sur les différents modèles cellulaires.....	110
5. Analyse statistique .....	132
Chapitre 3.....	133
caractérisation : modeles cellulaires et particules.....	133
Partie I : modèles cellulaires.....	134
1. Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX.....	134
2. Caco-2(C1)/RajiB.....	141
3. Intégrité des épithélia intestinaux par mesure TEER.....	145
Partie II : caractérisation des particules de TiO <sub>2</sub> .....	147
1. Le colorant E171 .....	147
2. Les NPs de TiO <sub>2</sub> : A12 et P25.....	150
3. Récapitulatif des trois particules de TiO <sub>2</sub> de l'étude.....	153
4. Suivi de la dispersion après les expositions chroniques.....	153
Chapitre 4.....	156
cyto-, géno-toxicité, stress oxydant et stress du réticulum .....	156
Partie I : effets des particules sur des épithélia intestinaux différenciés.....	157
1. Introduction .....	157
2. Article 1 .....	158
Abstract .....	158
Introduction.....	159
Material and Methods.....	162
Results.....	169
Discussion.....	179
Conclusion .....	182
Acknowledgments .....	183
Supplementary data .....	184

3. Résultats complémentaires : Accumulation des particules dans les cellules.....	192
4. Conclusion .....	194
Partie II : cellules non différenciées, résultats complémentaires .....	196
1. Introduction .....	196
2. Article 2.....	198
Abstract .....	198
Introduction.....	199
Material and Methods.....	201
Results .....	205
Discussion.....	215
Conclusion .....	217
Acknowledgments .....	218
Supplementary data .....	218
3. Conclusion .....	222
Conclusion sur la toxicité du E171 .....	223
Chapitre 5.....	224
impact sur la fonction de barrière intestinale .....	224
Partie I : Effets de deux NP-TiO <sub>2</sub> sur des cellules Caco-2 non différenciées ..	225
1. Introduction .....	225
2. Résultats .....	226
3. Conclusion .....	228
Partie II : Effets du E171 sur la fonction de barrière, sur des modèles de cellules intestinales différenciées.....	229
1. Introduction .....	229
2. Article 3.....	232
Abstract .....	232
Introduction.....	234
Material and Methods.....	237
Results.....	243

Discussion.....	255
Conclusion .....	258
Supplementary data .....	259
3. Résultats complémentaires, sécrétion du mucus .....	262
4. Conclusion .....	265
Conclusion sur l'impact de la fonction de barrière.....	266
Chapitre 6.....	267
Discussion et perspectives .....	267
Discussion méthodologique .....	267
Discussion générale sur les résultats .....	273
Perspectives .....	283
Conclusion .....	285
Références.....	288
Annexes .....	320
Résumé/Abstract.....	323

## Principales abréviations

<b>8-oxo-dG</b>	8-oxo-2'-désoxyguanosine
<b>ABC</b>	ATP binding cassette
<b>ADI</b>	Acceptable dose ingested
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ALP</b>	Alkaline phosphatase activity
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>APC gène</b>	Adenomatous polyposis coli
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénine triphosphate
<b>ATG16L</b>	Autophagy-related protein 16-1
<b>BC</b>	Bande de conduction
<b>BCRP</b>	Breast cancer resistance protein.
<b>BV</b>	Bande de valence
<b>CCR</b>	Centre commun de recherche
<b>Cellules APC</b>	Cellules présentatrices d'antigène
<b>Cellules M</b>	Cellules Microfold
<b>CFU</b>	Colony forming unit
<b>CIRC</b>	Centre international de recherche sur le cancer
<b>CSRSEN/SCENIHR</b>	Comité scientifique des risques sanitaires émergents et nouveaux
<b>DLS</b>	Dynamic light scattering
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>dNTP</b>	désoxynucleotide tri phosphate
<b>DO</b>	Densité optique
<b>Domaines PST</b>	Domaines riches en proline, thréonine et sérine
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EDTA</b>	acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EFSA</b>	l'agence européenne de sécurité des aliments
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>E171</b>	Additif alimentaire contenant du TiO <sub>2</sub>
<b>E551</b>	Additif alimentaire contenant du SiO <sub>2</sub>
<b>FDA</b>	Food and drug administration

<b>GALT</b>	Gut associated lymphoïd tissue
<b>GWAS</b>	Genome wide association study
<b>HMP</b>	Human microbiome project
<b>HuMiX</b>	Human microbial cross-talk,
<b>HUVEC</b>	Human umbilical vein endothelial cells
<b>IBD</b>	inflammatory bowel diseases
<b>ICP-MS</b>	Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif
<b>IgA, IgG</b>	Immunoglobuline A, Immunoglobuline G
<b>IL-(1, 2...)</b>	Interleukin
<b>INCO</b>	Information des consommateurs sur les denrées alimentaires
<b>INF</b>	Interférons
<b>IP</b>	Iodure de propidium
<b>IRGM</b>	Immunity-related GTPase family M protein
<b>ITLN1</b>	Intelectines 1
<b>JECFA</b>	Joint Expert Committee on Food Additives
<b>KLF4</b>	Kruppel-like factor 4
<b>LNE</b>	L'agence nationale de métrologie et d'essais
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2)
<b>MDR1</b>	Multidrug Resistance 1
<b>MET</b>	Microscopie électronique en transmission
<b>MICI</b>	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
<b>MRP1</b>	Multidrug resistance-associated proteins 1
<b>MRP2</b>	Multidrug resistance-associated proteins 2
<b>MUC(1,2..)</b>	Mucines 1, 2...
<b>NEDO</b>	New energy and industrial technology development organization
<b>NIH</b>	National institute of health
<b>NIOSH</b>	National institute for occupational safety and health
<b>NOAEL</b>	No observable adverse effect level
<b>NOD-like receptors</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
<b>NOD2</b>	nucleotide-binding oligomerization domain 2
<b>NPs</b>	Nanoparticules
<b>OECD</b>	Organisation for economic co-operation and development
<b>ONG</b>	Organisation non gouvernementale
<b>PAL</b>	Phosphatases alcalines

<b>PAMPS</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cell
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PRRs</b>	Pattern recognition receptors
<b>RANTES</b>	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (CCL5)
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
<b>RT</b>	Reverse transcriptase
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de silice
<b>SLC</b>	Solute carrier
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SVF</b>	Sérum de veau foetal
<b>TEER</b>	Transepithelial electrical resistance
<b>TFF3</b>	Trefoil factor 3
<b>Th1, ...</b>	Lymphocytes T helpes
<b>Ti</b>	titane
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de titane
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>UV</b>	Ultraviolets
<b>VME</b>	Valeur moyenne d'exposition

## Liste des figures

Figure 1 : Structure cristalline des différentes formes de TiO <sub>2</sub> .....	14
Figure 2 : Le TiO <sub>2</sub> est un semi-conducteur.....	15
Figure 3 : Echelle de taille (en mètre) des nano-objets par rapport au monde qui nous entoure <sup>2</sup> .....	17
Figure 4 : Exemple d'applications pour le TiO <sub>2</sub> nano et micrométrique.....	20
Figure 5 : Nanoparticules de TiO <sub>2</sub> présentes dans l'alimentation et médias.....	26
Figure 6 : Principales voies d'expositions aux nanoparticules de TiO <sub>2</sub> et leur devenir dans l'organisme.....	29
Figure 7 : Proportions des différents phyla bactériens et des principales espèces bactériennes dans l'estomac, l'intestin grêle et le colon de l'homme.....	33
Figure 8 : Structure et morphologie de l'intestin grêle.....	35
Figure 9 : Villosités intestinales.....	36
Figure 10 : Représentation schématique de l'épithélium intestinal.....	37
Figure 11 : Différenciation terminale des cellules de l'intestin.....	38
Figure 12 : Voies de différenciations des cellules de l'épithélium intestinal.....	39
Figure 13 : Distribution des principaux transporteurs membranaires sur la partie basolatérale et apicale des entérocytes.....	42
Figure 14 : Représentation schématique des jonctions cellulaires.....	43
Figure 15 : Epaisseur du mucus intestinal chez le rat.....	45
Figure 16 : Structure de la couche de mucus.....	46
Figure 17 : Structure des mucines MUC1 et MUC2.....	47
Figure 18 : Tissus lymphoïdes de l'intestin.....	52
Figure 19 : Sites inducteurs et effecteurs de l'immunité intestinale.....	53
Figure 20 : Cellules Caco-2.....	55
Figure 21 : Paramètres influençant la culture de la lignée cellulaire Caco-2.....	57
Figure 22 : Cellules HT-29.....	57
Figure 23 : Ratio surface/volume des particules en fonction de leur taille.....	63
Figure 24 : Propriétés physico-chimiques des nanoparticules.....	64
Figure 25 : Les trois principaux modes de toxicité des NPs dans la cellule.....	67
Figure 26 : Endocytose et exocytose dans la cellule eucaryote.....	70
Figure 27 : Système enzymatique de régulation des ROS.....	75

Figure 28 : Activation de la voie UPR suite à un stress du RE.....	78
Figure 29 : Structure de la double hélice d'ADN.....	80
Figure 30 : Image tirée de la campagne de l'association François Aupetit (afa) sur les MICI.....	89
Figure 31 : Camembert imagé d'un régime alimentaire équilibré.....	95
Figure 32 : Carcinogénèse intestinale.....	96
Figure 33 : Démarche de l'étude.....	99
Figure 34 : Montage du Cup Horn.....	101
Figure 35 : Monoculture des cellules Caco-2.....	105
Figure 36 : Coculture des Caco-2 et HT29-MTX.....	105
Figure 37 : Culture cellulaire en plaque Transwell.....	106
Figure 38 : Coculture de cellules Caco-2(C1) et de cellules RajiB.....	107
Figure 39 : Protocoles d'expositions aiguës de cellules non différenciées.....	108
Figure 40 : Protocoles d'expositions aiguës de cellules différenciées.....	109
Figure 41 : Protocole d'exposition chronique.....	110
Figure 42 : Représentation schématique de la mesure de la TEER d'un épithélium cellulaire.....	112
Figure 43 : Test des comètes pour la quantification des cassures de l'ADN dans les noyaux cellulaires.....	116
Figure 44 : Principe de l'ELISA BioPlex MagPix™ .....	128
Figure 45 : Coloration au bleu Alcian des modèles cellulaires 1 et 2 et de la lignée cellulaire HT29-MTX.....	136
Figure 46 : Coloration au bleu Alcian des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX.....	137
Figure 47 : Coloration à l'acide périodique de Schiff de la monoculture Caco-2 et de la coculture Caco-2/HT29-MTX.....	138
Figure 48 : Coloration Fast-Red des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX.....	139
Figure 49 : Coloration Fast-Red des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX.....	139
Figure 50 : Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX.....	140

Figure 51 : Expression des gènes codant les protéines GP2 et C5aR.....	143
Figure 52 : Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline dans le modèle cellulaire de coculture Caco-2(C1)/RajiB.....	144
Figure 53 : Mesure de la TEER des modèles cellulaires Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX, en tant que contrôle.....	146
Figure 54 : Exemple de poudre du colorant E171, commercialisée sur un site internet.....	147
Figure 55 : Diagramme de distribution de taille dans l'eau des particules E171 mesurée par DLS.....	149
Figure 56 : Diagramme de distribution de taille dans l'eau des particules A12 mesurée par DLS.....	151
Figure 57 : Diagramme de distribution de taille dans l'eau des particules P25 mesurée par DLS.....	152
Figure 58 : Suivi de la dispersion des particules par DLS lors d'une exposition chronique.....	155
Figure 59 : Calibration de la minéralisation des particules de TiO <sub>2</sub> .....	193
Figure 60 : Accumulation des particules de TiO <sub>2</sub> dans cellules.....	194
Figure 61 : Contenu protéique des transporteurs ABC dans les cellules Caco-2 exposées à A12 et R20.....	227
Figure 62 : Cytotoxicité des antibiotiques inhibiteurs de la sécrétion des protéines sur la lignée cellulaire Caco-2.....	263
Figure 63 : Cytotoxicité des antibiotiques inhibiteurs de la sécrétion des protéines sur la lignée cellulaire HT29-MTX.....	264
Figure 64 : Résultats préliminaires obtenus par Western Blot pour la quantification des mucines MUC1 et MUC4.....	265

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Années d'approbations du TiO <sub>2</sub> comme additif alimentaire dans diverses catégories de produits.....	23
Tableau 2 : Pourcentages de nanoparticules de TiO <sub>2</sub> présentes dans des produits alimentaires.....	27
Tableau 3 : Principales cellules du système immunitaire inné et acquis.....	50
Tableau 4 : Principales cytokines.....	51
Tableau 5 : Valeurs pour le test des mycoplasmes.....	104
Tableau 6 : Amorces utilisées pour l'analyse des gènes par RT-qPCR.....	121
Tableau 7 : Amorces qui n'ont pas marché dans nos conditions.....	122
Tableau 8 : Anticorps primaires pour Western-Blot-Transporteurs ABC.....	124
Tableau 9 : Anticorps primaires pour Western-Blot-Modèle de plaque de Peyer..	124
Tableau 10 : Anticorps primaires pour Western-Blot-Mucus.....	125
Tableau 11 : kits ELISA utilisés.....	127
Tableau 12 : Protocoles testés pour la quantification de l'activité Alcaline phosphatase dans les cellules.....	132
Tableau 13 : Caractérisation physico-chimique des différents lots du colorants E171.....	148
Tableau 14 : Potentiel zêta des particules E171.....	150
Tableau 15 : Caractérisation physico-chimique des NPs de TiO <sub>2</sub> A12 et P25.....	151
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des principales informations sur les trois particules de TiO <sub>2</sub> utilisées dans cette thèse.....	153

# CONTEXTE DE L'ETUDE

---

### *Partie I : Particules et nanoparticules de TiO<sub>2</sub>*

Cette première partie décrit tout d'abord l'origine et les caractéristiques physico-chimiques des particules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), qui existent sous forme micrométrique et nanométrique. Elle présente ensuite leurs principales applications et notamment celles du secteur de l'agroalimentaire, en particulier le colorant alimentaire E171. Enfin, sont exposées les principales voies d'expositions aux particules de TiO<sub>2</sub>, et les valeurs limites d'exposition recommandées.

#### 1. Particules de TiO<sub>2</sub> micrométriques

##### 1.1 Origine

Le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) (CAS-No. 13463-67-7) est l'oxyde naturel du Titane (Ti), le neuvième élément chimique le plus abondant de la croûte terrestre devant l'hydrogène et derrière le magnésium (0,6 %). Le TiO<sub>2</sub> utilisé dans l'industrie est extrait de gisements constitués de différentes formes minérales de Ti. C'est un composé très inerte qui est extrait à partir des minerais par un procédé utilisant des chlorures ou par des traitements à l'acide sulfurique (Sugimoto *et al.*, 2003). Le rutil est le minerai qui contient le plus de TiO<sub>2</sub> (85-90 %) mais il est peu disponible naturellement. De ce fait, le TiO<sub>2</sub> utilisé dans les produits de consommation est majoritairement extrait d'autres minerais plus abondants : l'ilménite, TiFeO<sub>3</sub>, présent dans des sables de plage ou dans des roches dures et le leucoxène, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.nTiO<sub>2</sub>, produit de dégradation naturel de l'ilménite (Jovanović, 2015; Sahu *et al.*, 2006). L'ilménite constitue la principale réserve mondiale de Ti, on en trouve principalement en Afrique du Sud, en Australie ou au Canada (Sahu *et al.*, 2006; Towner *et al.*, 1988). C'est de ce minerai que sont extrait les 95 % de l'origine du TiO<sub>2</sub> pigmentaire utilisé aujourd'hui (contre 5 % provenant

directement du rutile). L'exploitation de mines de titane constitue un enjeu économique et écologique. Par exemple, la compagnie Australienne Mineral Commodities<sup>1</sup> projette d'ouvrir une mine de titane en Afrique du sud. Celle-ci compte extraire près de 450 000 tonnes de minerais de titane, par an et pendant 22 ans, principalement de l'ilménite qu'elle vendra aux industries aéronautique, chimique, énergétique et militaire, ce qui devrait lui assurer un chiffre d'affaire de 110 millions d'euros.

## 1.2 Propriétés et structure

Le  $\text{TiO}_2$  est un oxyde métallique de transition se présentant sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau, de poids moléculaire 79,9 g/mol, de point d'ébullition 2972°C, de point de fusion 1843°C et de densité 4,26 g/cm<sup>3</sup> à 25°C (Shi *et al.*, 2013). A l'état naturel il existe sous 3 formes cristallines différentes, le rutile et l'anatase qui ont un système cristallin quadratique et la brookite qui a un système cristallin orthorhombique (INRS, 2013; Jovanović, 2015). Les motifs cristallins de ces structures sont présentés dans la figure 1. D'autres formes existent mais sont moins courantes, par exemple le  $\text{TiO}_2$  (B) monoclinique ou encore le  $\text{TiO}_2$  (II) et le  $\text{TiO}_2$  (H) hollanditique qui sont stables uniquement à très haute pression (Gupta and Tripathi, 2011). La forme rutile est beaucoup plus abondante que la forme anatase. Il est thermodynamiquement stable alors que l'anatase et la brookite sont métastables et tendent à se transformer en rutile à hautes températures (Hanaor and Sorrell, 2010). Au contraire, sous forme nanoparticulaire, l'anatase est thermodynamiquement plus stable (Lazzeri *et al.*, 2001; Zhang and Banfield, 1998).

---

<sup>1</sup>[http://www.lemonde.fr/planete/visuel/2016/05/23/sur-la-cote-sud-africaine-conflit-sanglant-autour-d-un-projet-de-mine-de-titane\\_4924734\\_3244.html](http://www.lemonde.fr/planete/visuel/2016/05/23/sur-la-cote-sud-africaine-conflit-sanglant-autour-d-un-projet-de-mine-de-titane_4924734_3244.html)

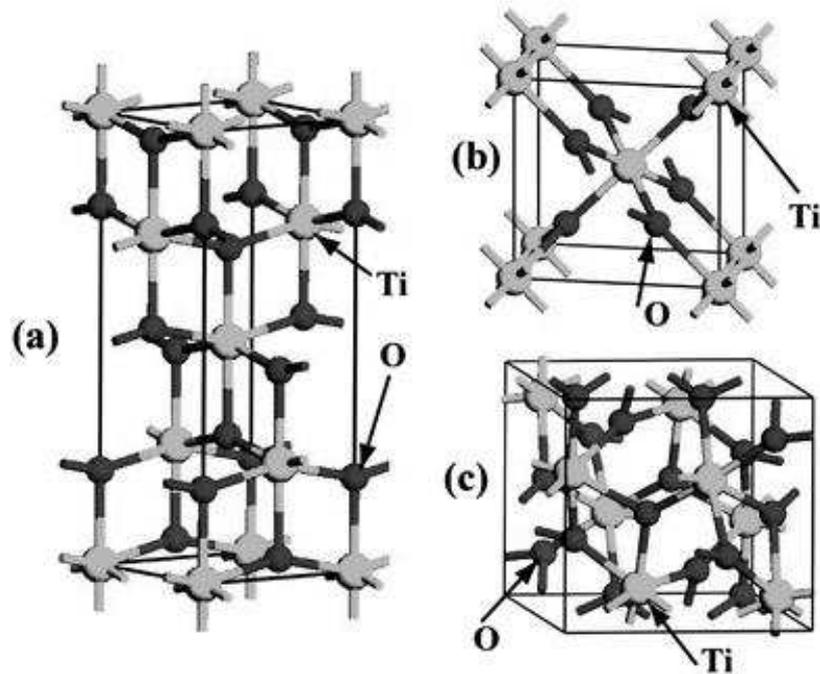


Figure 1 : Structure cristalline des différentes formes de  $\text{TiO}_2$ . (a) anatase, (b) rutile, (c) brookite (Zhang *et al.*, 2014).

### 1.3 Utilisations industrielles

Dans l'industrie, le  $\text{TiO}_2$  est exploité pour ses deux principales propriétés :

*-ses propriétés optiques :* Le  $\text{TiO}_2$  absorbe les UV et indépendamment de la forme cristalline son indice de réfraction est élevé (entre 2,49 et 2,90) (Jovanović, 2015). Aussi, 96 % de la lumière est réfléchi, ce qui en fait un très bon écran solaire et lui confère sa couleur blanche.

*-ses propriétés photo-catalytiques :* Le  $\text{TiO}_2$  est un semi-conducteur (figure 2), de ce fait ses électrons peuvent être excités par des photons lumineux. Il est photo-activé par un large spectre lumineux (UV-A, B, C, ou encore rayons X), engendrant la formation de radicaux hautement réactifs qui sont capables d'oxyder les molécules organiques voisines (Chen and Mao, 2007; Skocaj *et al.*, 2011). Du fait de sa mobilité électronique plus importante, sa densité et sa constante diélectrique plus faible, l'anatase est un meilleur catalyseur que les autres formes cristallines (Gupta and Tripathi, 2011; Jovanović, 2015).

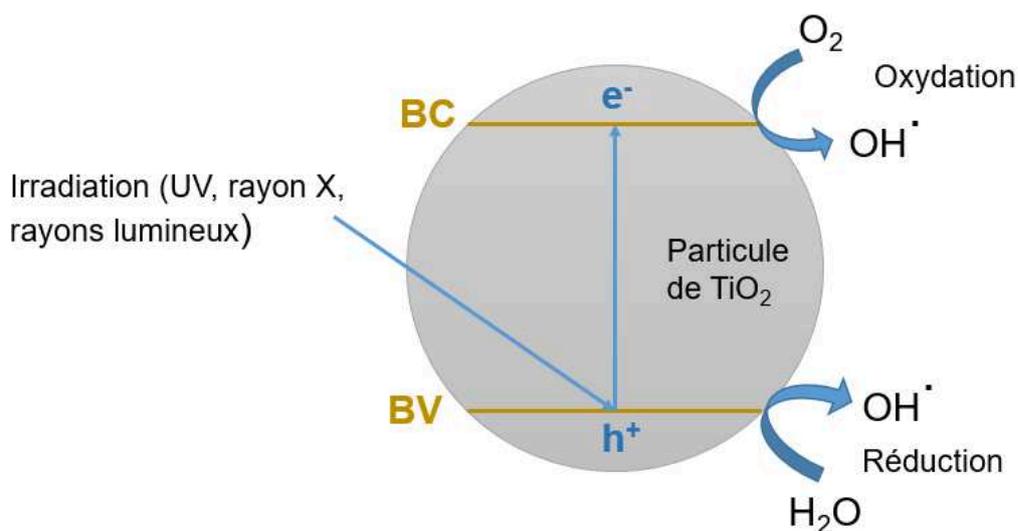


Figure 2 : Le TiO<sub>2</sub> est un semi-conducteur. Lorsque des particules de TiO<sub>2</sub> sont excitées par des rayons lumineux, des rayons X ou des UV, un photon peut être absorbé et entraîner le déplacement d'un électron (e<sup>-</sup>) de la bande de valence (BV) à la bande de conduction (BC) du matériau. Pour être absorbé, les photons doivent avoir une énergie supérieure à la différence entre la bande de conduction et la bande de valence des électrons (gap) du matériau. La paire électron-trou créée va permettre la formation de radicaux libres, soit par réduction (des molécules d'eau par exemple) ou par oxydation (des molécules de dioxygène (O<sub>2</sub>))(Chen and Mao, 2007; Gupta and Tripathi, 2011; Herrmann, 1999).

Sur la période allant de 1916, date de début de la production de TiO<sub>2</sub> par l'entreprise Norvégienne « Titan », jusqu'en 2011, la production annuelle de TiO<sub>2</sub> est estimée à 160 millions de tonnes, la Chine et les Etats-Unis étant les plus gros producteurs (Jovanović, 2015). En France, un rapport publié en juillet 2008 par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) fait état d'une production annuelle industrielle de 250 000 tonnes de TiO<sub>2</sub> sous forme micrométrique.

Le TiO<sub>2</sub> micrométrique « fin » est constitué de particules primaires dont le diamètre est compris entre 100 et 400 nm avec une surface spécifique de 5-15 m<sup>2</sup>/g. Sous cette forme, le TiO<sub>2</sub> est utilisé depuis les années 1920 pour ses propriétés blanchissantes et opacifiantes. Il représente 70 % de la production mondiale de pigments. Il est utilisé dans les peintures, les laques, les enduits, les colorants alimentaires, les enrobages de médicaments, les encres, le plastique (INRS, 2013; Shi *et al.*, 2013). L'activité photo-catalytique du TiO<sub>2</sub> est connue depuis les années 1930, d'autres activités importantes comme la photolyse de l'eau a été mis en

évidence en 1972 par Fujishima et Honda, ouvrant ainsi la voie à de nombreuses applications dans le domaine de l'énergie et l'environnement (Fujishima and Honda, 1972). A des fins non pigmentaires, le TiO<sub>2</sub> micrométrique est aussi utilisé comme composé électronique ou fibres synthétiques (INRS, 2013; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011).

## 2. Nanoparticules de TiO<sub>2</sub>

### 2.1 Définition des nanoparticules et nanomatériaux

Le préfixe « nano » provient du mot grec « nanos » qui signifie « nain/de très petite taille ». Dans le système international d'unités de mesure il divise par 1 milliard l'unité devant laquelle il est placé. Le nanomètre correspond à 10<sup>-9</sup> m et a pour symbole « n » (Buzea *et al.*, n.d.). Au même titre que les nanofils, nanotubes et nanofibres, les nanoparticules (NPs) de TiO<sub>2</sub> sont des nano-objets (figure 3). Ceux-ci appartiennent au « nano-monde » englobant les nanosciences et les nanotechnologies. Ces domaines, multi-pluridisciplinaires, font débat depuis leur essor dans les années 2000 (Pautrat, 2011).

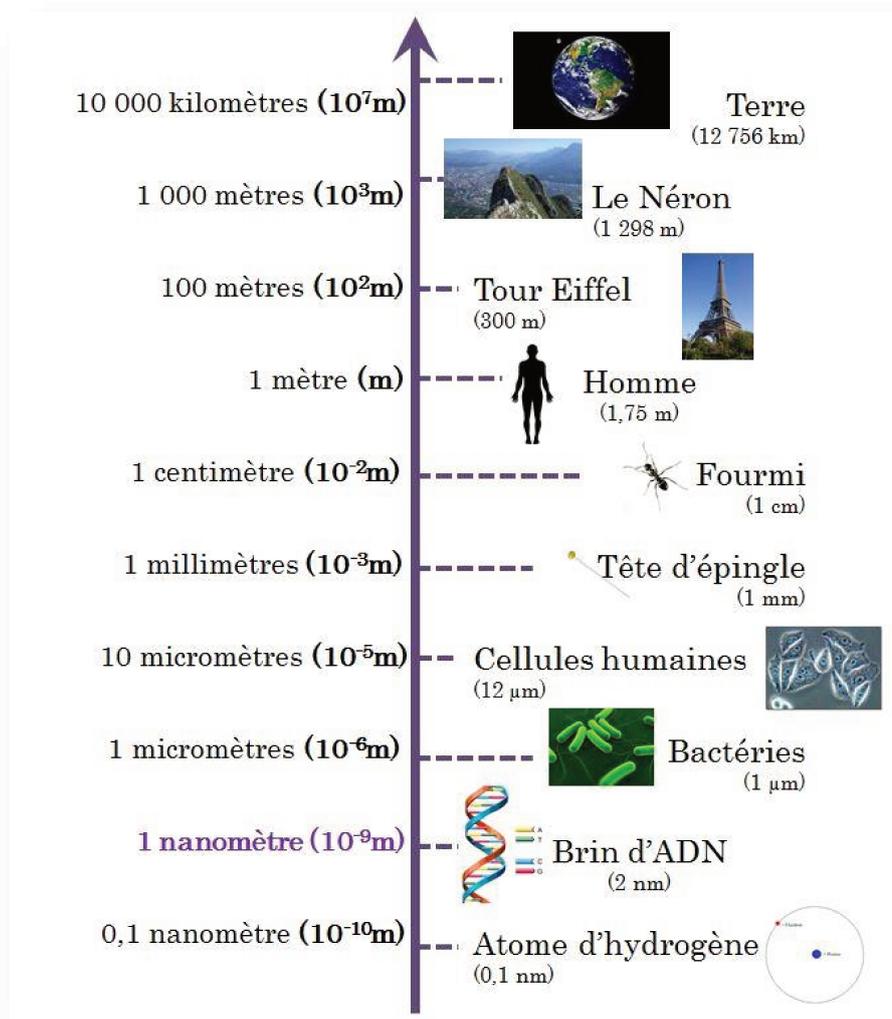


Figure 3 : Echelle de taille (en mètre) des nano-objets par rapport au monde qui nous entoure<sup>2</sup>.

Alors que de manière courante les nano-objets sont définis comme ayant au moins une de leurs trois dimensions inférieures à 100 nm, la recommandation de définition commune européenne publiée le 18 octobre 2011<sup>3</sup> définit un nanomatériau comme étant : « 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 ». Cette définition, très controversée est fondée sur une démarche

<sup>2</sup> Sources des images dans les annexes (consultées en juin 2016)

<sup>3</sup> Consultée sur [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-11-1202\\_fr.htm?locale=en](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_fr.htm?locale=en) (15/06/16)

prenant en compte les dimensions des particules constitutives des matériaux plutôt que des considérations de risque ou de danger. Elle a été établie après avis scientifiques du Comité scientifique des risques sanitaires émergents et nouveaux CSRSSEN/SCENIHR et du Centre commun de recherche (CCR) ainsi qu'après une consultation publique. Cette définition devait être révisée en 2015 pour les points portants à controverses (pourcentage de particules inférieures à 100 nm, information sur la distribution de taille) mais à l'heure actuelle, elle n'est toujours pas modifiée. En effet, pour certains, la définition de 100 nm est restrictive et n'est pas un bon indicateur pour les effets observés dans l'environnement (Bai *et al.*, 2014). Trois normes<sup>4</sup> aux thématiques différentes (Terminologie et nomenclature, Mesure et caractérisation, Santé, sécurité et environnement) sont aujourd'hui disponibles pour l'encadrement, l'utilisation et l'analyse de risques associées à l'utilisation et la fabrication des NPs. La définition française diffère légèrement car elle ne fixe pas de limitation de pourcentage de particules inférieures à 100 nm. Les nanomatériaux sont définis comme étant « fabriqués intentionnellement à l'échelle nanométrique, contenant des particules, non liées ou sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont une proportion minimale des particules, dans la distribution des tailles en nombre, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm »<sup>5</sup>. Cette proportion minimale est aujourd'hui fixée à 50 % mais celle de la définition permet une modification beaucoup plus facile de ce pourcentage, sans passer par une modification de la loi.

D'autre part, en 2009, la France fut la première à créer le registre R-Nano<sup>6</sup> afin de recenser toutes les substances à l'état nanoparticulaire importées, produites ou distribuées sur le territoire. Cette déclaration obligatoire a été institutionnalisée suite au Grenelle de l'environnement (loi grenelle 1 du 3/08/09) et est entrée en vigueur en 2013. Les données sont ensuite gérées par l'ANSES. Le bilan 2015 publié en février 2016 fait état de 416 000 tonnes de NPs déclarées en 2014.

---

<sup>4</sup>ISO/TR12885 :2008,ISOTS27687 :20087,ISO/TS80004-3 :2010

<sup>5</sup> Décret n° 2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire pris en application de l'article L. 523-4 du code de l'environnement sur <https://www.legifrance.gouv.fr>

<sup>6</sup> <https://www.r-nano.fr/>

## 2.2 Origines

On trouve des NPs naturellement dans l'environnement (volcan, feu de forêts, érosion, biomasse, etc.). Ces NPs représentent 90 % des NPs environnementales, les 10 % restant ayant une origine anthropique. Les NPs anthropiques sont produites par l'homme depuis des siècles (combustion du charbon et du bois, fumées d'échappements des voitures et des avions, industries chimique, etc.). En plus de ces NPs générées de manière « non intentionnelles », certaines sont produites délibérément pour être utilisées dans de nombreux domaines, notamment l'électronique, la construction, l'agro-alimentaire, la santé, la cosmétique, etc. (Buzea *et al.*, n.d.). La recherche autour des NPs est un domaine en pleine croissance car l'échelle nanométrique apporte aux particules de nouvelles propriétés et de nombreuses applications commerciales. Leur intérêt technologique et scientifique ne cesse d'accroître leur utilisation (Heiligtag and Niederberger, 2013).

Outre les procédés classiques d'extraction au chlore et au sulfate qui permettent d'obtenir du TiO<sub>2</sub> micrométrique « fin » mais aussi inévitablement une certaine proportion de particules « ultra fine », le TiO<sub>2</sub> nanométrique « ultra fin » peut aussi être directement obtenu par divers procédés (Chen and Mao, 2007). Les trois principaux sont :

- **un procédé chimique** par synthèse gel-sol en phase liquide (Reyes-Coronado *et al.*, 2008)
- **un procédé physique** par pyrolyse laser ou vaporisation ultrasonique d'un composé de TiO<sub>2</sub> (Kim *et al.*, 2016)
- **un procédé mécanique** par calcination de gel d'acide métatitanique puis broyage à haute énergie (Gesenhues, 2001).

Le choix du procédé de fabrication qui est utilisé dépend des propriétés physico-chimiques recherchées. A cela peut s'ajouter le traitement des NPs engendrant des modifications physiques et chimiques du cœur de la NP ou des propriétés de surfaces, par dopage, chimie click, etc. (Chen and Mao, 2007). Le rapport publié en juillet 2008 par l'ANSES fait état d'une production annuelle industrielle française de 10 000 tonnes de TiO<sub>2</sub> nanoparticulaire et impliquant 270 opérateurs (Gaffet, 2011).

Ces procédés de synthèse ont plusieurs désavantages. Ils nécessitent une consommation énergétique importante, utilisent des solvants dangereux et produisent des déchets toxiques. C'est pourquoi se développe la biosynthèse de NPs d'oxydes métalliques. Ainsi, récemment des chercheurs ont réussi à synthétiser des NPs de  $\text{TiO}_2$  grâce à des microorganismes, tels que des lactobacilles ou des levures, à partir de solutions de  $\text{TiO}(\text{OH})_2$ . Le recours à des plantes, des bactéries ou des levures pour la biosynthèse de NPs de  $\text{TiO}_2$  s'avère moins cher, plus facile et respectueux de l'environnement (Rajakumar *et al.*, 2012; Raliya *et al.*, 2015).

### 2.3 Applications, exposition et réglementation

Les propriétés particulières des NPs permettent d'envisager de nombreuses applications technologiques, scientifiques et industrielles (Stark *et al.*, 2015). Depuis les années 1990 le  $\text{TiO}_2$  est utilisé sous forme nanométrique pour ses propriétés d'absorption des rayons UV (figure 4). Le  $\text{TiO}_2$  micrométrique a aussi cette propriété, mais il est opaque alors que le  $\text{TiO}_2$  nanoparticulaire est transparent, et donc plus esthétique. Le  $\text{TiO}_2$  nanométrique, aussi dit « ultra fin » est composé principalement de particules primaires de taille inférieure à 100 nm dont le diamètre est compris entre 10 nm et 50 nm, avec une surface spécifique variant de 10 à 300  $\text{m}^2/\text{g}$  (INRS, 2013).

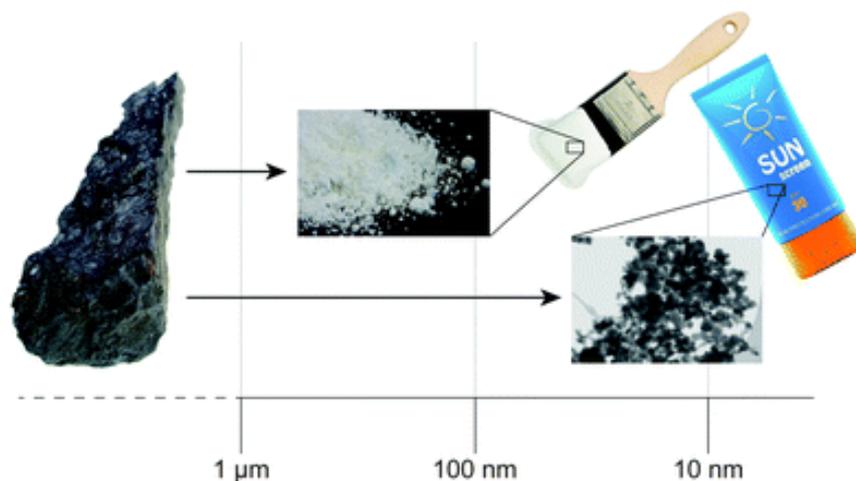


Figure 4 : Exemple d'applications pour le  $\text{TiO}_2$  nano et micrométrique. Le  $\text{TiO}_2$  obtenu à partir de l'ilménite par voie sèche ou humide et notamment utilisé sous forme micrométrique en tant que pigment blanc dans les peintures et sous forme nanométrique pour ses propriétés d'absorption des UV dans les crèmes solaires par exemple (Stark *et al.*, 2015).

De par leur stabilité, leurs propriétés anticorrosives et photo-catalytiques, les NPs de TiO<sub>2</sub> ont de nombreuses autres applications : revêtement hydrophile photo induits, et autonettoyants (immeubles, peinture, fenêtres...), semi-conducteurs, cellules solaires, traitements des déchets de l'eau (pesticides, aromatiques), photo-sensibilisateurs pour les thérapies, crèmes solaires, produits de beauté, etc., (Gupta and Tripathi, 2011; INRS, 2013; Shi *et al.*, 2013; Weir *et al.*, 2012).

### 3. Le TiO<sub>2</sub> dans l'alimentation

Les additifs alimentaires sont des substances intentionnellement ajoutées aux denrées alimentaires lors de leur fabrication, leur conservation ou leur packaging. 24 catégories (couleur, conservation, goût, texture, origine de fabrication...) permettent de les classer en fonction de leur fonction principale. Ils ont une définition et une réglementation complexe (Sanchez, 2015). Les colorants alimentaires sont une catégorie à part d'additifs alimentaires, ils ont de ce fait une réglementation spécifique mais de nombreuses similitudes existent comme par exemple l'interdiction complète des carcinogènes.

#### 3.1 Les nanomatériaux dans l'alimentation

L'utilisation de NPs dans le secteur de l'agroalimentaire est une technologie encore émergente mais depuis les années 2000, elle ne cesse de se développer. En 2006, le marché mondial des nanomatériaux dans l'alimentation était évalué à environ 410 millions de dollars par la société de conseil Cientifica avec une prévision de 5,8 milliards de dollars en 2012<sup>7</sup>. Ces nouvelles technologies utilisées dans l'agroalimentaire ont dérivé d'une utilisation dans les domaines pharmaceutiques et cosmétologiques. L'incorporation de NPs dans les produits alimentaires et les emballages leur apportent des propriétés attractives telles qu'une meilleure conservation, un meilleur aspect, etc. Des associations de consommateurs ont tenté de répertorier les entreprises agroalimentaires utilisant des NPs dans leurs procédés mais compte tenu de la législation actuelle et des sensibilités concernant la santé et l'environnement, les entreprises interrogées sont peu nombreuses à

---

<sup>7</sup>*Nanotechnologies in the food industry, Cientifica, 2006*

avoir répondu aux sollicitations<sup>8,9</sup>. L'utilisation des nanotechnologies et des NPs en particulier concerne principalement le domaine de l'emballage alimentaire. L'utilisation de NPs et de nano-composants intelligents sert à l'amélioration des propriétés de l'emballage (piégeur O<sub>2</sub>, antimicrobiens, enzymes), permet d'assurer la traçabilité et la fraîcheur des produits pendant le transport et le stockage, de détecter des bactéries ou des produits périmés et de renforcer l'emballage (nano feuille, cellulose). Pour ces NPs incorporés dans les emballages, il existe un risque qu'ils migrent et contaminent les aliments. De plus, en fin de vie de ces emballages, les NPs peuvent contaminer l'environnement (Chaudhry *et al.*, 2008).

Outre cette utilisation intentionnelle de NPs, les préparations alimentaires contiennent parfois des NPs qui ont été ajoutées non intentionnellement. C'est le cas par exemple de contamination via l'utilisation d'engrais et de pesticides qui seraient sous forme nanoparticulaire (Chaudhry *et al.*, 2008), c'est également le cas lorsque les additifs alimentaires microparticulaires, mais contenant une fraction nanoparticulaire, sont ajoutés pour l'amélioration du goût, de la couleur, de l'odeur, de la texture, l'augmentation de l'absorbance et de la biodisponibilité de nutriments et vitamines. Par exemple les additifs alimentaires E171 et E551, contiennent des NPs de TiO<sub>2</sub> et SiO<sub>2</sub> respectivement.

Dans les années 2000 le groupe américain Kraft foods a créé un consortium en collaboration avec des chercheurs et des étudiants pour documenter l'utilisation des nanomatériaux dans les procédés de fabrication de certains aliments (Suran, 2014). Trois catégories d'ingrédients pouvant contenir des NPs ont été identifiées :

- Les émulsions,
- Les dispersions,
- Les préparations de poudres hydrosolubles : à bases de lipides, de solides encapsulés, de particules métalliques et inorganiques.

L'incertitude qui demeure concerne les interactions potentielles entre ces ingrédients et la matrice alimentaire lors de la préparation, le stockage et la consommation des produits. Les caractéristiques physico-chimiques peuvent être

---

<sup>8</sup>*Sécurité alimentaire : mangeons-nous des nanoparticules alimentaires ?, 60 millions de consommateurs, n°500, janvier 2015*

<sup>9</sup><http://veillenanos.fr/wakka.php?wiki=EnjeuxAlimentation>

modifiées sans que l'on connaisse les conséquences sur la santé. Les trois principaux constituants de la matrice alimentaire, protéines, lipides et sucres sont digérés à l'échelle nanoparticulaire au sein de l'intestin. La question du devenir des NPs incorporés à cette matrice alimentaire se pose. Sont-elles recouvertes de molécules puis digérés ? Sont-elles dégradées ? Les NPs peuvent-elles se retrouver sous forme libre dans le tractus gastro-intestinal ? (Yada *et al.*, 2014). Pour les NPs minérales incorporées dans les aliments, il y a un risque potentiel associé à l'ingestion de ces aliments (Chaudhry *et al.*, 2008).

Se pose alors la question de l'impact de ces NPs sur la santé humaine et sur l'environnement. Les chercheurs cherchent à apporter des éléments de réponse concernant l'ingestion des NPs, de façon tout à fait objective, pour permettre aux institutions nationales, européennes et structures législatives de réglementer l'utilisation de ces nouveaux outils/produits (Chaudhry and Castle, 2011). La mauvaise interprétation de ces résultats scientifiques peut toutefois alarmer les consommateurs, sans que ce soit initialement l'objectif.

### 3.2 L'additif alimentaire blanc E171

Aux Etats-Unis, le TiO<sub>2</sub> est autorisé comme additif alimentaire depuis 1966. Il ne doit pas excéder 1 % de la masse totale du produit (tableau 1).

Section CFR 21		EEC#	Année approbation	Utilisation et restriction
§ 73.575	TiO <sub>2</sub>	E171	1966	Aliments (1 % du poids max)
§ 73.1575	TiO <sub>2</sub>		1966	Médicaments
§ 73.2575	TiO <sub>2</sub>		1973	Cosmétiques
§ 73.3126	TiO <sub>2</sub>		1986	Dispositifs médicaux

Tableau 1 : Années d'approbations du TiO<sub>2</sub> comme additif alimentaire dans diverses catégories de produits. Données tirées de la section 21-73 du code fédéral 10 des réglementations de la Food and Drug Administration (FDA).

Le colorant alimentaire E171 est une poudre de particules de TiO<sub>2</sub> utilisée pour ses propriétés opacifiantes et sa couleur blanche. Les particules sont majoritairement micrométriques mais plusieurs études ont montré qu'une part

<sup>10</sup> <http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm115641.htm>

non négligeable des particules sont nanométriques (<100 nm). Parmi 5 échantillons de E171 commercial, Yang *et al.*, (2014) ont montré que ceux-ci étaient principalement de phase cristalline anatase (99 %) et contenaient entre 17 et 35 % (en nombre) de particules nanométriques (Yang *et al.*, 2014). D'autres études ont montré que des particules dites « fines » pouvaient en réalité contenir 10-15 % (Peters *et al.*, 2014) et jusqu'à 36 % (Weir *et al.*, 2012) de NPs de TiO<sub>2</sub>. La distribution de taille des particules est très large, c'est à dire que la poudre est dite polydispersée. Les particules ont un diamètre moyen de 110 nm avec des diamètres de particules allant de 30 à 400 nm (Yang *et al.*, 2014).

En mars 2015, 109 produits contenant du E171 et vendus en France étaient répertoriés par la base de données Open Food Facts<sup>11</sup>: M&M's, Mentos, chewing-gums Hollywood, Freedent, Malabar, gâteaux LU, raviolis Panzani, hachis Parmentier William Saurin, gâteaux apéritifs Belin, blanquettes de veau Leader Price et William Saurin, etc. Le TiO<sub>2</sub> est également utilisé comme additif dans le dentifrice et dans les médicaments (comprimés pelliculés), il est alors signalé sous la mention CI77891. En 2015, l'ONG Center for food safety a, quant à elle, réalisé un inventaire de 300 produits contenant des NPs. Parmi l'ensemble des produits recensés, 26 % contiennent des NPs de TiO<sub>2</sub><sup>12</sup>.

Une étude américaine a déduit de ces valeurs une estimation de l'exposition à 1-2 mg de TiO<sub>2</sub> par kg de poids corporel par jour pour les enfants de moins de 10 ans et à 0,2-0,7 mg pour les adultes (Chen *et al.*, 2013; Weir *et al.*, 2012). En Grande-Bretagne, cette exposition a été évaluée à 5 mg/jour/personne (Powell *et al.*, 2010). La fin de vie des emballages contenant des NPs de TiO<sub>2</sub> et le devenir dans l'environnement des NPs de TiO<sub>2</sub> après leur ingestion doivent également être pris en compte. En effet, après leur administration *per os* chez des animaux, la majorité des NPs ne sont pas absorbées au niveau de la paroi intestinale et sont éliminées dans les fèces (MacNicoll, 2015; Warheit *et al.*, 2015). Les stations d'épuration permettent d'éliminer une certaine proportion de ces particules mais pas les plus petites qui se retrouvent en bout de chaîne (Weir *et al.*, 2012). Les particules

---

<sup>11</sup> *Open food facts*: <http://fr.openfoodfacts.org/additif/e171-oxyde-de-titane>

<sup>12</sup> <http://www.centerforfoodsafety.org/> inventaire d'environ 300 produits alimentaires contenant des nanomatériaux

peuvent potentiellement interagir avec des bactéries ou des organismes et se retrouver dans les boues d'épandage puis contaminer les plantes (Weir *et al.*, 2012). Les données concernant l'exposition environnementale à ces NPs de TiO<sub>2</sub> sont encore parcellaires.

### 3.3 La réglementation sur les nanoparticules dans l'alimentation et controverses

Les additifs alimentaires actuellement utilisés ont reçu une autorisation. Dans la législation européenne l'utilisation des colorants dans les denrées alimentaires est établie par la directive 94/36/CE du parlement européen et du conseil du 30 juin 1994<sup>13</sup>. Plusieurs points encadrent l'utilisation des additifs alimentaires : l'étiquetage, la dose journalière admissible après étude sur animaux, les études toxicologiques, les réglementations, la législation (Sanchez, 2015).

En 2008, un règlement a été publié mentionnant le fait que les additifs déjà autorisés mais ayant subi des modifications, de la taille des particules notamment, doivent être soumis à une nouvelle évaluation par l'agence européenne de sécurité des aliments (EFSA).

En 2011, le règlement européen concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires (INCO) prévoyait l'étiquetage des nanomatériaux [nano] obligatoire sur les produits alimentaires en Europe pour décembre 2014. En 2013, cette réglementation a été remise en cause par la commission européenne. Depuis octobre 2015 et la mise en place du règlement « nouveaux aliments »<sup>14</sup>, les aliments contenant des nanomatériaux manufacturés sont en partie couverts. Cependant ce nouveau règlement ne concerne pas les additifs alimentaires qui seront réévalués selon le règlement de 2008<sup>15</sup>. C'est le cas du E171 dont la réévaluation est prévue pour 2016<sup>16</sup>.

L'obligation d'étiquetage n'est donc pas encore mise en œuvre, d'autant plus que d'après la proposition de définition européenne, il faut qu'au moins 50 % des

---

<sup>13</sup> [http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit\\_flavor/flav08\\_fr.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav08_fr.pdf)

<sup>14</sup> <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32015R2283>

<sup>15</sup> Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires

<sup>16</sup> <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/foodaddtentativewp16.pdf>

particules, en nombre, soit sous forme nanoparticulaire pour que le produit soit considéré comme un nanomatériau. Cette définition va à l'encontre de l'avis de l'EFSA qui plaide en faveur d'un seuil de 10 % en raison de l'incertitude actuelle sur les risques sanitaires des nanotechnologies<sup>17</sup>.

En 2016, l'ONG « agir pour l'environnement » a publié une enquête mettant en évidence la présence de NPs de TiO<sub>2</sub> et SiO<sub>2</sub> dans des produits alimentaires industriels d'après des mesures menées par l'agence nationale de métrologie et d'essais (LNE). Cette enquête a ensuite été reprise par les médias entraînant un questionnement du public quant aux risques liés aux NPs dans l'alimentation<sup>18</sup>.



Figure 5 : Nanoparticules de TiO<sub>2</sub> présentes dans l'alimentation et médias.

D'après le rapport de la LNE, dans les trois produits testés, entre 2,5 à 16 % des particules de TiO<sub>2</sub> (en nombre) sont sous forme nanométrique (tableau 2). Dans ces aliments, le colorant E171 n'est donc pas considéré comme un nanomatériau. Par contre pour le mélange d'épices qui a été testé, 100 % des particules de SiO<sub>2</sub> sont sous forme nanométrique. C'est pourquoi, la réglementation concernant l'étiquetage de la mention [nano] devrait être éclaircie et une plus grande fermeté dans l'encadrement des NPs est demandée. Notons toutefois que les informations

<sup>17</sup> <http://www.60millions-mag.com/2015/03/19/nanoparticules-dans-les-aliments-la-loi-du-silence-7988>

<sup>18</sup> <http://veillenanos.fr/wakka.php?wiki=2016JuinEnqueteApeNanoAlimentation>

aujourd'hui portées à la connaissance du grand public ne diffèrent pas significativement de celles publiées dans la littérature scientifique depuis plusieurs années.

Pour les produits cosmétiques l'obligation d'étiquetage est en place depuis 2013<sup>19</sup> mais là encore, de nombreux produits sont exempts de la mention [nano] du fait de la définition des nanomatériaux, de leur forme agglomérée ou pas, etc.

		% NPs de TiO <sub>2</sub> (en nombre)	% particules total
<b>E171</b> (TiO <sub>2</sub> )	Napolitain LU	<b>12 %</b>	0,0076 %
	Chewing-gum MALABAR	<b>2,5 %</b>	0,0031 %
	Blanquette de veau WILLIAM SAURIN	<b>16 %</b>	0,18 %
<b>E551</b> (SiO <sub>2</sub> )	Mélange d'épices CARREFOUR	<b>100 %</b>	0.337 %

Tableau 2 : Pourcentages de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> présentes dans des produits alimentaires. Ces données sont tirées du rapport du LNE intitulé : « Extraction de nanoparticules de produits alimentaires et mesures de leurs propriétés dimensionnelles pour l'ONG » du 9 juin 2016 réalisé pour l'ONG « agir pour l'environnement ».

#### 4. Voies d'exposition aux particules et nanoparticules, valeurs limites d'exposition

L'inhalation, la voie cutanée et l'ingestion sont les trois principales voies d'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub> (figure 6) (Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). En effet, l'exposition humaine à lieu pendant la fabrication et la manipulation des NPs, lors de l'utilisation des produits les contenant et en fin de vie de ces produits. Les principales voies d'exposition pour lesquelles il existe des données toxicologiques sont l'inhalation et l'exposition cutanée. Ces données ont été obtenues dans le cadre de l'étude de l'exposition des travailleurs (Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). La population quant à elle est principalement exposée aux NPs de TiO<sub>2</sub> lors de la consommation de produits en contenant. La voie cutanée et la voie intestinale sont alors les plus pertinentes. L'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub> par

<sup>19</sup> <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:fr:PDF>

ingestion est moins documentée que l'exposition par inhalation et l'exposition au colorant E171 l'est encore moins (McCracken *et al.*, 2016).

Le risque d'exposition par inhalation concerne principalement les travailleurs manipulant les poudres de TiO<sub>2</sub>. Les NPs, de par leur petite taille, se déposent en profondeur dans le tractus respiratoire et notamment au niveau des alvéoles pulmonaires. Elles sont alors susceptibles de franchir l'épithélium et de se retrouver dans l'interstitium pulmonaire. Elles peuvent alors engendrer une inflammation, un stress oxydant et rejoindre le système sanguin ou lymphatique (Shi *et al.*, 2013). Le risque d'exposition par voie cutanée résulte principalement de l'application de cosmétiques et de crèmes solaires. La peau est une barrière efficace recouverte d'une couche superficielle (10 µm) de cellules mortes. La principale question qui se pose est celle du franchissement de cette barrière par les NPs après des expositions répétées à de la crème solaire par exemple, lorsque la peau est saine et lorsqu'elle est lésée, ainsi que les effets de ces NPs sur les couches profondes de la peau. L'exposition par ingestion résulte de la consommation de produits alimentaires contenant l'additif E171 ou des médicaments contenant le TiO<sub>2</sub> comme excipient (Weir *et al.*, 2012). Là encore, le franchissement de la barrière intestinale et les effets toxiques ou pro-inflammatoires des NPs sur les cellules intestinales sont les deux problématiques principales.

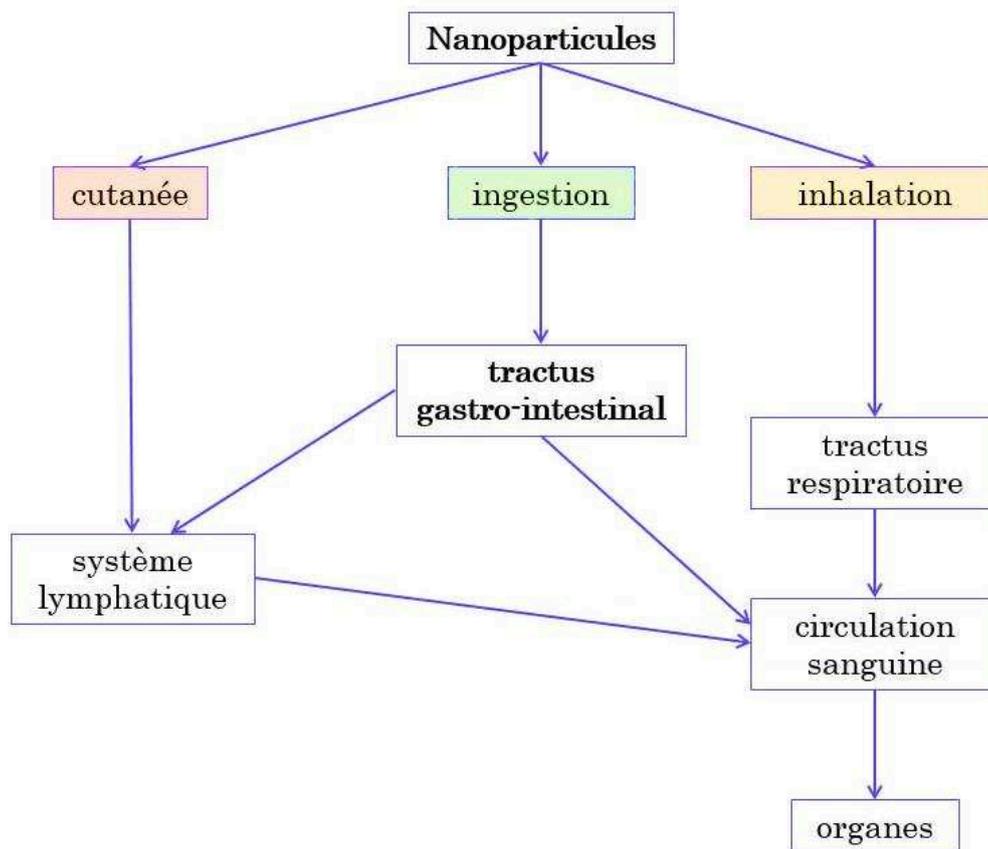


Figure 6 : Principales voies d'expositions aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et leur devenir dans l'organisme. Les trois principales voies d'expositions sont la voie cutanée (orange), l'ingestion (vert), et l'inhalation (orange) (Shi *et al.*, 2013).

Les études ADME (adsorption, distribution, métabolisation, élimination) permettent de déterminer le devenir des NPs de TiO<sub>2</sub> dans l'organisme à partir du site d'exposition (peau, paroi intestinale ou pulmonaire) jusqu'aux organes cibles secondaires. Elles permettent d'identifier les organes cibles sur lesquels la toxicité des NPs devra ensuite être étudiée, *in vivo* et *in vitro*. Elles renseignent sur la capacité des NPs à franchir les barrières naturelles du corps i.e., la peau, la paroi intestinale, la paroi pulmonaire, la barrière hémato-encéphalique, et être transférées vers le système sanguin et/ou du système lymphatique (on parle de translocation) pour être distribuées aux organes cibles (Skocaj *et al.*, 2011).

Concernant les seuils de recommandations relatifs à la fabrication, la manipulation et la consommation du TiO<sub>2</sub>, ils découlent généralement d'études épidémiologiques et d'études sur l'animal. Or à l'heure actuelle, le nombre d'études épidémiologiques sur l'homme après exposition aux micro et nanoparticules de TiO<sub>2</sub> est faible et l'absence de protocoles standardisés limite leurs interprétations.

Traditionnellement, le TiO<sub>2</sub> micrométrique est considéré comme inerte et très peu soluble (Jovanović, 2015). Cependant il a été classé dans la catégorie 2B, cancérigène possible pour l'homme, par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) en 2006 à cause des effets toxiques observés chez l'animal après inhalation<sup>20</sup>.

Concernant l'ingestion, le « Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) » a conclu en 1969, d'après les différentes études chez l'homme et l'animal, que le TiO<sub>2</sub> est un composé très insoluble et qu'il n'y a pas d'adsorption et d'accumulation des particules. Les nouvelles données rapportant les effets toxiques et la translocation des particules et des NPs de TiO<sub>2</sub> encouragent à réévaluer ces décisions. En 2010, cette question a été débattue par le CIRC mais le manque de procédures standardisées pour l'évaluation des risques du TiO<sub>2</sub> n'a pas permis d'aboutir à une prise de décision (Jovanović, 2015; Shi *et al.*, 2013).

En France, une circulaire datant de 1987 recommande une valeur limite indicative de moyenne d'exposition (VME) de 10 mg/m<sup>3</sup> pour les poussières de TiO<sub>2</sub> inhalable dans l'air des locaux de travail (INRS, 2013). Depuis 2005, l'institut national américain pour la sécurité et la santé au travail (NIOSH) recommande des valeurs limites d'exposition professionnelle de 2,4 mg/m<sup>3</sup> pour le TiO<sub>2</sub> micrométrique et 0,3 mg/m<sup>3</sup> pour le TiO<sub>2</sub> nanométrique (Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). Cette valeur est applicable aux particules agglomérées/agrégées et même si les agglomérats ou agrégats ont un diamètre > 100 nm. L'institut japonais de développement des nouvelles énergies et technologies industrielles (NEDO), recommande quant à lui un niveau d'exposition acceptable de 1,2 g/m<sup>3</sup> pour les NPs de TiO<sub>2</sub>. Par exemple, la dose sans effet toxique observable (dose maximale sans effets, ou NOAEL) pour les NPs de TiO<sub>2</sub> P25 est de 1,2 mg/m<sup>3</sup> (Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). A noter également que les différentes formes cristallines du TiO<sub>2</sub> sont susceptibles d'interagir différemment avec leur environnement. Des études ont montré une différence de toxicité entre les NPs de forme cristalline anatase et rutile, avec parfois des structures mixtes anatase/rutile plus toxiques que les formes pures (Gerloff *et al.*, 2012; Sayes *et al.*, 2006). Cet aspect n'est actuellement pas pris en compte dans les tentatives de réglementation.

---

<sup>20</sup> <https://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-4.pdf>

## *Partie II : Barrière intestinale humaine*

Cette deuxième partie présente les éléments qui composent la barrière intestinale c'est-à-dire le microbiote, la couche de mucus, les cellules de l'épithélium intestinal ainsi que les jonctions cellulaires et les transporteurs membranaires, puis les tissus lymphoïdes sous-jacents. Les différents modèles cellulaires *in vitro* d'épithélia intestinaux sont également présentés.

### 1. Les éléments de la barrière intestinale

Le tractus gastro-intestinal s'étend de la bouche à l'anus et mesure entre 5 et 7 m en moyenne chez l'homme. En plus des fonctions primordiales de digestion, d'absorption de macro et micro nutriments et d'homéostasie de l'eau, l'intestin représente une barrière protectrice entre le milieu intérieur (l'organisme) et le milieu extérieur c'est à dire la lumière du tube intestinal. L'intestin comprend le duodénum, le jéjunum et l'iléon, qui composent l'intestin grêle, et enfin le colon également appelé le gros intestin. L'organisation des cellules de l'épithélium intestinal, la couche de mucus, les mécanismes de protection des cellules, la présence de tissus lymphoïdes sous-jacents et la présence du microbiote intestinal lui permettent d'assurer cette fonction de barrière protectrice (CDU-HGE, 2014).

#### 1.1 Le microbiote

Dans le ventre de sa mère le fœtus se trouve dans des conditions stériles, protégé par la poche des eaux. Lors de l'accouchement le nourrisson est colonisé par les premiers micro-organismes provenant du vagin maternel, de sa peau, de l'environnement de la pièce puis du lait maternel lors de l'allaitement. Il faudra attendre entre 2 et 4 ans pour la mise en place d'un microbiote mature et stable fonctionnellement (Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Sommer and Bäckhed, 2013).

Le microbiote est un organe à part entière, pourtant resté longtemps méconnu car 70 % des bactéries qui le composent ne sont pas cultivables du fait de leurs besoins spéciaux en nutriments et du fait qu'elles ne se cultivent qu'en anaérobie. Elles sont aussi difficilement cultivables de façon isolée. Depuis les années 1970-1980,

l'avènement de la métagénomique, permettant de caractériser l'ensemble des génomes des micro-organismes qui peuplent notre flore intestinale, a permis d'accroître la connaissance des diverses bactéries du microbiote, en particulier leur identification (Dave *et al.*, 2012; Sekirov *et al.*, 2010).

Cette révolution a été permise grâce au développement des techniques de séquençage. Pour l'analyse de la phylogénétique des bactéries du microbiote intestinal, le séquençage de l'ARN de la petite sous-unité du ribosome ARNr 16S est la technique aujourd'hui la plus utilisée. L'ADN bactérien peut aussi être directement analysé après amplification par PCR à partir d'un échantillon contenant les bactéries (Peterson *et al.*, 2008).

Les chiffres ont été revu à la baisse mais on estime que les bactéries du microbiote intestinal sont 2 à 10 fois plus nombreuses que les cellules d'un individu (Sender *et al.*, 2016; Sommer and Bäckhed, 2013). Elles sont aussi 10 fois plus petites en moyenne (1  $\mu\text{m}$  de diamètre contre 10  $\mu\text{m}$  pour les cellules). Les communautés bactériennes anaérobies sont dominantes et on dénombre chez les individus entre 500 et 1000 espèces différentes suivant les études (Sekirov *et al.*, 2010). Le microbiote intestinal diffère quantitativement et qualitativement le long du tractus gastro intestinal, la majorité de ces bactéries étant localisées dans le colon (McCracken and Lorenz, 2001). Les espèces bactériennes diffèrent aussi selon si elles se trouvent au sein de la lumière intestinale, dans la couche de mucus ou au plus proche de l'épithélium intestinal (Peterson *et al.*, 2008). Cependant, chez l'homme, trois phyla bactériens sont dominants : les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Actinobacteria (figure 7). Alors que les phyla Firmicutes et Bacteroidetes sont fortement représentés, le phylum Actinobacteria dans lequel on retrouve les bifidobactéries est lui moins représenté au sein du microbiote (Sekirov *et al.*, 2010). Lors d'un changement d'habitude alimentaire ou lors de la prise d'antibiotiques le microbiote est modifié, cependant les phyla dominants restent les mêmes. Au sein de ces phyla, une grande diversité existe en terme d'espèces de bactéries et de nombreuses études s'accordent pour souligner l'importante variabilité interindividuelle du microbiote humain (Eckburg *et al.*, 2005).

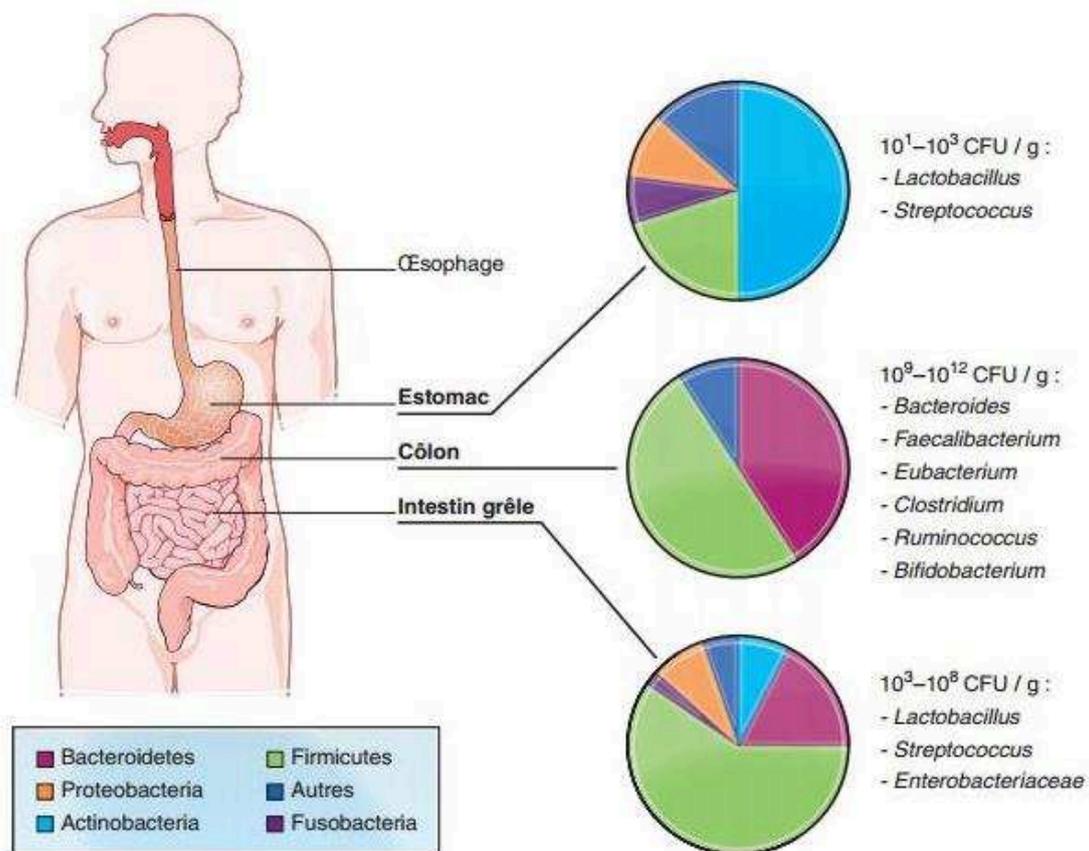


Figure 7 : Proportions des différents phyla bactériens et des principales espèces bactériennes dans l'estomac, l'intestin grêle et le colon de l'homme. Le plus grand nombre de bactéries se trouve dans le colon, ( $10^9-10^{12}$  CFU/g, Colony forming Unit/g), suivi de l'intestin grêle ( $10^3-10^8$  CFU/g) puis l'estomac ( $10^1-10^3$  CFU/g) (CDU-HGE, 2014; Dave *et al.*, 2012).

Le projet « Human Microbiome Project » (HMP) initié par l'institut national de santé américain NIH (National Institute of Health) en 2008 a pour but d'améliorer la compréhension et la caractérisation du microbiote humain ainsi que d'analyser son influence sur la santé, et son évolution au cours de la vie<sup>21</sup> (Gill *et al.*, 2006). Le microbiote a une fonction de protection vis-à-vis de l'épithélium intestinal. Il stimule le système immunitaire et sécrète des substances antibactériennes qui éliminent les bactéries pathogènes. Il possède également de nombreuses fonctions métaboliques car les bactéries métabolisent certains gaz, sucres, protéines ainsi que de nombreux éléments qui ne sont pas assimilés lors de la digestion. Il participe ainsi à la régulation du transit intestinal. Un déséquilibre de ces

<sup>21</sup> <http://hmpdacc.org/>.

populations bactériennes peut entraîner une inflammation chronique et un état pathologique de l'individu (Round and Mazmanian, 2009).

Le microbiote est nécessaire à la mise en place du système immunitaire systémique et inné (Sommer and Bäckhed, 2013). Par exemple, il régule la sécrétion de peptides antimicrobiens, comme les défensines, par l'intermédiaire des récepteurs Toll-Like (TLR) à la surface des cellules intestinales i.e. cellules de Paneth (Kaser *et al.*, 2010). La dysbiose, l'altération qualitative et fonctionnelle du microbiote, est une piste pour comprendre certaines pathologies et certains désordres métaboliques comme l'obésité ou le diabète. En effet, elle est susceptible d'induire une inflammation chronique et un dysfonctionnement métabolique chez l'homme (Sommer and Bäckhed, 2013), même s'il est encore difficile de relier l'étiologie de ces maladies avec la véritable influence du microbiote (Ottman *et al.*, 2012). Enfin, le microbiote pourrait être un marqueur de diagnostic ou de pronostic de ces pathologies ainsi que des cancers colorectaux ou encore des pathologies cardiaques (Arumugam *et al.*, 2011). Dans le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), c'est également une cible thérapeutique potentielle (Kaser *et al.*, 2010). A la question de l'identification des souches peuplant le microbiote s'ajoute désormais celle de leur fonction et des mécanismes par lesquels elles peuvent influencer l'équilibre intestinal.

## 1.2 L'épithélium intestinal

La couche de cellules qui compose l'épithélium intestinal représente une surface d'absorption d'environ de 30-300 m<sup>2</sup>, suivant les études, grâce à son organisation en repliements successifs, les villosités intestinales, et aux microvillosités sur la membrane apicale des entérocytes (figure 8 et 9). Ces villosités sont uniquement présentes dans l'intestin grêle (Bellmann *et al.*, 2015; Helander and Fändriks, 2014; Peterson and Artis, 2014). Chez les individus sains, l'organisation de l'intestin grêle permet l'absorption des nutriments et l'exclusion des antigènes et bactéries pathogènes.

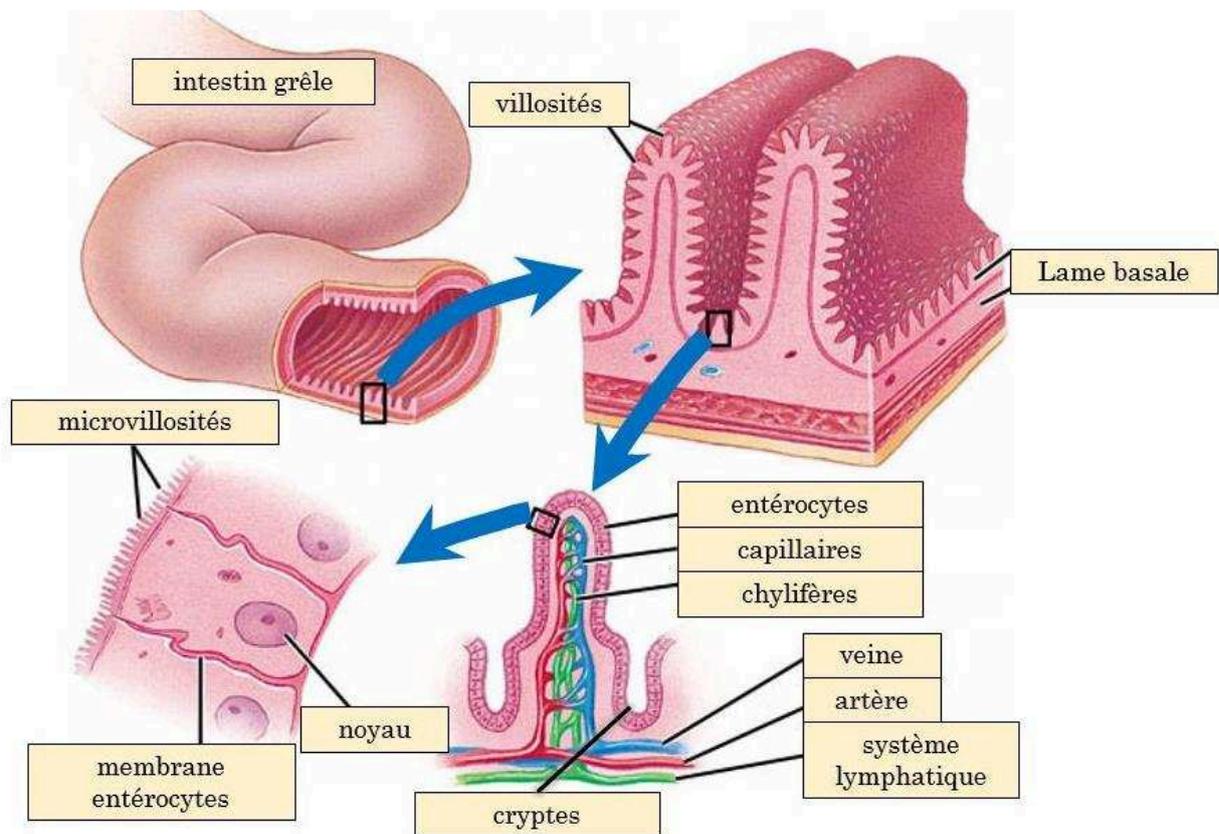


Figure 8 : Structure et morphologie de l'intestin grêle. L'épithélium intestinal repose sur la lame basale et forme des villosités lui permettant d'augmenter sa surface d'échange avec la lumière intestinale. Les cryptes de Lieberkühn, alternent avec les villosités, elles sont le lieu de la prolifération cellulaire. De nombreux vaisseaux sanguins attestent d'une grande vascularisation des villosités. On y trouve aussi des chylifères du système lymphatique. L'épithélium est composé d'une monocouche cellulaire, principalement des entérocytes, cellules absorbantes qui possèdent à leur surface des microvillosités<sup>22</sup>.

<sup>22</sup> [https://online.science.psu.edu/biol011\\_sandbox\\_7239/node/7429](https://online.science.psu.edu/biol011_sandbox_7239/node/7429) (août 2016)

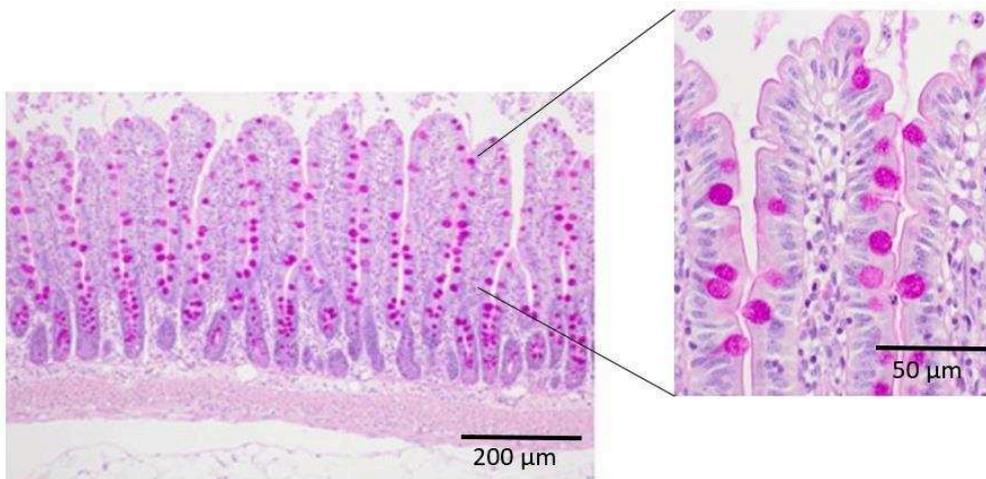


Figure 9 : Villosités intestinales. Coupe histologique de l'épithélium intestinal du rat présentant les villosités intestinales. Dans cet exemple, les cellules sont colorées à l'acide périodique de Schiff (Lautenschläger *et al.*, 2014).

### 1.2.1 Les différents types cellulaires composant l'épithélium

L'épithélium intestinal est composé de quatre types cellulaires principaux : les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines (figure 10, 11). Les entérocytes sont les plus abondantes, ce sont des cellules absorbatives qui ont pour rôle principal l'absorption des nutriments. Ils possèdent des microvillosités au niveau de leur membrane apicale qui augmentent la surface d'échange avec la lumière de l'intestin. Ces microvillosités sont recouvertes de glycocalyx, la première couche de mucus qui adhère à l'épithélium. Les cellules caliciformes sont des cellules sécrétrices de mucus. Elles sécrètent également les tréfoil facteurs, des protéines impliquées dans la sécrétion et la consistance du mucus (Aamann *et al.*, 2014). Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens, des défensines, des enzymes digestives et des facteurs de croissance. Enfin, les cellules entéroendocrines sécrètent des peptides hormonaux et sont impliquées dans plusieurs fonctions dont l'angiogenèse, la différenciation des cellules souches et la réparation des tissus. Elles sécrètent aussi des peptides antimicrobiens, les  $\alpha$ -défensines et  $\beta$ -défensines afin de protéger le microbiote des pathogènes (Antoni *et al.*, 2014; Peterson and Artis, 2014).

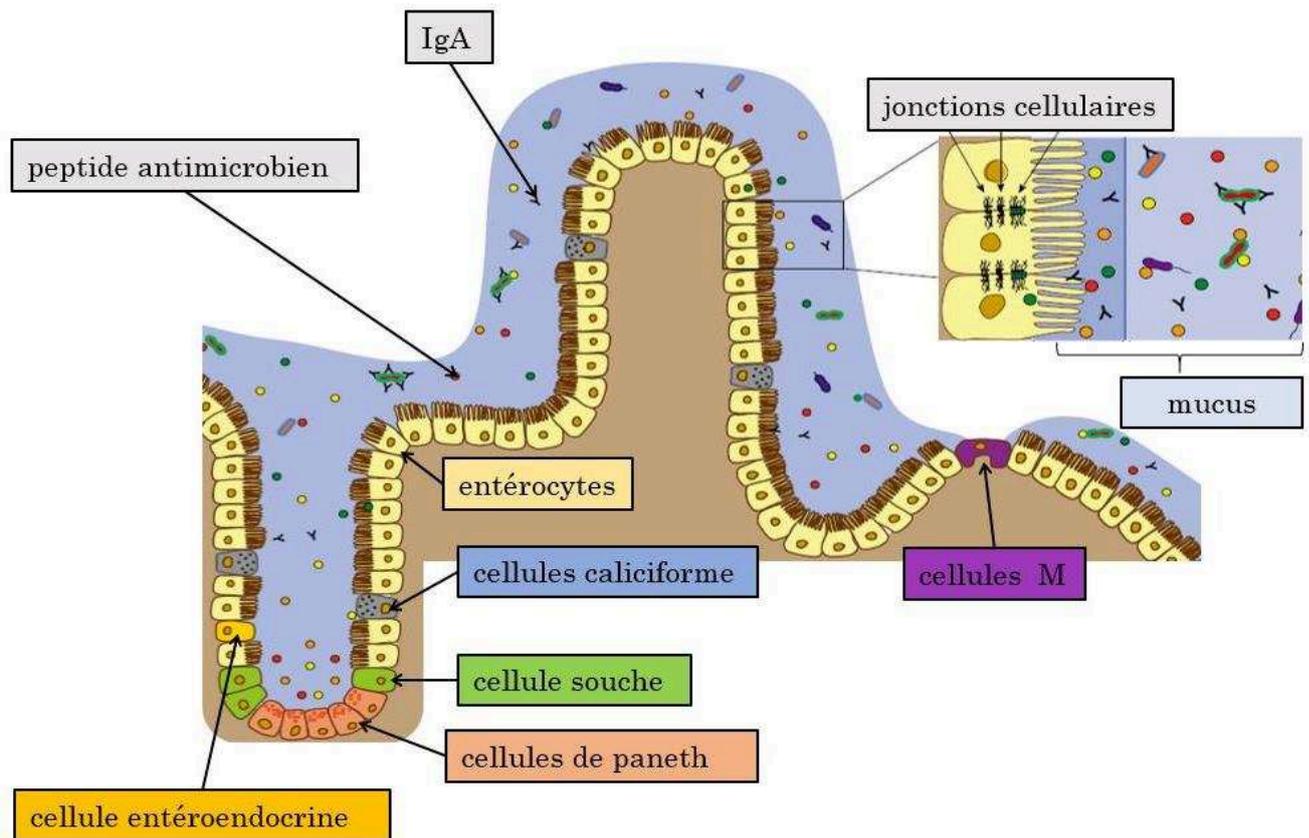


Figure 10 : Représentation schématique de l'épithélium intestinal. L'épithélium intestinal est composé majoritairement d'entérocytes, les cellules absorbatives, mais également de cellules caliciformes qui sécrètent le mucus, de cellules de Paneth, qui sécrètent des peptides antimicrobiens, et de cellules entéroendocrines qui sécrètent des peptides hormonaux. De plus, des anticorps (IgA) sécrétés par les lymphocytes B sous-jacents sont présents dans la couche de mucus. Au sein de l'épithélium se trouvent aussi des cellules M qui participent à l'immunité intestinale. Enfin, l'épithélium est jointif grâce aux jonctions cellulaires qui unissent les cellules (Antoni *et al.*, 2014).

Ces quatre types cellulaires se retrouvent aussi bien au niveau de l'intestin grêle qu'au niveau du colon et dérivent toutes de cellules souches, reconnaissables car elles expriment le marqueur *Lgr5* (Kim and Ho, 2010; Flier and Clevers, 2009) se trouvant dans les cryptes de Lieberkühn (figure 9). Les cellules souches sont en perpétuelle prolifération pour assurer le remplacement des cellules de l'épithélium intestinal qui se renouvellent tous les 3-5 jours (Goodell *et al.*, 2015).

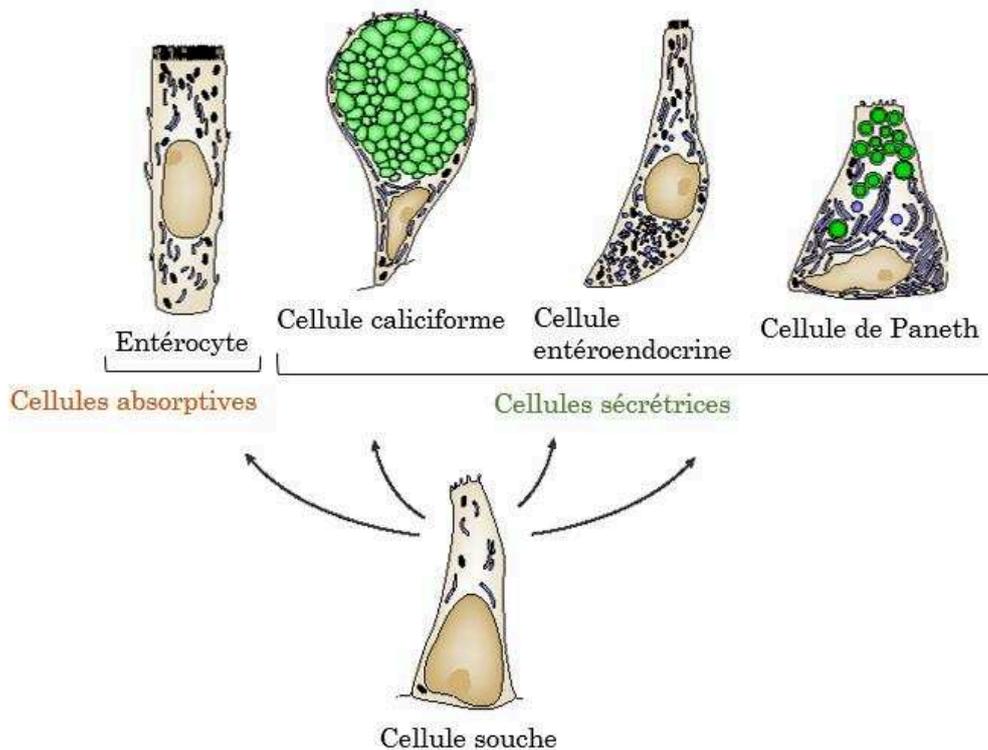


Figure 11 : Différenciation terminale des cellules de l'intestin. (Crosnier *et al.*, 2006).

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans le mécanisme de prolifération et différenciation des cellules de l'épithélium intestinal i.e. Ngn-3, Math-1, HES-1 dont KLF4 et ELF-3 (figure 12). KLF4 est un facteur de transcription régulant la prolifération et la différenciation des cellules intestinales et notamment des cellules caliciformes (Katz *et al.*, 2002). Au niveau des cryptes, l'expression de gènes cibles c-Myc et EphB2 suggère que la voie de signalisation des protéines Wnt via la protéine  $\beta$ -caténine est présente. Elle joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre entre cellules en prolifération et cellules en différenciation (Pinto and Clevers, 2005). D'autres voies de signalisation dont Notch et Hedgehog sont aussi impliquées dans le développement de l'épithélium intestinal (Bjerknes and Cheng, 2005). La voie Notch est impliquée dans la différenciation des cellules qui deviendront des cellules sécrétrices (activation de Notch) ou absorbatives (Goodell *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2015). Les protéines de la voie Wnt sont absentes des cellules différenciées, qui sont quiescentes, sauf dans les cellules de Paneth (Roda *et al.*, 2010).

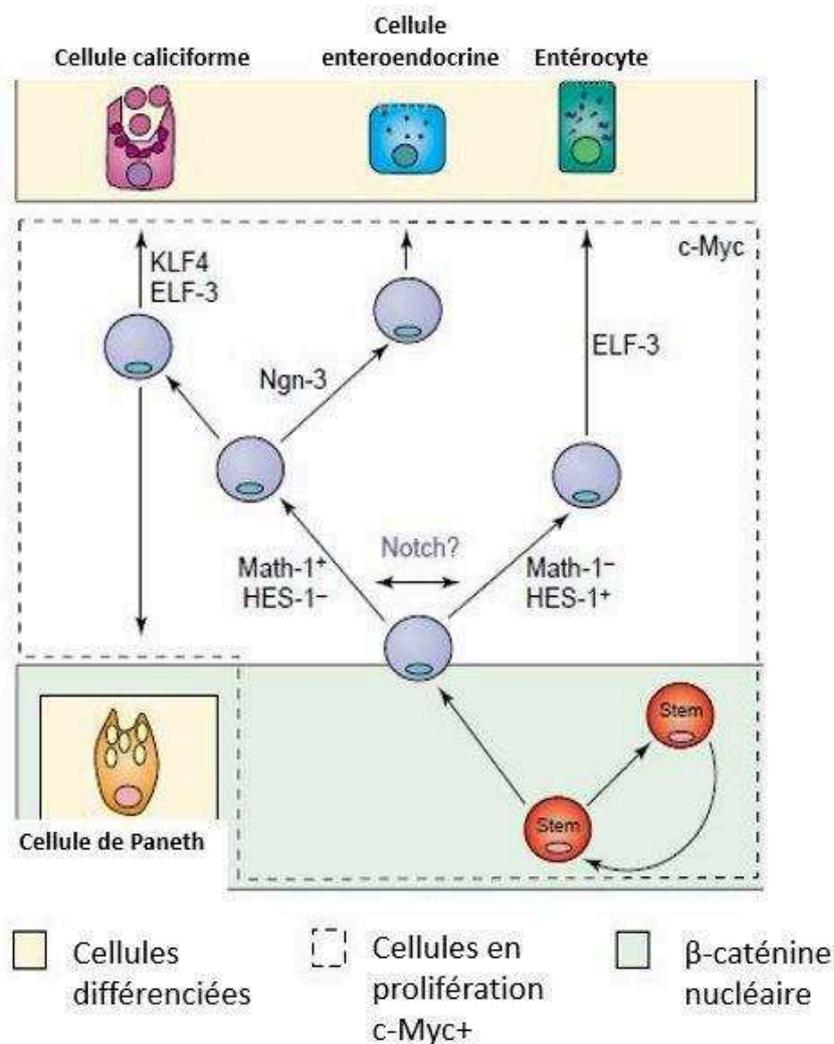


Figure 12 : Voies de différenciations des cellules de l'épithélium intestinal. D'après la publication de (Sancho *et al.*, 2003).

### 1.2.2 Les transporteurs membranaires

Les transporteurs membranaires sont abondamment exprimés dans certaines cellules comme les entérocytes, les hépatocytes, les cellules épithéliales des tubules rénaux, au niveau de la barrière hémato-encéphalique, hémato-testiculaire et du placenta (Li and Shu, 2014; Szakács *et al.*, 2008). L'expression et le fonctionnement de ces transporteurs dans les différents tissus est étroitement orchestré et leur régulation est liée aux systèmes de signalisations des cytokines, des hormones et des facteurs de croissance (Nigam, 2015). Leur régulation complexe, par phosphorylation (Stolarczyk *et al.*, 2011), par transcription (Scotto, 2003), et par les systèmes de signalisation cités précédemment, dans des cellules ou un tissu en particulier peut altérer plus globalement la physiologie de l'organisme (Nigam,

2015). Les transporteurs membranaires assurent l'absorption ou le relargage spécifique de nombreux composés nécessaires au bon fonctionnement de la cellule : sucres, acides aminés, nucléotides, etc., et assurent également la défense de ces cellules contre les xénobiotiques, en interagissant avec de nombreux composés pharmaceutiques comme les anti-cancéreux, les antibiotiques, les antidépresseurs, etc., (Szakács *et al.*, 2008). La spécificité des transporteurs pour les différents substrats (forte, faible, multispécifique) leur est propre (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Haimeur *et al.*, 2004; Leslie *et al.*, 2005; Nigam, 2015).

Ils sont classés selon deux superfamilles principales.

La première superfamille est celle des transporteurs SLC (Solute Carrier) qui permettent le transport de nombreux composés sans intervention de l'ATP. Ces transporteurs dits « indirects » utilisent l'énergie produite par une différence de potentiel électrochimique entre le potentiel de la membrane et la charge des composés. Le transport peut être de type « uniport » lorsqu'un seul composé est transporté, « antiport », lorsque le composé est transporté contre un gradient d'ions ou « symport », lorsque deux composés sont co-transportés. Pas moins de 395 transporteurs répartis en 52 familles composent cette vaste superfamille (Hediger *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2015). On distingue :

- Les transporteurs d'oligopeptides dépendants des protons (ex : PEPT1, PEPT2, PHT1)
- Les transporteurs d'anions organiques (ex : OAT)
- Les transporteurs de cations organiques (ex : OCT, OCTN)
- Les transporteurs de nucléosides (ex : CNT, ENT)
- Les transporteurs de mono-amines (ex : PMAT)
- Les transporteurs de mono-carboxylates (ex : MCT)

Au niveau de l'intestin ces transporteurs permettent l'absorption des acides aminés qui serviront pour la synthèse de protéines. Le polymorphisme de gènes codant ces transporteurs est impliqué dans différentes pathologies humaines. Ainsi, SLC22A4 et SLC22A5 sont impliqués dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Franke *et al.*, 2010).

La seconde superfamille est celle des transporteurs de la famille ABC (ATP Binding Cassette). Contrairement aux transporteurs SLC ceux-ci sont dits « directs » car pour fonctionner, ils utilisent l'énergie obtenue par hydrolyse de l'ATP (Hediger *et al.*, 2013; Leslie *et al.*, 2005). Les membres de cette famille sont classés suivant 7 sous familles en fonction de leurs domaines de fixation de l'ATP (aussi appelés domaines NBF). Une cinquantaine de membres de cette famille participent au relargage de composés hors de la cellule.

Les transporteurs ABC les plus connus dans le cadre du transport des xénobiotiques sont :

- La P-glycoprotéine (P-gp) également appelée MDR1, Multidrug Resistance 1.
- Les transporteurs MRP ou ABCC, les multidrug resistance-associated proteins. A ce jour, 9 membres ont été identifiés (MRP1, MRP2, etc.) dont 5 membres (MRP1 à MRP5) participent au transport des xénobiotiques.
- BCRP ou ABCG2 pour Breast cancer resistance protein.

La sur ou sous-expression de ces transporteurs dans les cellules peut avoir des conséquences bénéfiques ou néfastes suivant le contexte. En effet, ils sont impliqués dans la résistance à certains traitements anti-cancéreux. Lorsqu'ils sont surexprimés à la surface des cellules tumorales, ils réduisent l'efficacité du traitement car ils expulsent les molécules thérapeutiques. Au contraire, chez les personnes souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) une diminution de la production d'ARNm codant les transporteurs BCRP et MDR1 a été observée. Si la quantité de transporteurs membranaires est réduite, la protection contre les xénobiotiques est alors diminuée (Englund *et al.*, 2007). D'autre part, des mutations sur les gènes codant certains transporteurs SLC (OCTN1, OCTN2) sont associées à une sensibilité à développer une MICI (Peltekova *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2006).

Pour ces deux superfamilles la distribution des transporteurs dans les cellules polarisées, telles que les entérocytes, est spécifique (figure 13). En effet, dans différents tissus humains (poumons, foie, reins, testicules...), les transporteurs sont exprimés dans la membrane apicale ou basolatérale des cellules polarisées.

Ainsi, dans l'intestin grêle, certains transporteurs membranaires ABC spécialisés dans l'efflux des xénobiotiques vers la lumière du tube digestif sont exprimés au pôle apical des cellules, c'est le cas par exemple de MDR1, BCRP et MRP2, alors que d'autres transporteurs sont exprimés au pôle basolatéral, tel que MRP1, ils effluent alors leurs substrats vers la circulation sanguine (Leslie *et al.*, 2005). On retrouve cette même organisation dans le modèle cellulaire d'entérocytes Caco-2 (Brand *et al.*, 2006).

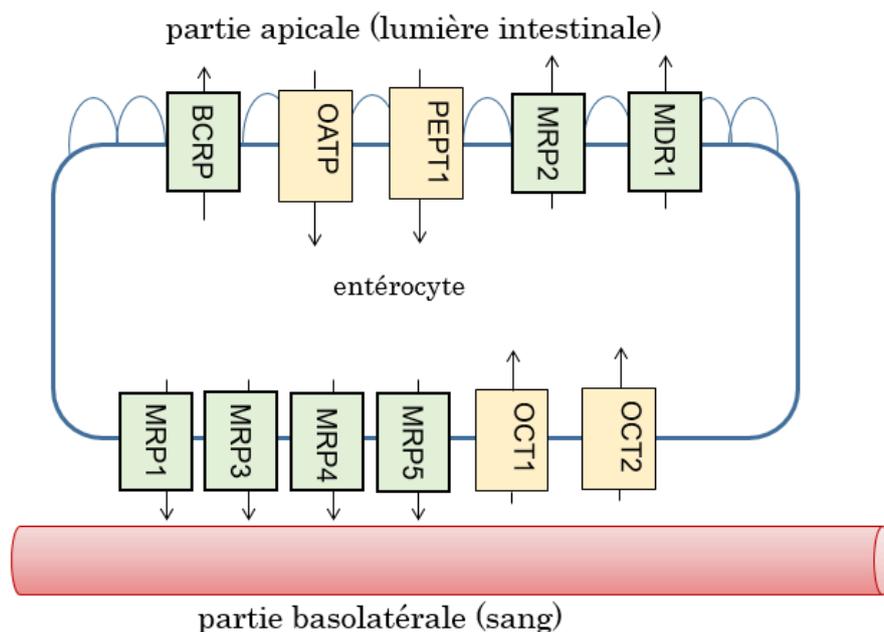


Figure 13 : Distribution des principaux transporteurs membranaires sur la membrane basolatérale et apicale des entérocytes. En jaune, les transporteurs de la famille des transporteurs SLC et en vert les transporteurs de la famille des transporteurs ABC (Giacomini *et al.*, 2010; Leslie *et al.*, 2005; Nigam, 2015).

### 1.2.3 Organisation cellulaire, jonctions cellulaires et fonction de barrière

De par leur structure et leurs interactions avec le milieu extérieur, les cellules intestinales participent à la fonction de barrière de l'intestin. Les jonctions cellulaires maintiennent un épithélium jointif qui limite le passage paracellulaire, c'est à dire entre les cellules au niveau de leurs jonctions, et au contraire favorise un passage transcellulaire, c'est-à-dire à travers le cytoplasme cellulaire, hautement contrôlé (Ballard *et al.*, 1995; Groschwitz and Hogan, 2009). Pour cela les transporteurs membranaires disposés au niveau du pôle apical et basal des cellules intestinales contrôlent l'entrée et la sortie des molécules dans et hors de la

cellule. Il existe plusieurs sortes de jonctions cellulaires : les jonctions serrées, les desmosomes, les hemidesmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes (jonctions gap). Celles-ci sont schématisées dans la figure 14. Les différentes jonctions forment un complexe bien organisé constitué de jonctions serrées dans la partie la plus apicale, puis de jonctions adhérentes suivies des desmosomes et jonctions communicantes lorsque l'on progresse vers le pôle basolatéral (Alberts *et al.*, 2002). Elles assurent ainsi l'étanchéité de l'épithélium intestinal et différencient le pôle apical du pôle basolatéral de l'épithélium.

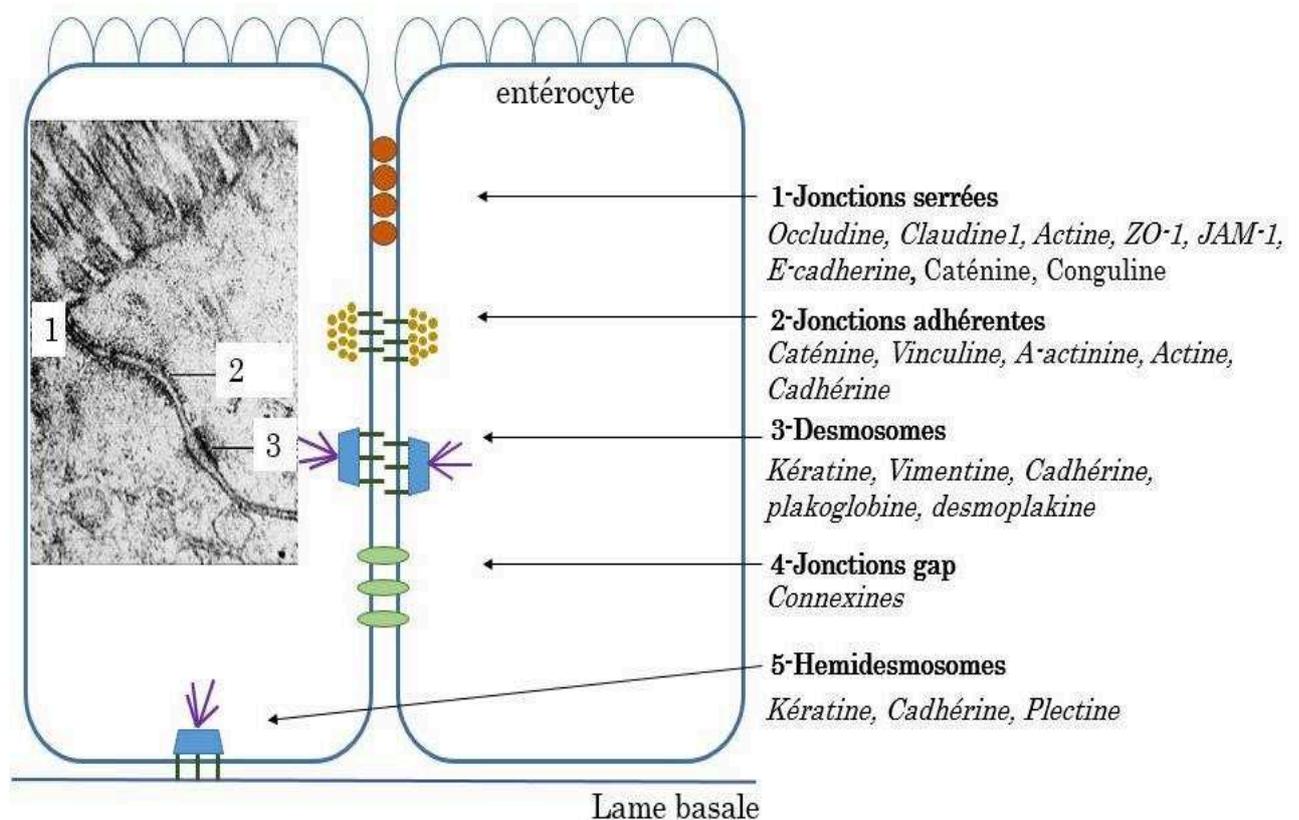


Figure 14 : Représentation schématique des jonctions cellulaires. Les différents types de jonctions cellulaires sont, à partir de la partie apicale des entérocytes jusqu'à la partie basolatérale, les jonctions serrées, puis les jonctions adhérentes, puis les desmosomes, les jonctions gap et les hemidesmosomes. Pour chacune sont énumérées dans cette représentation schématique les principales protéines impliquées (Alberts *et al.*, 2002). Les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes entre les entérocytes sont aussi visualisées par MET (à gauche de la figure)<sup>23</sup>.

<sup>23</sup> de <http://education.med.nyu.edu/>

Les jonctions serrées bloquent la circulation de fluides par la voie paracellulaire et participent à la régulation du passage transcellulaire des nutriments et autres composés importants pour la cellule. Les protéines transmembranaires constituant ces jonctions sont la claudin-1 et l'occludine. Celles-ci s'associent à ZO-1, une protéine intracellulaire qui relie ensuite les jonctions au cytosquelette d'actine. Les jonctions serrées sont également imperméables aux macromolécules à quelques exceptions près. Les jonctions adhérentes forment la «*zonula adherens*» qui ceinture la cellule. Les protéines transmembranaires qui les composent sont les cadhérines, les caténines, les  $\alpha$ -actinines et la vinculine. Elles ancrent ces jonctions aux filaments d'actines intracellulaires. Les desmosomes ressemblent à des boutons pression entre les cellules qui permettent le maintien de la forme et la résistance cytoplasmique des cellules. Les protéines intercellulaires qui les composent sont les cadhérines ainsi qu'un réseau de filaments de kératine intracellulaire qui est rattaché au cytosquelette de la cellule. La vimentine, la plakoglobine et la desmoplakine lient les protéines transmembranaires et le cytosquelette de la cellule. Les hemidesmosomes, situés au niveau du pôle basolatéral de la cellule assurent leur adhésion à la lame basale, feuillet extracellulaire constitué de protéines et glycoprotéines, qui sépare les cellules épithéliales de la couche inférieure composée du tissu conjonctif, de capillaires sanguins et lymphatiques, appelée lamina propria. Le réseau de filaments de kératine intracellulaire est connecté aux plectines, des protéines qui le relient aux cadhérines, les protéines transmembranaires constituant cette jonction. Enfin, pour les cellules excitables (neurones, muscle lisse de l'intestin) les jonctions communicantes permettent le passage rapide de potentiels électriques. Dans les autres cellules elles permettent le passage de petites molécules et ions entre les cellules. Les connexines sont les protéines impliquées dans ces jonctions (Alberts *et al.*, 2002).

### 1.3 Le mucus

Dans l'intestin, le mucus recouvre les cellules de l'épithélium intestinal et les sépare de la lumière intestinale. Il assure ainsi la protection de l'hôte contre les agressions extérieures et représente, après le microbiote, la deuxième ligne de défense face aux éléments extérieurs. De plus, il fluidifie le transit intestinal.

Le mucus est composé à 95 % d'eau et 5 % de mucines qui sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (MacAdam, 1993; Peterson and Artis, 2014). Sa viscosité et ses propriétés élastiques dépendent de sa composition en protéines. Il est également poreux permettant ainsi le passage de macromolécules. Dans certaines pathologies, la rhéologie du mucus est impliquée, c'est le cas pour le mucus pulmonaire dans la mucoviscidose (Lai *et al.*, 2009). Les cellules caliciformes de l'épithélium intestinal assurent la production et la sécrétion des mucines en continu. Dans le colon, la couche interne du mucus est ainsi renouvelée en 1 h (Johansson, 2012). Ce rapide renouvellement participe à la protection de l'épithélium en empêchant le contact des contaminants avec les cellules de l'épithélium intestinal.

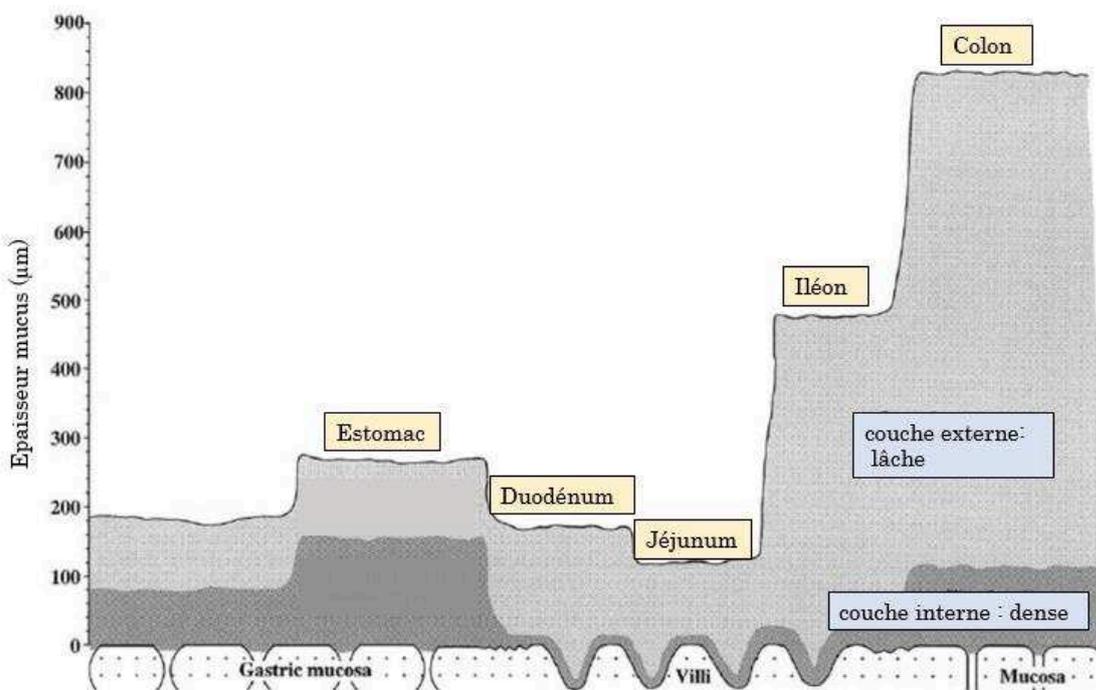


Figure 15 : Épaisseur du mucus intestinal chez le rat. L'épaisseur des couches interne et externe du mucus varie en fonction des différentes parties du tractus gastro-intestinal chez le rat (Ensign *et al.*, 2012).

Le mucus est composé de plusieurs couches successives ayant une composition et une structure différentes. Chez le rat, l'épaisseur et la composition du mucus sont différentes suivant sa localisation dans le tractus gastro-intestinal (figure 15) (Johansson *et al.*, 2011a). On suppose une organisation proche chez l'homme (Johansson *et al.*, 2011b ; Johansson, 2012).

Le mucus n'agit pas seulement comme un simple filtre. Sa structure et sa composition sont amenées à évoluer en fonction de plusieurs paramètres comme le microbiote ou l'état de santé de l'individu.

Le glycocalyx est la première couche, directement attachée aux entérocytes, c'est une couche très fine d'environ 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et principalement composée des mucines MUC3, MUC12 et MUC17 (Kim and Ho, 2010). La couche de mucus interne adhère ensuite au glycocalyx et aux entérocytes. Cette couche est très dense. Elle mesure 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur dans le colon de la souris et elle est estimée faire 200-300  $\mu\text{m}$  chez l'Homme (Pelaseyed *et al.*, 2014). Elle n'est pas colonisée par les bactéries, contrairement à la couche externe de mucus, plus lâche qui sert de site d'attachement aux bactéries du microbiote via les O-glycosylations des mucines (figure 16) (Johansson *et al.*, 2011b). Dans le colon, cette colonisation ne déclenche pas de réaction inflammatoire.

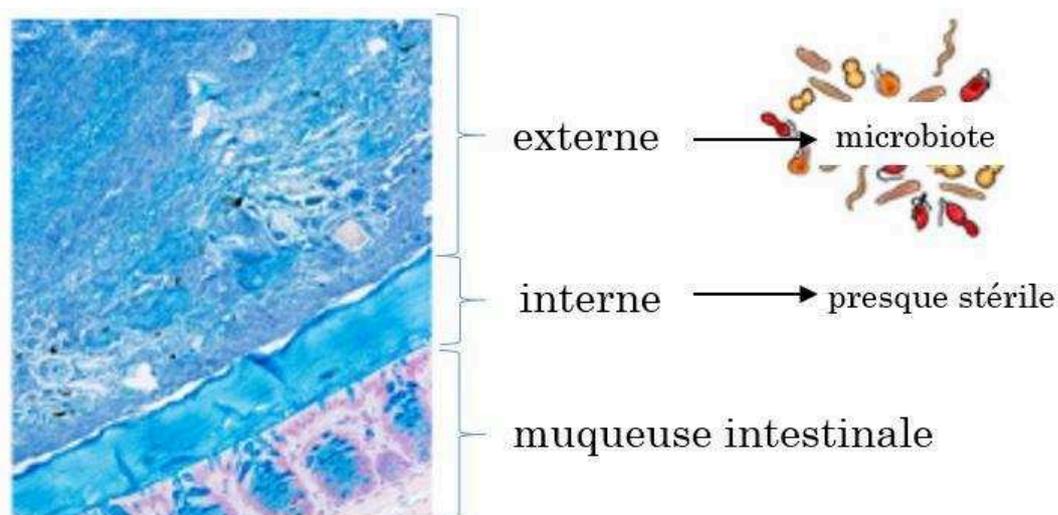


Figure 16 : Structure de la couche de mucus. La couche interne de mucus est liée à la membrane des cellules de la muqueuse intestinale. Cette couche est dépourvue de bactéries du microbiote, contrairement à la couche externe, plus lâche. Image d'après (Papineni and Umar, 2013).

Le mucus permet aussi l'adhésion des peptides antimicrobiens. Les interactions entre le microbiote et le mucus ainsi que les mécanismes d'actions sont encore mal compris, mais ils sont très étudiés en vue d'identifier des probiotiques et des traitements dans le cas de maladies de l'intestin (Juge, 2012).

Les mucines sont des protéines fortement glycosylées (glycoprotéines), de haut poids moléculaire (75 kDa minimum) et formant des oligomères. Elles possèdent une structure commune comprenant des répétitions de séquences d'acides aminés riches en proline, thréonine et sérine (domaines PST). Ces domaines sont ensuite O-glycosylés pour la majorité des mucines (80 %) et parfois ils sont également N-glycosylés, principalement pour les mucines membranaires (figure 17) (McGuckin *et al.*, 2011b). Ces glycosylations sont responsables des propriétés biologiques et rhéologiques du mucus (Juge, 2012). Les 17 mucines connues sont classifiées en deux familles : d'une part, les mucines transmembranaires, MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16 et MUC17 qui composent le glycocalyx et la couche interne de mucus, et d'autre part les mucines sécrétées, MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6 qui composent la couche externe de mucus. Dans l'intestin, MUC2 est la mucine sécrétée la plus abondante, elle représente le squelette structural du mucus (Johansson *et al.*, 2011a).

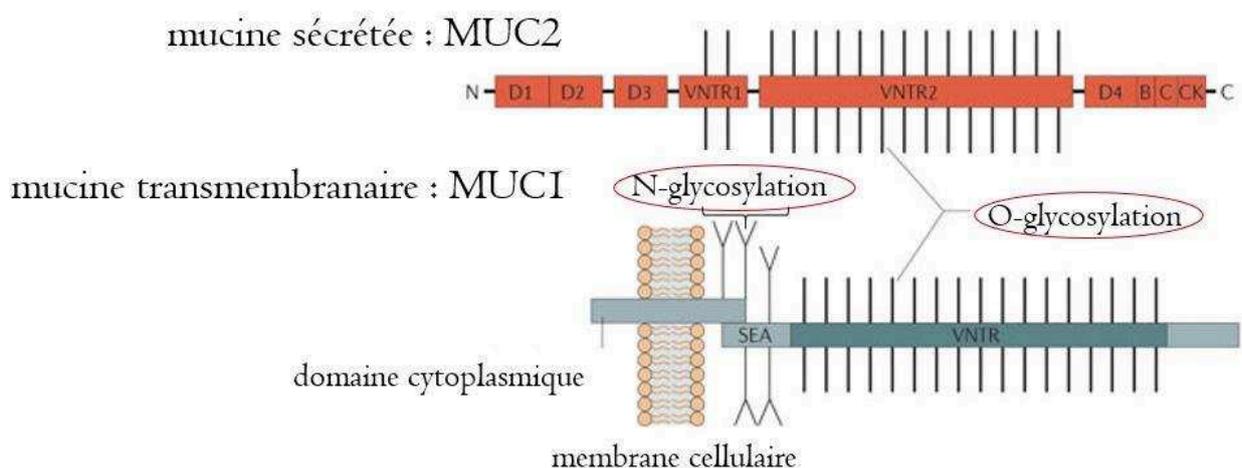


Figure 17 : Structure des mucines MUC1 et MUC2. MUC2 est une mucine sécrétée, elle est O-glycosylée alors que MUC1 est une mucine transmembranaire, en plus de la partie O-glycosylée, elle possède un domaine cytoplasmique N-glycosylé (McGuckin *et al.*, 2011b).

Outre la fonction de filtre du mucus, les glycoprotéines qu'il contient sont une source de nutriments pour les bactéries du microbiote. Certains micro-organismes

ont la capacité de dégrader les O-glycosylations et N-glycosylations pour pénétrer profondément dans la couche de mucus, au plus proche des cellules de l'épithélium. D'autres molécules entrent dans la composition du mucus. Parmi ces molécules, les facteurs tréfoil (TFFs) sont des protéines exprimées et sécrétées de façon non spécifique dans le tractus gastro-intestinal. TFF3, le plus exprimé dans l'intestin, est un élément structural du mucus. Son interaction avec les mucines détermine la rhéologie du mucus et notamment sa viscosité. Le mucus contient également des peptides antimicrobiens non-spécifiques comme les  $\alpha$ -défensines, les lysozymes et certaines lectines qui sont sécrétés par les cellules de Paneth, ainsi que des peptides antimicrobiens spécifiques comme les IgA ou les IgG qui sont sécrétés au niveau des plaques de Peyer. Ces peptides antimicrobiens interagissent avec les mucines et éliminent les bactéries pathogènes, principalement, en altérant leurs membranes (McGuckin *et al.*, 2011b).

## 1.4 Inflammation et immunité au sein de l'épithélium intestinal

### 1.4.1 Défense de l'organisme

L'inflammation a deux fonctions principales, défendre l'organisme contre les agressions et réparer lorsque l'intégrité de l'organisme est compromise (blessure, infection). Pour assurer ces fonctions, le système immunitaire inné et le système immunitaire acquis, les deux volets du système immunitaire chez l'Homme, sont mobilisés. Ils ont en commun de nombreux mécanismes et communiquent grâce à des médiateurs de l'inflammation, les cytokines (Rang *et al.*, 2011).

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense mise en place, il est non adaptatif. Suite à une infection par un virus ou un pathogène, la réponse cellulaire est immédiate. Les agresseurs sont identifiés par les cellules grâce à un panel de récepteurs, membranaires ou intracellulaires, les PRRs qui reconnaissent les antigènes spécifiques aux pathogènes (PAMPS). Parmi ces récepteurs, les principaux sont les Toll-Like récepteurs (TLR), mais aussi les récepteurs couplés à la protéine G, et les NOD-Like récepteurs (NOD). Ces récepteurs sont exprimés par des cellules impliquées dans cette réponse (tableau 3) et déjà présentes dans les tissus (au sein des tissus lymphoïdes) : les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes, les mastocytes, mais également sur les cellules de

l'épithélium intestinal i.e. TLR4, TLR5, NOD2. Suite à la reconnaissance de pathogènes par l'intermédiaire de ces récepteurs, les cellules, immunitaires et épithéliales, sécrètent des cytokines, qui sont des protéines ou peptides médiateurs de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Les premières cytokines à être sécrétées, IL-1 et TNF- $\alpha$ , augmentent la perméabilité vasculaire, mobilisent d'autres médiateurs, afin de recruter des cellules impliquées dans cette réponse immunitaire, et notamment plusieurs types cellulaires qui ont la capacité d'éliminer les pathogènes : les macrophages, différenciés à partir des monocytes, les lymphocytes NK (Natural killer) et les granulocytes. Lors de cette réponse, un groupe d'une trentaine de protéines, faisant partie du système du complément (dont les peptides C1 à C9) sont aussi mobilisées pour éliminer les pathogènes, réguler l'inflammation et moduler la réponse immunitaire (Rang *et al.*, 2011).

Le système immunitaire acquis est la seconde ligne de défense de l'organisme. Il est plus évolué car il permet de garder en mémoire les agressions passées afin d'y répondre plus facilement lors d'une deuxième attaque. Les cellules les plus importantes de cette réponse sont les lymphocytes B et T (tableau 3). Ces cellules sont produites dans la moelle osseuse puis mûrissent dans les os pour les lymphocytes B et dans le thymus pour les lymphocytes T. Arrivés à maturité, ils sont stockés dans les tissus lymphoïdes où ils identifient les antigènes qui leur sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) comme les cellules dendritiques, les mastocytes, les monocytes. Les lymphocytes B sont responsables de la production d'anticorps alors que les lymphocytes T sont importants pour la phase d'induction de la réponse immunitaire. En effet, la réponse immunitaire acquise se déroule en deux phases. La première phase est la phase d'induction de la réponse, pendant laquelle les antigènes sont présentés aux lymphocytes T naïfs, présents dans les tissus lymphoïdes et qui n'ont pas encore vu d'antigènes. Ces lymphocytes naïfs possèdent des marqueurs cellulaires, CD8 ou CD4, qui orienteront leur différenciation en lymphocytes actifs : les lymphocytes TCD8 se différencient en lymphocytes cytotoxique T et les lymphocytes TCD4 en lymphocytes T auxiliaire i.e., Th1, Th2, Th17 ou Treg, suivant le type de réponse qui sera induite. La deuxième phase est la phase effective, elle dépend de la réponse cellulaire qui a été privilégiée. Les lymphocytes B et T peuvent alors se

différencier en cellules « mémoires » ou participer à la réponse immunitaire, « humorale » par la production d'anticorps i.e. IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, ou « cellulaire » par l'induction de lymphocyte T cytotoxiques, CD8+ et CD4+, et l'activation de macrophages (Rang *et al.*, 2011).

Système immunitaire inné	Système immunitaire acquis
Cellules dendritiques	Lymphocytes B
Mastocytes	Lymphocytes T :
Monocytes/Macrophages	- Lymphocytes T CD4 auxiliaire (Th1/Th2)
Granulocytes	-Lymphocytes T CD8 cytotoxiques
Lymphocytes NK	-Lymphocytes Treg
	-Lymphocytes NK

Tableau 3 : Principales cellules du système immunitaire inné et acquis.

Pour accomplir de tels mécanismes de défenses, les cellules doivent communiquer entre elles, via les cytokines (tableau 4). Lors d'épisodes inflammatoires, leur sécrétion est augmentée. Les cytokines agissent localement sur des récepteurs spécifiques. Plus de 100 cytokines sont recensées, les principales sont classées selon 3 groupes, les interleukines (IL), les chimiokines et les interférons (IFN) (tableau 4). Les cytokines ont différentes fonctions, IL-1 et TNF- $\alpha$  comme précisé précédemment recrutent des cellules impliquées dans la réponse immunitaire, certaines cytokines sont pro-inflammatoires via le recrutement de cellules de l'immunité comme IL-8, IL-6, IL-4 alors que d'autres sont anti-inflammatoires comme IL-10. Les chimiokines MCP-1 et RANTES agissent sur les monocytes, les granulocytes et les cellules responsables de l'inflammation chronique alors que les interférons IFN- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  induisent des réponses antivirales des cellules immunitaires (Rang *et al.*, 2011).

<i>Cytokines stimulants les cellules du système immunitaire : prolifération et différenciation</i>	<b>Pro-inflammatoire</b> : IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17, GM-CSF <b>Anti-inflammatoire</b> : IL-4, IL-10, IL-13
<i>Cytokines signalant les autres activités cellulaires</i>	MIP-1, TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , Eotaxin, MCP-1, RANTES
<i>Interférons</i>	IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$

Tableau 4 : Principales cytokines.

Le dysfonctionnement de la réponse immunitaire peut avoir de graves conséquences sur la santé, notamment lorsque le système immunitaire se retourne contre les cellules du « soi » c'est-à-dire les cellules saines de l'organisme. Il entraîne alors des lésions cellulaires et tissulaires et la survenue de maladies auto-immunes<sup>24</sup> comme la sclérose en plaque, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type 1 ou encore le lupus. Le système immunitaire peut aussi répondre de façon disproportionnée, c'est ce qui se passe dans le cas des allergies. Le dysfonctionnement de la réponse immunitaire peut aussi entraîner une inflammation chronique, persistante dans le temps. C'est ce qui se passe dans l'intestin des personnes souffrant des MICI (Kaser *et al.*, 2010).

#### 1.4.2 Tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT)

Des cellules du système immunitaire inné et adaptatif sont présentes le long de l'intestin. Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT pour gut associated lymphoid tissue) participent à la réponse immunitaire, ils sont un lieu de stockage pour les cellules de l'immunité : mastocytes, cellules dendritiques et principalement les lymphocytes B et T en attente d'activation. Les GALT sont divisés entre les sites inducteurs de la réponse immunitaire (plaques de Peyer et ganglions mésentériques ou ganglions du système lymphatique) et des sites effecteurs (lymphocytes activés déployés dans la lamina propria des épithélia intestinaux) (Mowat, 2003). Les plaques de Peyer sont des structures particulières

<sup>24</sup><http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/maladies-auto-immunes> (12/08/16)

disposées le long de l'épithélium intestinal, à une densité plus importante dans la partie distale de l'iléon (figure 18).

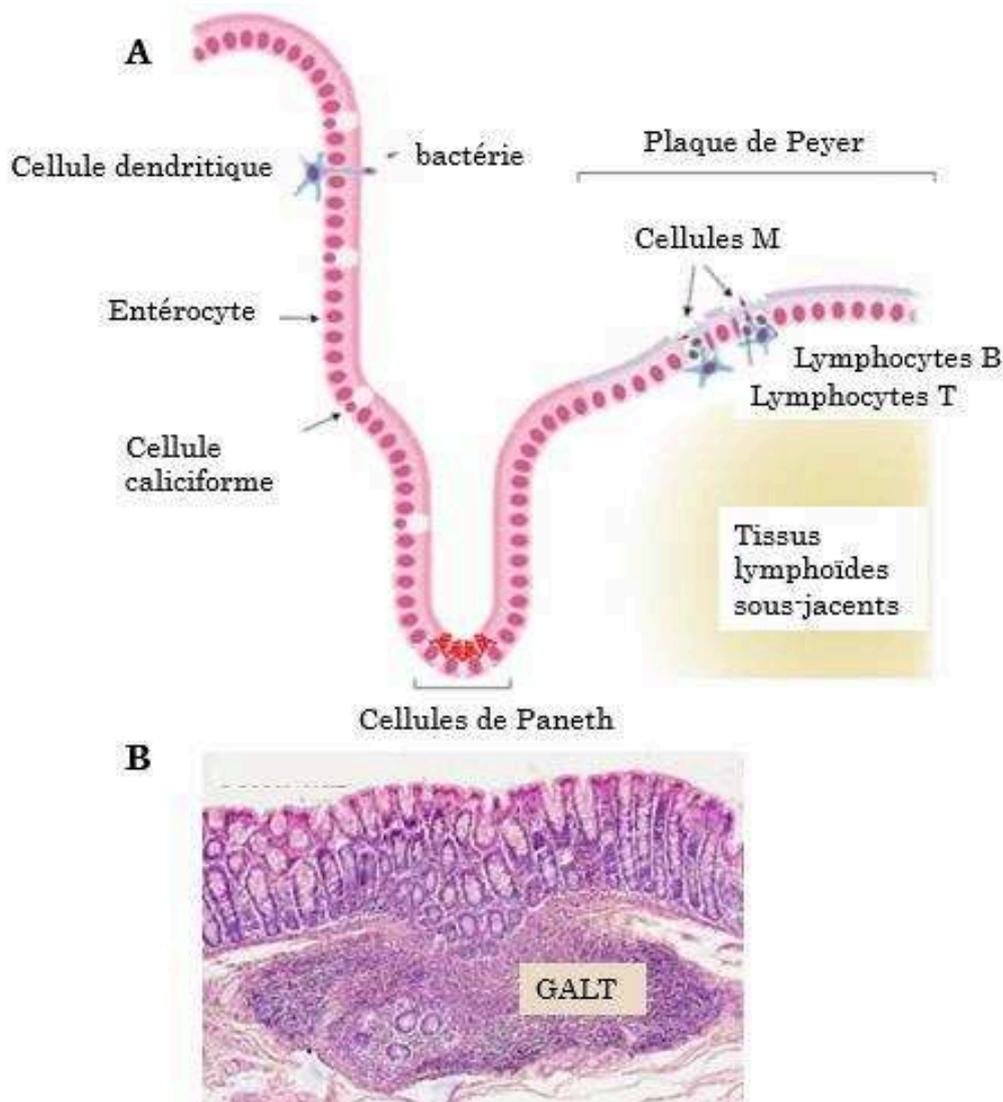


Figure 18 : Tissus lymphoïdes de l'intestin. A) Représentation schématique des plaques de Peyer au sein de l'épithélium intestinal, ainsi que des tissus lymphoïdes sous-jacents. B) Coupe histologique présentant des tissus lymphoïdes intestinaux (GALT) au sein du colon<sup>25</sup>. D'après (Ohno, 2016).

Ces structures sont constituées par un épithélium composé d'entérocytes et de cellules Microfold (cellules M), issues de leur différenciation, qui sont des cellules épithéliales qui n'ont pas de microvillosités et ont une activité enzymatique réduite (Mowat, 2003). La couche de mucus y est moins épaisse. Ces structures sont associées à des follicules lymphoïdes sous-jacents contenant des cellules de l'immunité innée : cellules dendritiques, mastocytes, macrophages et cellules de

<sup>25</sup> <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/Lymphoid2/lymph2.htm> (12/08/16)

l'immunité acquise : lymphocytes B et T naïfs, en attente d'activation par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) (figure 19). Les cellules de l'immunité innée et les lymphocytes T actifs se déploient également dans la lamina propria, le tissu conjonctif lâche situé sous les épithélia, et peuvent venir rejoindre l'épithélium pour exercer leurs actions (captures d'antigènes, attaques de pathogènes, etc.) (McGhee *et al.*, 1992).

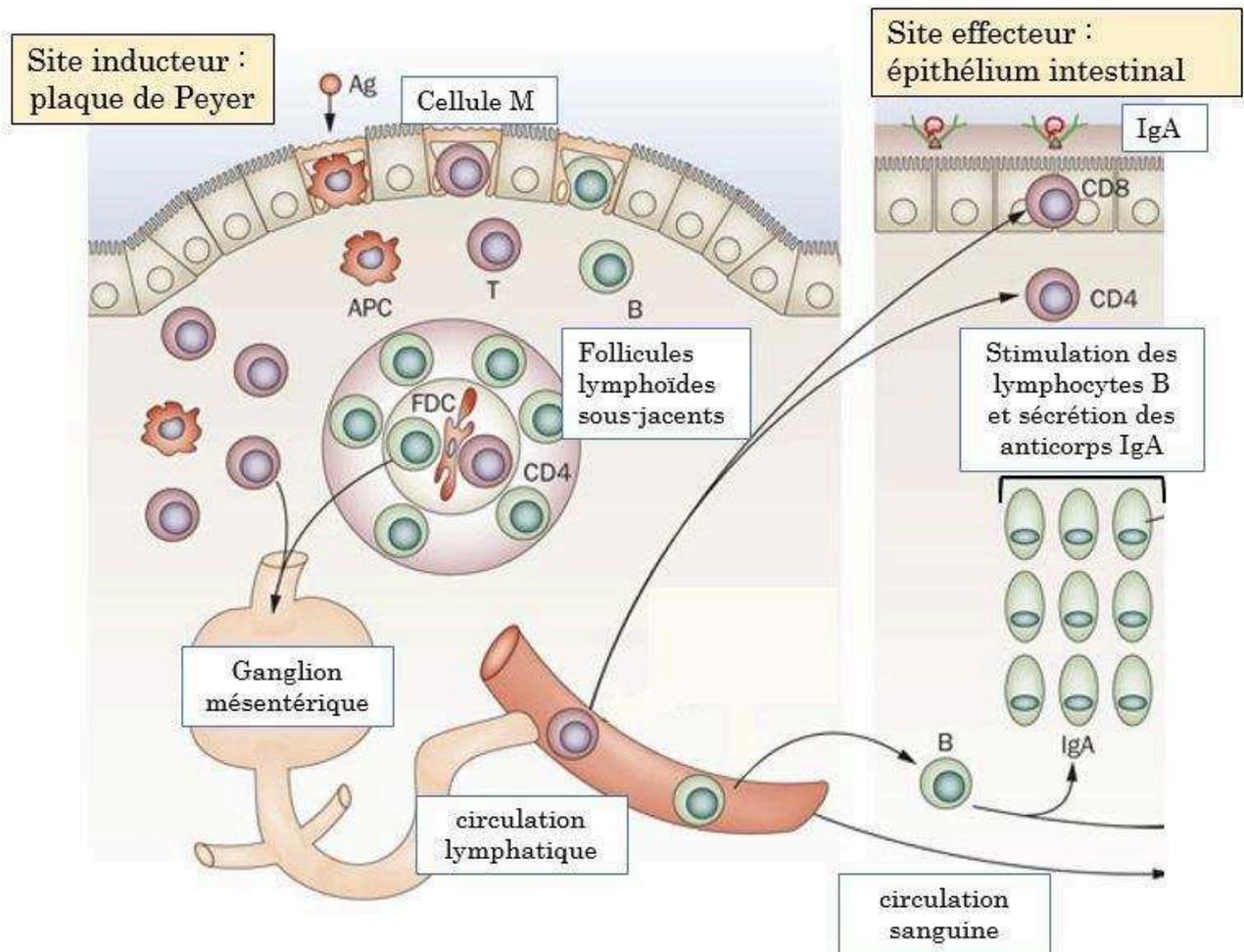


Figure 19 : Sites inducteurs et effecteurs de l'immunité intestinale. Représentation simplifiée de la réponse immunitaire. Au niveau des plaques de Peyer, les antigènes passent à travers les cellules M pour être récupérés par les cellules présentatrices d'antigènes. Ils sont ensuite présentés aux cellules de l'immunité acquise, stockées dans les tissus et ganglions lymphoïdes, et en attente d'activation. Une fois activés, les lymphocytes T et B rejoignent la circulation sanguine et l'épithélium intestinal où a lieu la réponse immunitaire, de type cellulaire avec le déploiement de cellules cytotoxiques, et humorale par la production d'anticorps. APC : cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes), B : lymphocytes B, T : lymphocytes T, CD4+ et CD8+ : lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques. Schéma adapté d'après (Brandtzaeg, 2009).

Les antigènes présents dans la lumière intestinale peuvent être capturés au niveau des plaques de Peyer par passage à travers les cellules M, par les cellules immunitaires ou directement par les cellules épithéliales. Au niveau des sites inducteurs, les cellules M agissent comme des senseurs et adressent les antigènes aux tissus lymphoïdes par la voie transcellulaire (Ohno, 2016). Les antigènes sont alors transmis aux tissus lymphoïdes sous-jacents pour l'activation des cellules de l'immunité acquise (Reboldi and Cyster, 2016). Lorsqu'ils sont activés, les lymphocytes B participent à la réponse « humorale » de l'immunité acquise en sécrétant des anticorps, principalement de type IgA, qui sont ensuite libérés dans la couche de mucus de la lumière intestinale (Macpherson *et al.*, 2001) alors que les lymphocytes T participent à la réponse « cellulaire » en mobilisant des cellules cytotoxiques.

Dans l'intestin, l'épithélium est en contact avec de nombreux antigènes provenant du microbiote, de l'alimentation et de bactéries pathogènes. Le système immunitaire doit notamment être capable de distinguer les antigènes des bactéries pathogènes de celles du microbiote. La reconnaissance des antigènes se fait par un panel de récepteurs (les PRRs), distribué sur les membranes ou dans les cellules immunitaires et les cellules de l'épithélium intestinal.

Un de ces PRR, le récepteur NOD2, est d'intérêt car il semble impliqué dans la physiopathologie des MICI. En effet, des mutations du gène *NOD2* sont observées chez les personnes atteintes de la maladie de Crohn (Jung *et al.*, 2010; Ogura *et al.*, 2001).

## 2. Modèles cellulaires *in vitro* d'épithélia intestinaux

Plusieurs modèles cellulaires d'épithélia intestinaux humains sont bien décrits dans la littérature. Par le passé, au moins une vingtaine de lignées cellulaires ont été étudiées et caractérisées. Celles possédant les caractéristiques les plus proches des cellules humaines sont désormais couramment utilisées dans les laboratoires (Chantret *et al.*, 1988). Dans ce paragraphe, il sera détaillé les modèles cellulaires que j'ai utilisé pendant mon doctorat, à savoir la monoculture Caco-2, la coculture

Caco-2/HT29-MTX et la coculture Caco-2(C1)/RajiB. De nouveaux modèles ainsi que des modèles plus complexes sont également présentés.

## 2.1 Le modèle Caco-2

Les lignée cellulaire Caco-2 (figure 20) a été mise au point par Jogen Fogh à New-York en 1964 (Rousset, 1986). Ce sont des cellules intestinales humaines obtenues à partir de tumeurs gastro-intestinales. Elles ont été initialement cultivées pour étudier les mécanismes tumoraux et les traitements anti-cancéreux. A partir des années 1980, ces lignées cellulaires tumorales ont été utilisées car elles présentaient des caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques des entérocytes.

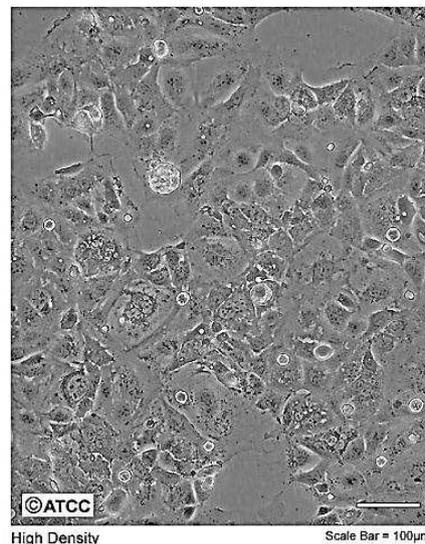


Figure 20 : Cellules Caco-2. Cellules à forte densité observée au microscope (ATCC® HTB-37™).

Les cellules Caco-2 poussent en monocouche polarisée et se différencient avec un pôle apical où l'on retrouve des microvillosités et les jonctions cellulaires. La résistance transépithéliale ainsi obtenue est forte, l'épithélium est donc très jointif. La présence de « dômes » sur le tapis cellulaire est une conséquence de la polarité de l'épithélium. Cette différenciation est obtenue après 21 jours de culture (Le Ferrec, 2001; Lea, 2015; Rousset, 1986). Biochimiquement, ces cellules expriment des activités enzymatiques caractéristiques comme la phosphatase alcaline, la sucrase isomaltase et la lactase (Sambuy *et al.*, 2005). Plusieurs études montrent que les cellules Caco-2 sont plus proches des cellules embryonnaires que des

cellules adultes, comme l'atteste l'expression d'ARN messagers codant certains transporteurs et canaux ioniques (Anderle *et al.*, 2003). Elles expriment également de nombreux transporteurs de façon polarisée, sur leur membrane apicale ou basolatérale. Du fait de ces propriétés, ces cellules sont un bon modèle d'épithélium intestinal, qui est utilisé aussi bien en toxicologie et pharmacologie que dans le domaine de la nutrition. Pour ce type d'étude les cellules Caco-2 sont cultivées sur des membranes semi-perméables (Transwell) qui permettent d'accéder aux deux pôles de l'épithélium et ainsi de mesurer la résistance transépithéliale, avec un multimètre, et la perméabilité de l'épithélium, avec des marqueurs fluorescent.

Dans la littérature, plusieurs études mettent en œuvre le modèle Caco-2 pour étudier la translocation des NPs (polystyrènes, fer, polymères organiques ...), c'est-à-dire leur transfert du pôle apical vers le pôle basolatéral, mimant un passage de la lumière intestinale vers le milieu intérieur (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Mahler *et al.*, 2012; Walczak *et al.*, 2015). Il existe plusieurs sous-populations de cellules Caco-2 (Sambuy *et al.*, 2005). D'autre part, ces cellules présentent des propriétés et des sécrétomes différents suivant leur état de différenciation (García-Lorenzo *et al.*, 2012). Enfin, les cellules Caco-2 ont un large spectre de résistance transépithéliale allant de 150 à 1400  $\Omega\text{cm}^{-2}$ . Ces différences s'expliquent par l'utilisation de cellules Caco-2 d'origines différentes, par l'utilisation de protocoles de culture différents tels que le nombre de passages, le milieu de culture ou encore le support utilisé (figure 21) (Chen *et al.*, 2010). Par exemple, les cellules Caco-2 présentant un faible nombre de passage (35-47) ont une TEER plus faible (475-700  $\Omega\text{cm}^{-2}$ ) qu'aux passages plus tardifs (87-112 ; 1100-1500  $\Omega\text{cm}^{-2}$ ) (Lu *et al.*, 1996; Moyes *et al.*, 2007).

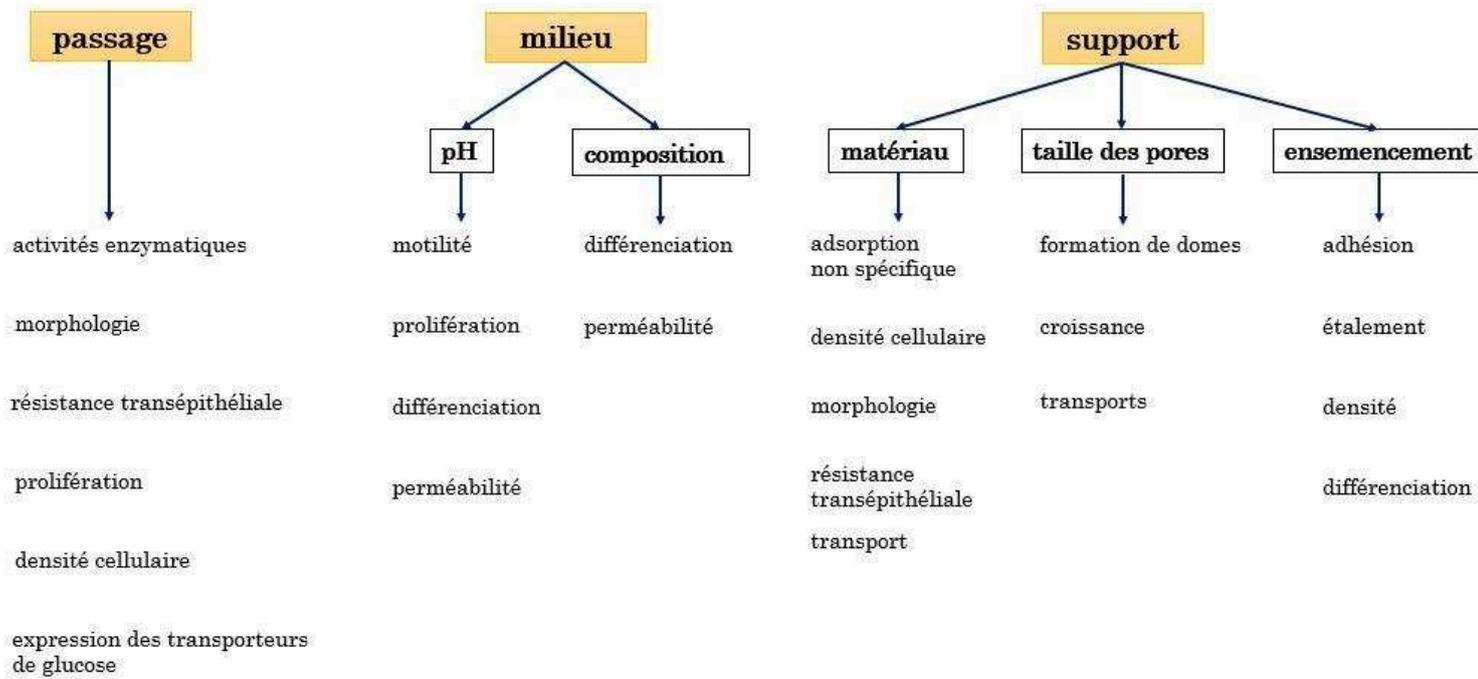


Figure 21 : Paramètres influençant la culture de la lignée cellulaire Caco-2. Le nombre de passage, le milieu et le support influencent divers paramètres caractéristiques de la lignée cellulaire Caco-2 (Chen *et al.*, 2010).

## 2.2 Le modèle Caco-2/HT29-MTX

Un des inconvénients à utiliser le modèle Caco-2 seul est que ces cellules ne produisent pas de mucus comme c'est le cas d'un intestin, *in vivo*. Or, dans le cadre de l'étude de l'impact des NPs sur l'intestin, la présence de mucus est importante car elle peut représenter soit une barrière qui limite l'accès des NPs aux cellules épithéliales, soit un réservoir dans lequel les NPs sont stockées. L'utilisation de modèles cellulaires sécréteurs de mucus permet de pallier ce manque.

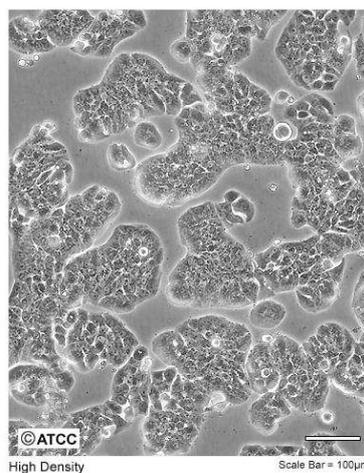


Figure 22 : Cellules HT-29. Cellules à forte densité observée au microscope (ATCC® HTB-38™).

Les cellules HT29 (figure 22) ont également été isolées d'un carcinome intestinal humain par Jogen Fogh en 1974 (Rousset, 1986). Elles forment un épithélium moins jointif que les cellules Caco-2, la TEER mesurée est plus faible car elles forment moins de liaisons cellulaires serrées (Lu *et al.*, 1996; Srinivasan *et al.*, 2015). Cette lignée cellulaire contient à la fois des cellules de type sécrétrice et absorptive, lorsqu'elles sont stressées, par exemple en cas de privation de glucose, de glutamine ou par un traitement pharmacologique, elles ont la capacité de s'adapter en développant de nouvelles populations de cellules. De cette façon, Thecla Lesuffleur et son équipe, par un traitement avec des concentrations croissantes de méthotrexate, ont établi une lignée cellulaire de HT29 qui sécrète continuellement du mucus. Cette lignée a été nommée HT29-MTX (Lesuffleur *et al.*, 1990).

Ce modèle cellulaire était initialement utilisé pour des études d'absorption de substances à travers l'épithélium (Wikman-Larhed and Artursson, 1995). La coculture de ces cellules avec un ratio variable de cellules Caco-2 modifie la quantité de mucus présente sur l'épithélium (Hilgendorf *et al.*, 2000). On obtient ainsi des épithélia représentatifs de la région de l'intestin que l'on souhaite étudier. La proportion des cellules caliciformes dans l'intestin varierait entre 10 et 24 % mais peu d'informations sont disponibles concernant la distribution, en nombre, entre les entérocytes et les cellules caliciformes au sein de l'épithélium intestinal (Karam, 1999; Kim and Ho, 2010; Schimpel *et al.*, 2014). Par exemple, le ratio de 30 % de cellules HT29-MTX pour 70 % de cellules Caco-2 permet d'avoir une couche de mucus homogène tout en conservant l'intégrité de l'épithélium (Schimpel *et al.*, 2014). Ce modèle est plutôt représentatif de l'iléon qui est la partie la plus distale de l'intestin grêle. Les deux lignées cellulaires forment des jonctions cellulaires mais développent une TEER moins importante que la monoculture Caco-2. Contrairement aux cellules Caco-2 et aux cellules caliciformes de l'intestin, les cellules HT29-MTX n'expriment pas le transporteur MDR1 (glycoprotéine P) (Mahler *et al.*, 2009). De plus, les gouttelettes contenant du mucus apparaissent à la surface des cellules quelques jours après la confluence des cellules. La glycoprotéine MUC1 est la première à être sécrétée, puis s'en suivent les mucines

MUC2, MUC3, MUC4, MUC5A, MUC5B, MUC5C, MUC11 (Gouyer *et al.*, 2001; Lesuffleur *et al.*, 1993). Le modèle HT29-MTX sécrète aussi des facteurs tréfoil, notamment TFF3, qui entrent également dans la composition du mucus (Gouyer *et al.*, 2001).

### 2.3 Le modèle Caco-2(C1)/RajiB

La coculture Caco-2(Clone1)/RajiB est un modèle d'épithélium intestinal associé aux plaques de Peyer car il est composé d'entérocytes et de cellules M. *In vitro*, les premiers modèles de plaques de Peyer qui ont été développés utilisaient des clones cellulaires de la lignée Caco-2 en coculture avec des lymphocytes murins afin d'induire la différenciation d'une partie des entérocytes en cellules M et d'étudier le transport de pathogènes à travers l'épithélium (Kernéis *et al.*, 1997). Ainsi a été décrite la coculture de clones de la lignée Caco-2, caco-2(C1), Caco-2(C8) ou C2BBe1, et de cellules humaines ou murines de l'immunité telles que les cellules Raji. La lignée cellulaire Raji est une lignée de cellules humaines obtenue à partir d'un lymphome, ce sont des lymphoblastes de type lymphocyte B. Elle a été établie par R.J.V. Pulvertaft en 1963 à partir d'un lymphome du maxillaire gauche chez un enfant de 11 ans, Raji (ATCC® CCL-86™). Dans le modèle que nous avons utilisé, les cellules Caco-2 (C1) sont cultivées seules pendant 14 jours sur des Transwell avant d'ajouter les cellules Raji dans le compartiment basolatéral du transwell. La présence de ces lymphocytes dans la coculture induit la différenciation de 15 à 30 % des cellules Caco-2 en cellules M (des Rieux *et al.*, 2007). Les cellules M différenciées n'ont plus les microvillosités caractéristiques des entérocytes, elles expriment des marqueurs qui leurs sont propres comme C5a ou GP2 (S.-H. Kim *et al.*, 2011). La présence des cellules M dans l'épithélium entraîne également une diminution de l'intégrité de l'épithélium. D'autres marqueurs des cellules M comme l'augmentation de l'expression de l'antigène Sialyl Lewis A, la diminution de la liaison UEA-1, une différence de localisation de la  $\beta 1$  intégrine ont également été décrits (Masuda *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2007). Le modèle est par exemple utilisé pour étudier le transport de prions à travers les cellules M de l'épithélium intestinal (Frossi *et al.*, 2002; Heppner *et al.*, 2001),

l'interaction avec les bactéries (Kernéis *et al.*, 1997) ou encore le transports de NPs (Brun *et al.*, 2014).

#### 2.4 Modèles cellulaires plus complexes et MICI

Des modèles *in vitro* de plus en plus complexes se développent afin de limiter l'expérimentation *in vivo* qui pose des problèmes éthiques et réglementaires. Les cocultures Caco-2/macrophages primaires ou immortalisés sont développées pour mimer le comportement d'épithélia enflammés (Moyes *et al.*, 2007; Tanoue *et al.*, 2008). Dans la littérature, on trouve également des modèles plus complexes alliant trois lignées cellulaires. Par exemple, le modèle alliant les lignées cellulaires Caco-2, HT29-MTX et Raji est intéressant pour étudier l'effet des NPs sur un modèle d'épithélium composé d'entérocytes, de cellules M et d'une couche de mucus. En effet, des études ont montré que les NPs sont principalement transloquées au niveau des cellules M des plaques de Peyer (Araújo *et al.*, 2015; Brun *et al.*, 2014; Schimpel *et al.*, 2014) et le modèle alliant des cellules épithéliales (Caco-2, HT29 ou T84) à des cellules dendritiques et des monocytes (Leonard *et al.*, 2010) est intéressant pour étudier l'effet des particules sur un épithélium déjà enflammé comme c'est le cas dans les MICI. Un second modèle d'épithélium enflammé est composé des cellules Caco-2 associées à des macrophages et des cellules dendritiques représentées par les lignées cellulaires THP1 et MUTZ-3. Il est plus facile à mettre en place qu'un modèle cellulaire utilisant des cellules primaires, il est notamment utilisé pour tester la toxicité des nanomatériaux (Susewind *et al.*, 2016). D'autres modèles cellulaires comportant des mutations pour les gènes tels que Nod2/Card15 permettent de mettre en évidence des mécanismes impliqués dans les réactions inflammatoires observées dans des modèles représentatifs de patients atteints de MICI (Hisamatsu *et al.*, 2003). Le microbiote est aussi largement étudié et des modèles *in vitro* sont aussi développés afin d'évaluer son rôle et ses interactions avec le bol alimentaire. De nouvelles études cherchent à inclure ces modèles de microbiote avec des cellules épithéliales pour étudier l'interaction hôte-microbiote ainsi que la perméabilité des épithélia (Venema and van den Abbeele, 2013). Une équipe luxembourgeoise a développé le modèle HuMiX, qui est une coculture de cellules Caco-2 et de bactéries humaines permise

grâce à de la micro-fluidique (Shah *et al.*, 2016). D'autre part, ces dernières années ont été marquées par la culture de cellules intestinales 3D. Par exemple, des modèles de cellules Caco-2 cultivées sous forme de sphéroïdes sont développés afin d'améliorer les études sur la perméabilité de l'épithélium intestinal (Lee *et al.*, n.d.). Il existe également des modèles de type « mini gut » obtenus à partir de cellules souches intestinales. Lorsque les cellules sont mises en culture en présence de différents facteurs de différenciations, elles forment des organoïdes dans lesquels les différents types cellulaires intestinaux sont représentés (Date and Sato, 2015). Par exemple, Audrey Ferrand (Inserm, CNRS) et ses collaborateurs travaillent sur l'étude de l'impact de l'activation fibroblastique sur l'initiation tumorale colorectale dans un modèle de crypte colorectale reconstituée en 3D (Projet ANR 2015). Le développement d'outils multi-compétences alliant micro fluidique, biomatériaux et techniques de cultures cellulaires 3D permettrait de palier les défauts des modèles cellulaires 2D afin d'obtenir des résultats précliniques plus fiables (Yu *et al.*, 2015b).

### *Partie III : Effets biologiques des particules de TiO<sub>2</sub> sur l'intestin, état de l'art*

Les NPs de TiO<sub>2</sub> sont souvent considérées comme étant plus réactives que des particules de plus grande taille, mais la taille n'est pas le seul paramètre physico-chimique qui peut influencer leur activité biologique. La majorité des études s'accordent pour dire que les micros et nanoparticules de TiO<sub>2</sub> n'induisent qu'une mortalité cellulaire modérée et à forte dose, *in vivo*, et *in vitro* sur différents modèles cellulaires. Néanmoins, d'autres effets comme l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de stress oxydant ou d'inflammation sont observés. Désormais, de plus en plus d'études s'intéressent à la toxicité des NPs de TiO<sub>2</sub> après leur ingestion, même si elles sont encore peu nombreuses à être menées avec le colorant alimentaire E171. Or les NPs de TiO<sub>2</sub> et le E171, même s'ils n'induisent pas de mortalité cellulaire, pourraient impacter la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, le rendant plus vulnérable aux agressions extérieures.

#### 1. Propriétés physico-chimiques et activité biologique des NPs

La petite taille des NPs leur confère une grande surface spécifique. Le TiO<sub>2</sub> « ultra fin » a une surface spécifique jusqu'à 20 fois supérieure à celle du TiO<sub>2</sub> « fin » augmentant ainsi leur réactivité (INRS, 2013). En effet, le rapport surface/volume augmente lorsque la taille des particules diminue (figure 23). Ces effets de surface ainsi que des effets quantiques (organisation des électrons de la matière) modifient les propriétés optiques, mécaniques, électroniques ou encore magnétiques des particules de la même matière.

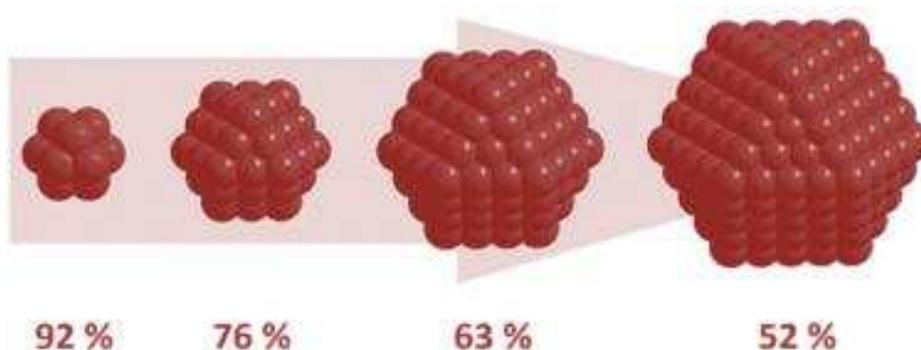


Figure 23 : Ratio surface/volume des particules en fonction de leur taille. Plus les particules sont petites et plus celui-ci est grand. Les chiffres indiquent le % d'atomes à la surface de la particule. D'après (Sonström and Bäumer, 2011).

Ainsi, à l'échelle nanométrique les propriétés de la matière sont modifiées. Du fait de ces propriétés différentes, les NPs peuvent engendrer des effets néfastes différents de ceux des particules micrométriques (cytotoxicité, stress oxydant, dysfonctionnements cellulaires) (Boisseau and Loubaton, 2011; Oberdörster *et al.*, 2005). Les caractéristiques physico-chimiques présentées dans la figure 24, i.e. la forme, la taille, la structure cristalline, la composition, la concentration, la fonctionnalisation de surface, l'état d'agglomération, etc. sont des facteurs déterminants de la réactivité des particules et notamment leur activité biologique (Saber *et al.*, 2012; Tedja *et al.*, 2012).

Pour des NPs qui seraient ingérées, le transfert à travers la couche de mucus et l'absorption par les cellules épithéliales de l'intestin est fonction principalement de leur taille, leur forme, leur état d'agglomération, leurs propriétés de surface qui déterminent la « couronne de molécules » qui se forme à leur surface. Ces paramètres physico-chimiques sont susceptibles d'être modifiés par l'environnement du tractus gastro intestinal pendant la digestion (Bellmann *et al.*, 2015). En particulier les NPs sensibles à l'acidité sont susceptibles de se dissoudre au contact du contenu gastrique. De plus, on sait que les NPs sont généralement agrégées ou agglomérées avec une taille allant de 0,1  $\mu\text{m}$  à quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ . Cet état dépend du procédé de fabrication des NPs, du milieu dans lequel elles se trouvent et de leurs propriétés de surface. A nouveau, l'état d'agrégation et d'agglomération sont susceptibles d'être modifiés lors du séjour des NPs dans les fluides gastro-intestinaux (Gerloff *et al.*, 2013).

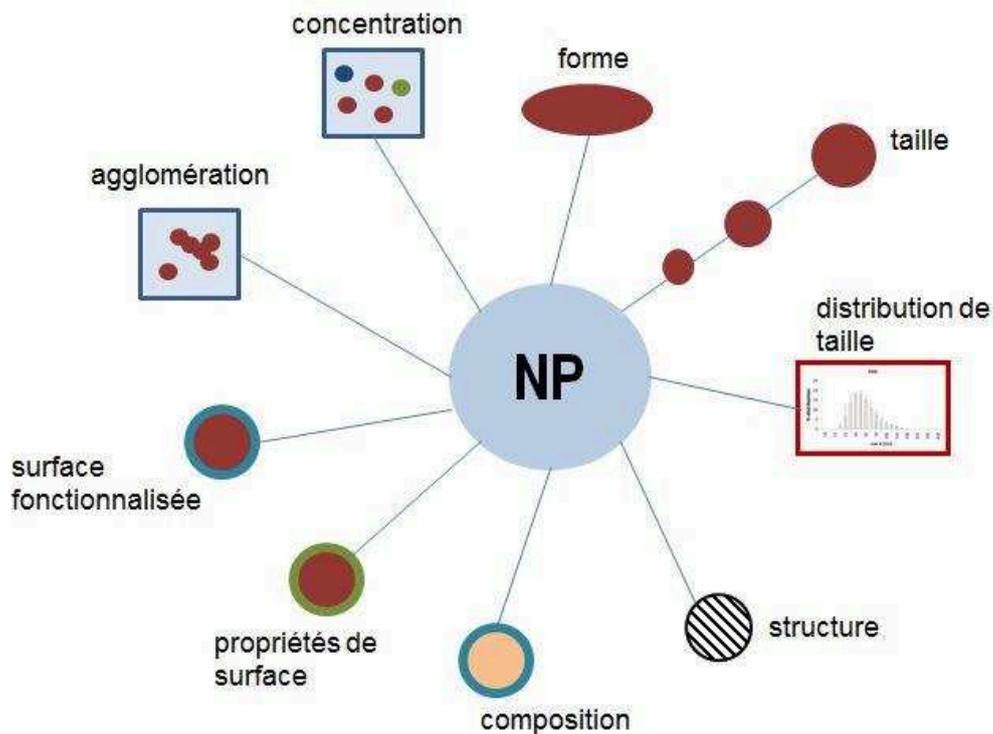


Figure 24 : Propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Plusieurs paramètres permettent de caractériser une NP, en particulier sa composition, sa structure, ses propriétés de surface, la fonctionnalisation de sa surface, son état d'agglomération, sa concentration en solution, sa forme, sa taille, sa distribution de taille en solution. D'après la thèse de (McCracken, 2015).

## 2. Impact biologique des NPs de TiO<sub>2</sub> après leur ingestion

Jusqu'à présent, peu d'études s'intéressaient aux effets de l'ingestion des NPs de TiO<sub>2</sub> car elle représentait un moindre risque par rapport à l'exposition par inhalation. Dans ce sens, des études *in vitro* ont montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> étaient plus facilement et plus rapidement internalisées dans le modèle de cellules pulmonaires A549 que dans le modèle intestinal Caco-2 (Janer *et al.*, 2014). Sur

des modèles pulmonaires, *in vivo* et *in vitro*, ces NPs induisent une mortalité cellulaire modérée, des effets génotoxiques, du stress oxydant et une inflammation (Johnston *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). En 2006 le CIRC a

d'ailleurs classé le TiO<sub>2</sub> dans la catégorie 2B, cancérigène possible pour l'homme, d'après des preuves suffisantes de la toxicité des particules inhalées chez l'animal (IARC, 2010). Depuis quelques années, compte tenu d'une plus grande prise de conscience du risque associé à l'ingestion de NPs via l'alimentation, les efforts se

focalisent également de plus en plus sur cette voie d'exposition.

Après l'exposition initiale via l'ingestion, l'absorption et la translocation des NPs vers le système sanguin ou lymphatique sont des étapes clés de leur potentielle toxicité. Ces deux systèmes peuvent alors distribuer les NPs à tous les organes secondaires. Des premières études ont donc évalué le passage systémique des NPs après ingestion et quelle était alors la forme physique (intacte ou dissoute, agrégée ou agglomérée) des particules. *In vivo*, la majorité des études ont montré qu'il n'y avait pas de passage des particules dans le sang ce qui limite leur distribution aux organes secondaires (Janer *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2015; MacNicoll, 2015). D'autres études se sont intéressées à la translocation des NPs au niveau des cellules intestinales ainsi qu'à leur localisation intracellulaire. *In vitro*, les NPs sont principalement accumulées dans les modèles cellulaires autres que les entérocytes, i.e. les modèles de cellules M ou sécrétant du mucus (Brun *et al.*, 2014). Bien que peu d'études aient rapporté une translocation systémique des NPs, certaines études s'intéressent à la toxicité des NPs sur les organes cibles secondaires comme le foie, la rate ou les reins (Filippi *et al.*, 2015; Pujalté *et al.*, 2015).

Des études sont également menées *in vitro* sur des cellules buccales, gastriques et intestinales. Ainsi, de manière générale et bien que la littérature soit parfois divergente, les particules de TiO<sub>2</sub> n'engendrent pas de mortalité cellulaire (Brun *et al.*, 2011) alors que l'inflammation, le stress oxydant et la génotoxicité sont les principaux mécanismes rapportés de la toxicité des NPs de TiO<sub>2</sub> sur des modèles intestinaux (McCracken *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011).

Plus indirectement, les NPs de TiO<sub>2</sub> peuvent être nocives lors de leur ingestion si elles facilitent l'absorption d'autres substances toxiques qui viendraient se fixer sur leur surface spécifique. Des études vont dans ce sens et ont montré que les NPs augmentent la perméabilité de l'épithélium intestinal pour d'autres substances chimiques nocives (Gitrowski *et al.*, 2014). Les NPs peuvent également augmenter la perméabilité des épithélia pour des macromolécules biologiques, comme le glucose, altérant les métabolismes cellulaires (Chen *et al.*, 2015a).

Enfin, certaines études s'accordent sur le fait que la toxicité des NPs ne s'arrête pas à leur translocation dans les cellules car les NPs peuvent aussi avoir des effets secondaires en interagissant avec d'autres paramètres de l'intestin comme le

microbiote ou le mucus, ou encore en induisant un dysfonctionnement du processus d'autophagie, qui permet à la cellule d'éliminer les organites cellulaires endommagés par des dégradations lysosomales (Boland *et al.*, 2014; Warheit *et al.*, 2015).

## 2.1 Généralités sur la toxicité cellulaire des NPs

La toxicité des NPs dépend du modèle cellulaire, du mode d'exposition, et des propriétés intrinsèques des NPs (Boland *et al.*, 2014). Les voies moléculaires activées par les NPs dépendent aussi de leurs caractéristiques chimiques (Hussain *et al.*, 2010). Les trois modes d'action principalement rapportés pour expliquer la toxicité des NPs sont représentés dans la figure 25. Le premier mécanisme est l'internalisation des NPs dans les cellules puis leur accumulation dans des lysosomes, entraînant leur déstabilisation et le relargage de leur contenu dans le cytoplasme (hydrolases, cathepsines, et autres enzymes). Elles peuvent alors entraîner un stress oxydant et finalement la mort cellulaire. L'induction du dysfonctionnement de la voie autophagique a également été rapportée (Stern *et al.*, 2012). Le deuxième mode d'action est la production de ROS extra ou intra cellulaire directement à la surface des NPs les plus réactives, ce qui peut altérer le métabolisme des mitochondries, induire une inflammation et la mort cellulaire (Boland *et al.*, 2014). Enfin, en interagissant avec des protéines cellulaires, elles peuvent impacter le métabolisme, la transmission de signaux cellulaires, la dynamique du cytosquelette, le cycle cellulaire ou encore l'expression des gènes (Boland *et al.*, 2014).

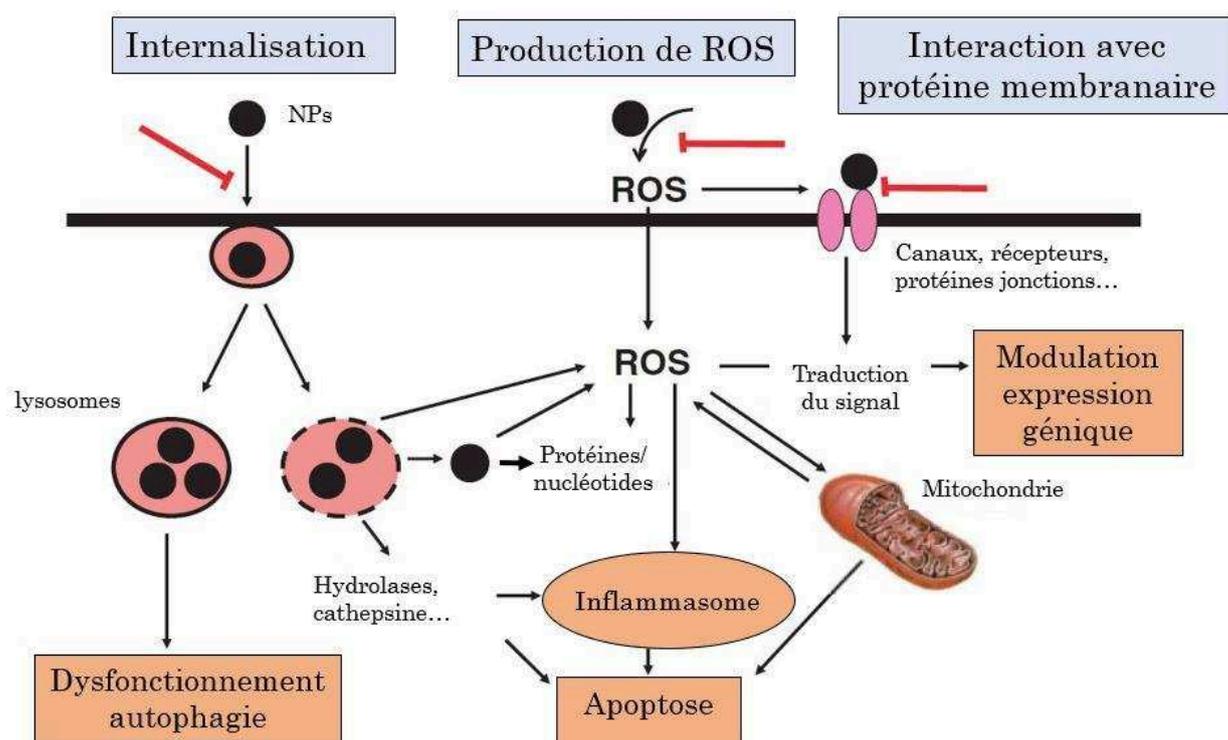


Figure 25 : Les trois principaux modes de toxicité des NPs dans la cellule. L'internalisation des NPs, la production de ROS et l'interaction avec les protéines membranaires sont les trois principaux modes d'actions rapportés pour expliquer la toxicité des NPs (Boland *et al.*, 2014).

## 2.2 TiO<sub>2</sub> et mortalité cellulaire

Différentes voies de mortalité cellulaire ont été décrites : la nécrose, caractérisée par le relargage de substances pro-inflammatoires et l'apoptose, une mort programmée et « propre » car elle n'engendre pas d'inflammation. Plus récemment ont été décrites des voies intermédiaires de mort cellulaire comme la pyroptose ou la pyronecrose (Berghe *et al.*, 2014).

Seules quatre études analysent les effets cytotoxiques engendrés par E171, dont une sur un modèle pulmonaire et une autre sur des cellules souches mésenchymateuses (moelle osseuse). Periasamy *et al.*, montrent des effets cytotoxiques pour les plus fortes doses, 200 et 400 µg/mL sur la lignée pulmonaire WI38, après 48 h d'exposition (Periasamy *et al.*, 2015). Athinarayanan *et al.*, rapportent une perte de viabilité de 30 % sur les cellules souches humaines mésenchymateuses (hMSC) après une exposition à 20 et 50 µg/mL pendant 24 h (Athinarayanan *et al.*, 2015). De même, Song *et al.*, ne mesurent pas de cytotoxicité

des particules de TiO<sub>2</sub> alimentaires anatases, i.e., E171, prédigérées ou non grâce à un fluide gastro-intestinal modèle, dans les cellules intestinales Caco-2, différenciées et non différenciées, même pour les plus fortes concentrations i.e. 200 µg/mL (Z.-M. Song *et al.*, 2015). Enfin, Chen *et al.*, ont montré que les particules de TiO<sub>2</sub> extraites de chewing-gum n'induisent pas de mortalité cellulaire dans les deux modèles cellulaires intestinaux Caco-2 et GES-1, exposés pendant 24 h jusqu'à 200 µg/mL de particules (Chen *et al.*, 2013).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur des NPs de TiO<sub>2</sub>, puisque la grande majorité des études ne rapporte pas de cytotoxicité de ces NPs sur des modèles cellulaires intestinaux et ce même sur des modèles 3D sains et enflammés (Susewind *et al.*, 2016). Sur le modèle Caco-2 différencié, des NPs de TiO<sub>2</sub> de structure cristalline mixte anatase/rutile, et de diamètre inférieur à 40 nm, n'entraînent pas de mortalité cellulaire, même à la plus forte concentration de 1000 µg/mL (Koeneman *et al.*, 2009), de même que les TiO<sub>2</sub> purement anatases ou rutilés avec des concentrations allant de 1 à 100 µg/mL. En effet, après 24 h d'exposition il n'y a pas de modification de l'activité métabolique mesurée par le test MTT dans une monoculture de cellules Caco-2 différenciées, exposée à des NPs de TiO<sub>2</sub> anatases de 12 nm de diamètre ou des NPs de TiO<sub>2</sub> rutilés de 20 nm de diamètre (Brun *et al.*, 2011). Le même type de réponse a été observé sur des cellules Caco-2 non différenciées, réputées plus sensibles (Dorier *et al.*, 2015). Aucune cytotoxicité n'est également observée sur des modèles plus complexes de cocultures HT29-MTX/Caco-2 et Caco-2/RajiB, exposés à 20-100 µg/mL de NPs de TiO<sub>2</sub> anatases de 12 nm de diamètre (MTT, bleu de trypan) (Brun *et al.*, 2014). Quelques études décrivent des diminutions de viabilité cellulaire, mais dans ces études les cellules sont exposées à des NPs préparées dans du milieu de culture ne contenant pas de sérum et à forte dose. En effet la présence de sérum conduit à la mise en place d'une épaisse couronne de molécules à la surface des NPs (principalement des protéines). L'interaction NPs-couronne de molécules modifie les propriétés de surface des NPs, et modifie notamment son interaction et son accumulation dans les cellules et donc sa toxicité (Lesniak *et al.*, 2012; Monopoli *et al.*, 2012; Tenzer *et al.*, 2013). C'est le cas d'une étude qui a montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> de structure mixte anatase/rutile induisent davantage de mortalité cellulaire que les NPs

anatase pures dans les cellules Caco-2 non différenciées. Dans ces conditions, la structure cristalline et la surface spécifiques des NPs sont deux propriétés qui conditionnent leur cytotoxicité (Gerloff *et al.*, 2012, 2009).

### 2.3 TiO<sub>2</sub> et translocation, biodistribution vers d'autres organes

La plupart des cellules eucaryotes utilisent différents mécanismes d'endocytose pour communiquer avec leur environnement et transporter des macromolécules et des particules (bactériennes, virales, particules et NPs minérales) vers l'intérieur de la cellule. Les entérocytes de l'épithélium intestinal utilisent ces mécanismes principalement pour l'absorption des nutriments et des agents pharmaceutiques tout en assurant l'imperméabilité aux micro-organismes. Il existe plusieurs voies d'endocytoses (figure 26). La voie des protéines clathrines et cavéoles utilise des récepteurs spécifiques pour le mécanisme d'endocytose. La phagocytose est un mécanisme dépendant de l'actine qui concerne certaines cellules spécialisées comme les macrophages et les cellules dendritiques afin d'internaliser des particules de 500 nm ou plus. La macropinocytose permet d'internaliser de façon non spécifique des fluides et des particules dans des vésicules de grande taille, dont le diamètre atteint 0,2 à 5 µm. De la même manière, la pinocytose permet d'internaliser de manière non spécifique des fluides et des particules dans des vésicules de 100 nm de diamètre au maximum (Oh and Park, 2014). L'exocytose est le mécanisme qui permet ensuite d'expulser les composés des cellules.

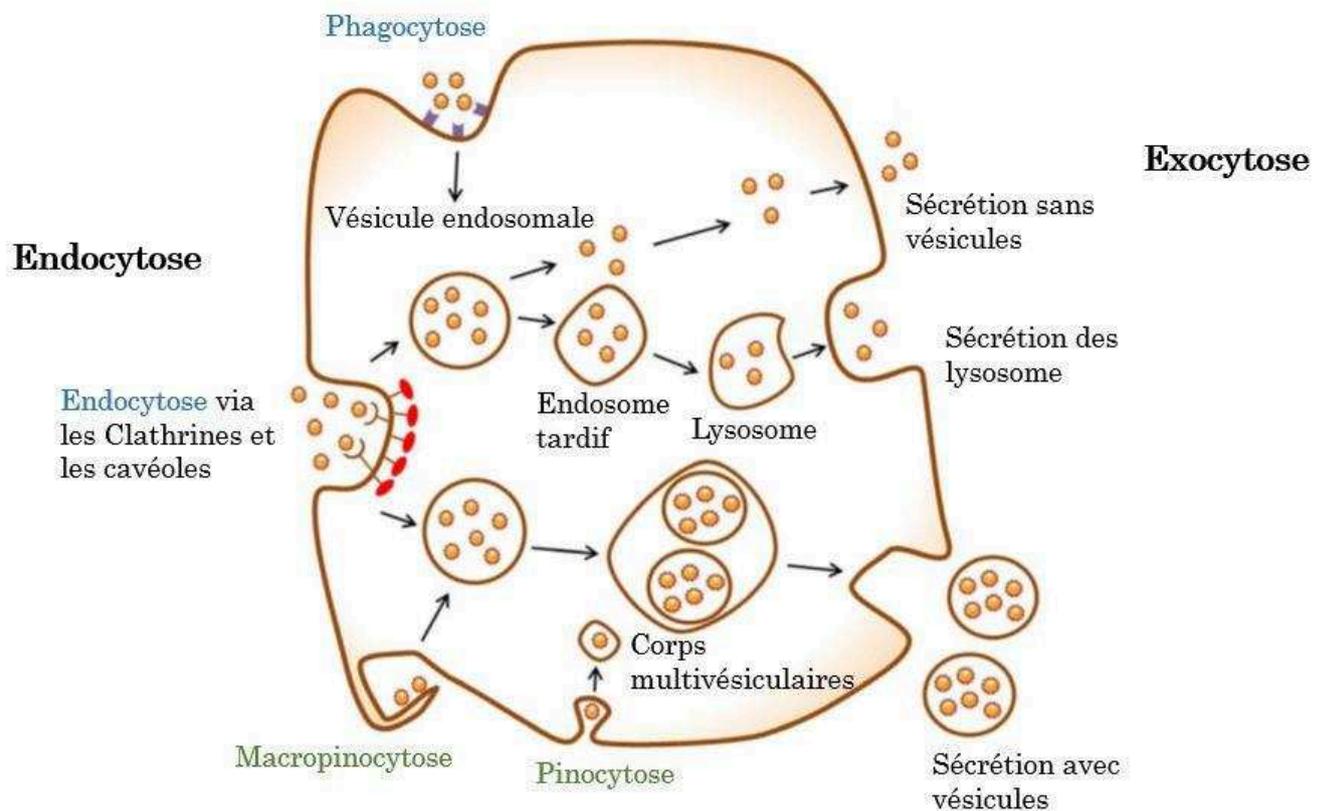


Figure 26 : Endocytose et exocytose dans la cellule eucaryote. Plusieurs voies d'endocytoses existent : deux voies spécifiques, ici en bleu, et deux voies non spécifiques, en vert (Oh and Park, 2014).

Les particules et NPs peuvent être internalisées dans les cellules suivant ces différentes voies d'endocytoses en fonction de leur taille, leur forme et leur chimie de surface (Oh and Park, 2014). Lorsque les particules traversent la cellule depuis la lumière intestinale jusqu'à la lamina propria sans être modifiées, on parle de transcytose (Zimmer *et al.*, 2016). De plus, il est possible que certaines NPs et microparticules se retrouvent dans la lamina propria suite à leur passage par la voie paracellulaire, entre les cellules, du fait de l'ouverture des jonctions cellulaires. D'ordinaire ces jonctions cellulaires maintiennent l'imperméabilité de l'épithélium mais suite à des signaux métaboliques ou dans certaines maladies elles peuvent être endommagées (Moyes *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2010).

Les résultats des études s'intéressant à l'absorption des NPs de TiO<sub>2</sub> à travers les cellules intestinales et leur translocation systémique sont contradictoires. Chez l'homme, après ingestion par des volontaires sains, des particules ayant des propriétés proches de celles du E171 sont absorbées puis détectées au niveau

systémique. Les résultats d'analyses sanguines suggèrent deux mécanismes d'absorption pour ces particules : à travers les cellules M des plaques de Peyer et à travers les cellules de épithéliales intestinales (Pele *et al.*, 2015). De plus, cette étude montre que le TiO<sub>2</sub> est absorbé sous forme particulaire et non sous forme d'ions, donc il ne s'est pas dissout (Pele *et al.*, 2015). Des analyses de spectroscopie d'absorption des rayons X ont montré qu'il n'y avait pas de dissolution des NPs de TiO<sub>2</sub> une fois internalisées dans des cellules Caco-2 différenciées (Brun *et al.*, 2014). Mais cette absorption systémique n'est pas toujours observée, les NPs mises en contact de fluides gastriques reconstitués ont tendance à s'agglomérer et ne sont pas absorbées, et l'hypothèse émise par les auteurs est que l'agglomération limite la part nanoparticulaire arrivant au contact de l'intestin comme cela est suggéré dans l'étude de Jones *et al.*, (Jones *et al.*, 2015). Chez le rat, une étude de 1994 a montré par analyse histologie, microscopique et ICP-MS que les NPs de TiO<sub>2</sub> pouvaient transloquer dans les tissus lymphoïdes puis au niveau systémique jusqu'à des organes secondaires, le foie et la rate notamment (Jani *et al.*, 1994). Au contraire, des faibles niveaux d'absorption et une absence de translocation a été observé plus récemment par ICP-MS et microscopie, excepté dans une zone contenant des plaques de Peyer (Janer *et al.*, 2014). Entre ces deux études la taille et la structure cristalline des particules sont différentes : 500 nm, rutile, dans la première étude et 18 nm, anatases dans la deuxième. Chez le rat toujours, une autre étude n'a pas observé de différence de contenu en titane dans le sang ou les urines d'animaux exposés aux NPs de TiO<sub>2</sub>, ce qui suggère l'absence de translocation des NPs de TiO<sub>2</sub> (MacNicoll, 2015). De même, des observations cliniques de pathologies neurocomportementales et d'hématologie ont montré qu'après une exposition aigüe ou chronique aux NPs de TiO<sub>2</sub> (protocoles de l'organisation de coopération et de développement économique OECD), la plupart des particules sont éliminés dans les fèces des animaux, confirmant la faible absorption intestinale. Une étude sur des souris a montré, à des doses élevées, la translocation de NPs de 25 et 80 nm de diamètre avec une distribution systémique vers d'autres organes, la rate, les reins, les poumons notamment, même si leur absorption, mesurée par ICP-MS, reste très faible (Wang *et al.*, 2007).

Lorsque l'absorption est avérée, *in vivo*, les particules de TiO<sub>2</sub> sont majoritairement internalisées par les cellules M (Jani *et al.*, 1994). Une étude *in vivo* et *ex vivo* a montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> de structure anatase (12 nm) traversent l'épithélium intestinal et pas seulement au niveau des plaques de Peyer car elles altèrent aussi la perméabilité paracellulaire. Cependant ce passage est faible car il n'a pas été possible de le quantifier par ICP-MS (Brun *et al.*, 2014). Cette étude a également montré, *in vitro*, que les NPs peuvent altérer la perméabilité paracellulaire des épithélia en modulant les jonctions serrées (Brun *et al.*, 2014).

*In vitro*, il n'a pas été mesuré de translocation des NPs de TiO<sub>2</sub> à travers le modèle Caco-2 (Jones *et al.*, 2015). De même, il n'y a pas de translocation à travers le modèle de cellules M alors que l'accumulation de TiO<sub>2</sub> est mesurée par ICP-MS dans la fraction cellulaire (MacNicoll, 2015). Janer *et al.*, ont montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> s'accumulaient majoritairement dans les modèles de cellules M et de cellules caliciformes et qu'elles étaient également faiblement absorbées dans le modèle Caco-2 différencié (Janer *et al.*, 2014). Dans des cellules HT29-MTX, la taille des régions riches en titane suggère qu'elles ont été internalisées par la voie de macropinocytose (Brun *et al.*, 2014). Les voies de pinocytose et macropinocytose semblent privilégiées pour la translocation des microparticules et NPs, à travers les cellules de l'épithélium intestinal. Cependant la voie d'endocytose via des récepteurs spécifiques n'est pas exclue, elle pourrait jouer un rôle important selon la couronne moléculaire des NPs. En effet, une étude sur le modèle Caco-2 a montré que l'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub> induisait leur incorporation dans les cellules via de l'endocytose. Cette incorporation est dépendante de la structure cristalline des particules (anatase plus rapide que rutile) et induit un changement des niveaux de Ca<sup>2+</sup> (Gitrowski *et al.*, 2014). Le transport de particules (200-500 nm) est 1000 fois plus important dans des épithélia contenant des cellules M, spécialistes de la transcytose (Rieux *et al.*, 2005), alors que l'endocytose de particules plus grosses ne semble plus possible dans les entérocytes différenciées car les microvillosités bloquent les particules (Hansen *et al.*, 2009).

Une fois internalisées, les NPs sont majoritairement stockées dans des vésicules que l'on suppose être des lysosomes. L'augmentation de la perméabilité des

membranes lysosomales peut altérer le processus d'autophagie ou au contraire le bloquer via des mécanismes impliquant le stress oxydant par altération des mitochondries ou du réticulum endoplasmique (Stern *et al.*, 2012).

#### 2.4 TiO<sub>2</sub> et stress oxydant

Les ROS sont produites en continu par les cellules lors de la respiration aérobie. Ces ROS sont à la fois bénéfiques lorsqu'elles interviennent comme messagères dans certains processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation ou encore l'autophagie, et néfastes si elles sont produites en excès (Davies, 1995; Sauer *et al.*, 2001; Scherz-Shouval and Elazar, 2011). Dans les cellules, le fonctionnement normal des mitochondries et du réticulum endoplasmique génère des ROS. Ainsi la chaîne respiratoire mitochondriale produit des ROS, notamment, l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Le réticulum endoplasmique est impliqué dans la biosynthèse de lipides et protéines, il participe à la détoxification de ces molécules via des enzymes pouvant produire O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et le transformer en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Thannickal and Fanburg 2000). La cellule possède une batterie de systèmes permettant la prise en charge de ROS en excès, afin de conserver l'équilibre redox (figure 27). Un déséquilibre prolongé de cette balance oxydative est appelé stress oxydant, et est lui-même une forme de toxicité cellulaire. En effet, si ces ROS ne sont pas prises en charge, elles peuvent s'attaquer aux biomolécules constituant les membranes et impliquées dans différentes voies de signalisation. Le stress oxydant peut avoir des effets directs sur les macromolécules biologiques (ADN, ARN, lipides, protéines) par oxydation, nitration ou encore halogénéation (Reuter *et al.*, 2010). La modification de certains acides aminés peut altérer la structure, l'activité et l'interaction des protéines avec des substrats ou des cofacteurs (Thannickal and Fanburg 2000). Le stress oxydant peut aussi activer une variété de facteurs de transcription comme NF-κB, AP-1, p53, β-catenin/Wnt ou Nrf2 régulant l'expression de gènes eux-mêmes impliqués dans divers métabolismes cellulaires (Reuter *et al.*, 2010). De nombreuses études s'intéressent aux ROS car elles sont impliquées dans diverses maladies : diabète, neurodégénérescence, maladies cardiaque, cancers, etc. Mais au contraire leurs effets néfastes participent au succès de thérapies anticancéreuses.

Les effets toxiques des ROS dépendent de leur concentration mais aussi de leur site de production. Une forte production de  $H_2O_2$  exogène, c'est-à-dire ne provenant pas de métabolismes cellulaires, entraîne des dommages à l'ADN et la mort cellulaire alors que si cette production est plus faible, elle entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M qui permet la réparation. Au contraire,  $H_2O_2$  généré par la mitochondrie ne modifie pas la viabilité cellulaire mais peut entraîner l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S et la sénescence des cellules (Panieri *et al.*, 2013).

Certaines cytokines ( $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-1...$ ) et des facteurs de croissance (PDGF, EGF), en se liant à des récepteurs membranaires, peuvent générer des ROS dans certaines cellules non phagocytaires (Thannickal and Fanburg 2000). Certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que l' $IFN-\gamma$ , le  $TNF-\alpha$  et l' $IL-1$ , induisent la formation de monoxyde d'azote (NO), une autre ROS produite par les NO synthases (NOS) à partir de la L-arginine (Reuter *et al.*, 2010).

Certains nanomatériaux, de par leur grande surface réactive sont capables de générer des ROS à leur surface (Li *et al.*, 2014). D'autre part, les NPs et en particulier les NPs de  $TiO_2$ , peuvent engendrer un stress oxydant en produisant ou véhiculant des ROS à leur surface ou en inhibant les systèmes antioxydants cellulaires, ayant pour conséquence la non élimination des ROS endogènes. Lors de la photoactivation du  $TiO_2$  plusieurs ROS sont libérées. L'intensité lumineuse et le pH de la solution dans laquelle ces NPs sont mises en suspension peuvent influencer la production de ces ROS, de même que la structure cristalline des NPs. En effet, la forme anatase est plus photo-réactive que la forme rutile (Luttrell *et al.*, 2014). De même, les NPs sont plus réactives que les particules de plus grande taille de même composition chimique (Li *et al.*, 2014). Les ROS générées au niveau des particules lors de leur photoactivation sont libérées et peuvent circuler dans la cellule. Le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) est rapidement transformé en  $O_2^{\bullet-}$ , puis  $H_2O_2$ , qui peut alors circuler jusqu'au noyau. En présence d'ions  $Cu^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$ , la réaction de Fenton produit  $OH^\bullet$  qui est susceptible d'induire les dommages à l'ADN. Les NPs peuvent aussi réagir avec des ions métalliques intracellulaires qu'ils réduisent pour former des radicaux peroxy ( $ROO^\bullet$ ), pouvant induire des dommages cellulaires. La structure rutile favorise la production d' $OH^\bullet$  alors que l'anatase

favorise la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de  $\text{ROO}^\bullet$ . Ces différences peuvent expliquer leur différence de toxicité (Petersen and Nelson, 2010).

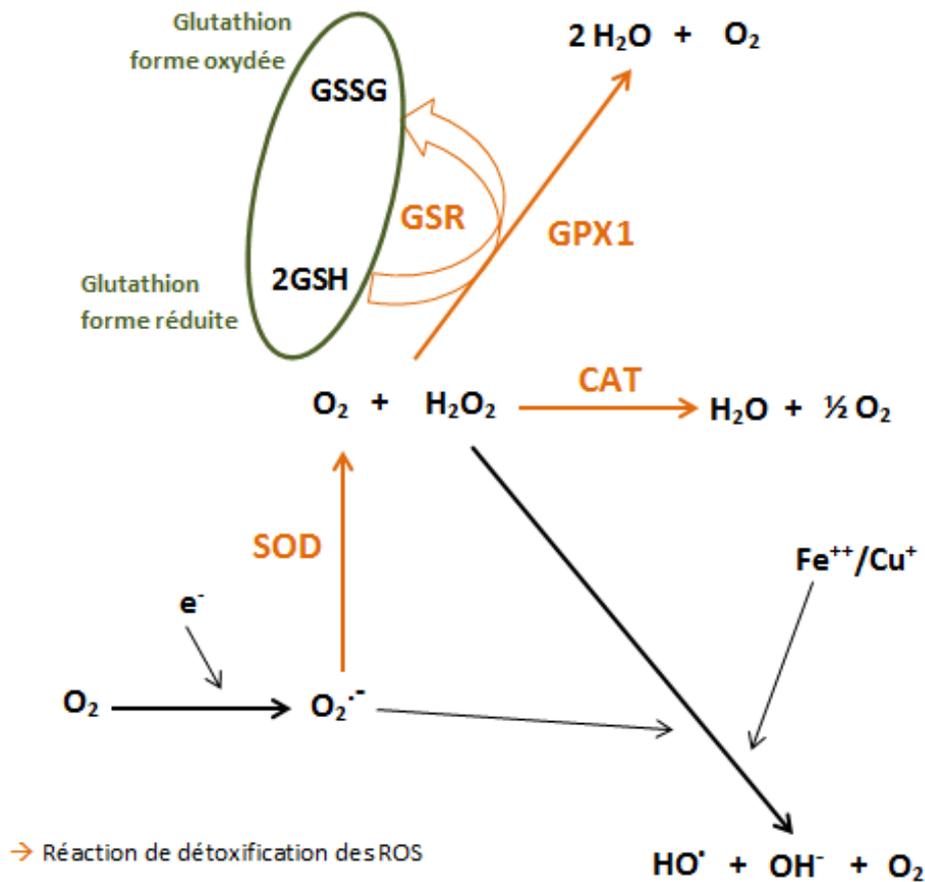


Figure 27 : Système enzymatique de régulation des ROS. Dans les cellules, des enzymes prennent en charge ces ROS pour rétablir l'équilibre oxydatif. La superoxyde dismutase (SOD) transforme  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et en dioxygène ( $\text{O}_2$ ).  $\text{H}_2\text{O}_2$  est moins réactif qu' $\text{O}_2^{\bullet-}$  mais il peut diffuser à travers la mitochondrie et la cellule jusqu'à la membrane cellulaire.  $\text{H}_2\text{O}_2$  est ensuite transformé en eau soit par la catalase (CAT) soit par la glutathion peroxydase (GPX1). Le mécanisme de cette dernière réaction implique le tripeptide glutathion et l'enzyme glutathion reductase qui interviennent dans le maintien du potentiel redox de la cellule grâce à sa forme réduite (GSH) et sa forme oxydée (GSSG). Le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  sont des ions métalliques impliqués dans l'homéostasie des ROS (Thannickal and Fanburg 2000).  $\text{OH}^\bullet$  et  $\text{OH}^\ominus$  sont d'autres produits de la transformation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ils sont susceptibles d'induire des dommages à l'ADN et sont impliqués dans des processus de cancérogenèse.

Les NPs de  $\text{TiO}_2$  peuvent aussi inhiber les systèmes antioxydants de la cellule, comme c'est le cas sur les cellules pulmonaires A549, où une étude rapporte la production accrue de ROS dans les cellules exposées, qui s'accompagne d'une diminution de l'activité d'enzymes antioxydantes comme la catalase ainsi que de la baisse des réserves cellulaires de glutathion réduit (GSH) (Srivastava *et al.*,

2013). De nombreuses études rapportent également que les NPs de TiO<sub>2</sub> induisent une modulation de l'expression de gènes et de protéines impliqués dans l'équilibre redox de la cellule, et ce, dans divers modèles d'exposition (McCracken *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). Plusieurs études en particulier relèvent un impact sur la voie de signalisation contrôlée par NRF2, un important régulateur de la réponse cellulaire antioxydante (Shelton and Jaiswal, 2013; Shi *et al.*, 2013)

*In vivo*, une étude a montré que même sans exposition à la lumière, le TiO<sub>2</sub> altère l'expression des gènes codant les enzymes de détoxification des ROS et entraîne la formation de ROS ainsi que la peroxydation de lipides, protéines et ADN dans le poumon de la souris (Li *et al.*, 2013). Cette étude montre aussi que même sans UV, les NPs de TiO<sub>2</sub> induisent une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN.

*In vitro*, le traitement de cellules Caco-2 avec des particules de TiO<sub>2</sub> de 20-60 nm induit une accumulation de ROS et une diminution de la croissance cellulaire mais n'induit pas de mortalité cellulaire jusqu'à 20 µg/cm<sup>2</sup> (De Angelis *et al.*, 2012). De même, une autre étude a montré sur le modèle Caco-2 que les NPs de TiO<sub>2</sub> induisent une accumulation de ROS, mais aucun dommage à l'ADN n'est détecté. Cette absence de dommages s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'OGG1, enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN. Ceci suggère que les dommages ont été réparés (Zijno *et al.*, 2015). Dans une autre étude sur des cellules de poisson, les auteurs montrent que le TiO<sub>2</sub> induit l'augmentation des sites Fpg-sensibles dans l'ADN (i.e. principalement la lésion 8-oxo-dG), via la production de OH<sup>•</sup> (Reeves *et al.*, 2008).

La grande réactivité des ROS ainsi que leur courte durée de vie rend difficile leur mesure dans les systèmes biologiques. De manière indirecte, le composé H<sub>2</sub>DCF-DA permet de mesurer la quantité de ROS intracellulaire. Le composé entre dans les cellules et y reste bloqué après avoir été transformé en composé fluorescent par une estérase cellulaire en présence de ROS (Thannickal and Fanburg, 2000).

## 2.5 TiO<sub>2</sub> et stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cellulaire qui a pour fonction la modification post-traductionnelle et le repliement des protéines membranaires et sécrétées. Il intervient aussi dans d'autres activités cellulaires comme la synthèse

de lipides, la glycosylation ou le stockage du calcium. Dans divers cas de stress cellulaire tel que l'accumulation de protéines non repliées, le déséquilibre de la balance oxydative, l'hyperglycémie, des infections virales etc., le fonctionnement du RE est altéré, entraînant la réponse dite UPR (Unfolded Protein Response). Cette réponse consiste à activer la transcription de gènes impliqués dans la voie sécrétrice des protéines afin de la rendre plus performante, ou à réprimer la synthèse protéique afin de limiter l'arrivée de nouvelles protéines dans le RE (Garlatti and Barouki, 2002). Cette réponse a pour but de restaurer l'homéostasie du RE. En cas d'échec, la cellule entre en apoptose. La réponse UPR est déclenchée par l'intermédiaire de protéines transmembranaires « senseurs » (IRE1 $\alpha$  ; ATF6 ; PERK) qui engagent une cascade de signalisation via des protéines kinases régulées par une protéine chaperonne (GRP78). Ces kinases contrôlent notamment d'autres facteurs de transcription (ATF6, sXBP1) impliqués dans la réponse UPR (Chaudhari *et al.*, 2014; Chen and Brandizzi, 2013). CHOP, un autre facteur de transcription est quant à lui impliqué dans le déclenchement de l'apoptose en cas d'échec de la restauration de l'homéostasie du RE (Chaudhari *et al.*, 2014; Zhang and Kaufman, 2008). Les acteurs de la voie UPR sont présentés dans la figure 28.

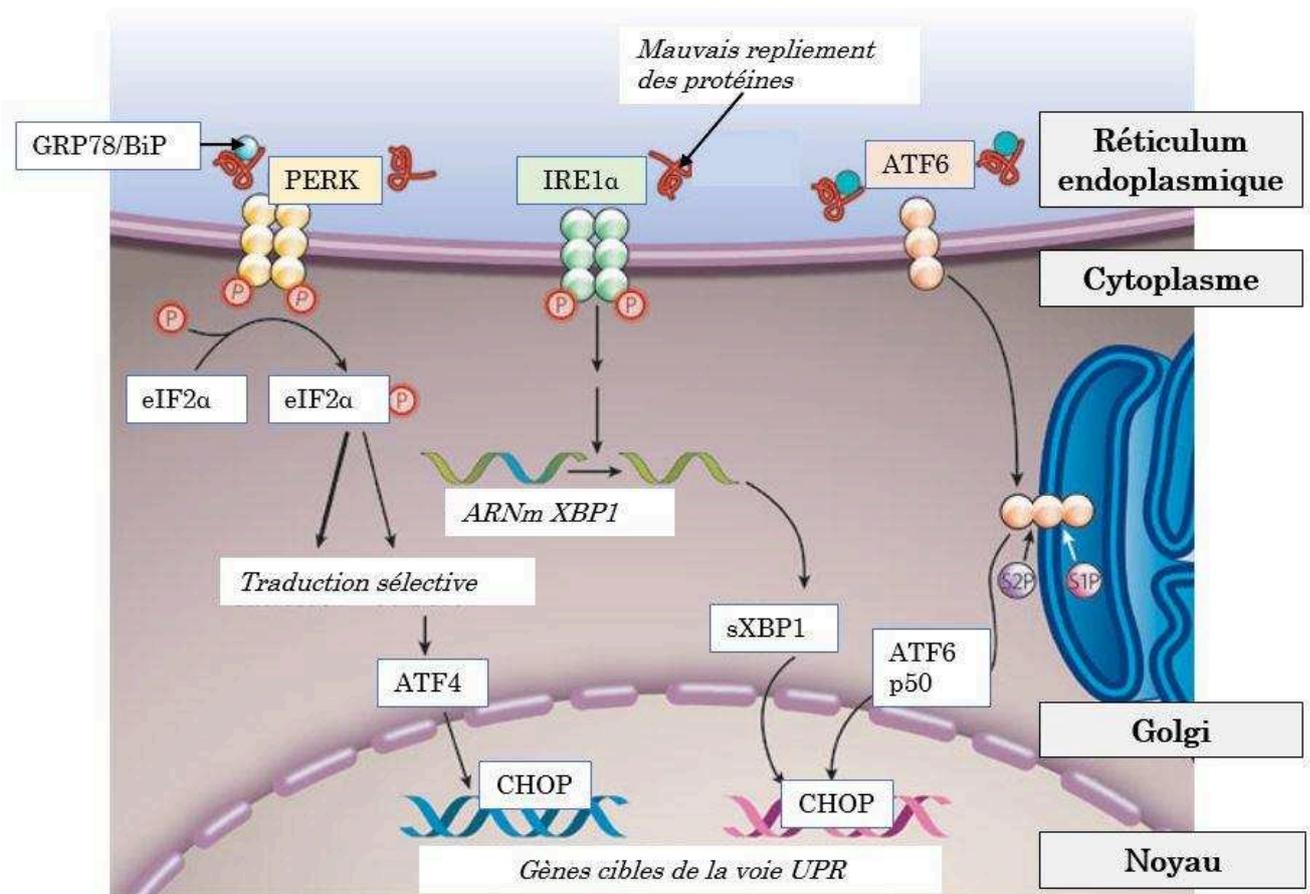


Figure 28 : Activation de la voie UPR suite à un stress du RE. Suite à l'accumulation de protéines à la conformation anormale, les trois protéines « senseur » PERK, IRE1 $\alpha$  et ATF6 initient la cascade de signalisation conduisant à la transcription de gènes impliqués dans la voie UPR afin de réguler l'homéostasie du RE (Zhang and Kaufman, 2008).

Le stress du RE peut être utilisé comme biomarqueur précoce des effets toxiques des xénobiotiques. Un lien entre stress du RE et toxicité des NPs a été établi ces dernières années. Il s'avère être un biomarqueur sensible pour évaluer la toxicité des NPs de ZnO sur des cellules endothéliales humaines (HUVEC), d'après les résultats qui ont été obtenus par analyse de l'expression des gènes et du contenu en protéines des différents acteurs de la voie UPR, entre autres de sXBP-1, CHOP, BIP, GPERK (R. Chen *et al.*, 2014).

*In vitro*, des NPs d'argent induisent l'apoptose de cellules hépatiques humaines, et de cellules pulmonaires de hamster via un stress du RE (Zhang *et al.*, 2012). Des NPs de TiO<sub>2</sub> induisent un stress du RE dans des cellules bronchiales (Yu *et al.*,

2015a) et des hépatocytes humains (Christen *et al.*, 2014). *In vivo*, l'inhalation de TiO<sub>2</sub> induit un stress du RE chez la souris (Yu *et al.*, 2015b).

Le lien entre stress du RE et toxicité des NPs n'a à ce jour pas été établi sur des modèles intestinaux. Or, dans ce contexte il pourrait faire le lien entre NPs et MICI. En effet, des études récentes ont montré que la réponse UPR pouvait initier une réponse inflammatoire car ces deux voies semblent interconnectées suivant divers mécanismes dont la production de ROS, la libération de Ca<sup>2+</sup>, l'activation du facteur de transcription NF-κB ou encore l'activation de la protéine MAP kinase (MAPK) (Garg *et al.*, 2012; McGuckin *et al.*, 2010; Zhang and Kaufman, 2008).

Chez l'homme, des études génomiques semblent confirmer le lien entre la voie UPR et l'inflammation intestinale car le locus du gène codant XBP1 est l'un des gènes potentiellement muté dans le cas des MICI (Limbergen *et al.*, 2009). Chez l'animal, plusieurs études ont montré que le stress du RE joue un rôle clé dans certaines maladies dont les MICI (Heazlewood *et al.*, 2008; Kaser *et al.*, 2008). L'inflammation de l'intestin semble connectée à la voie UPR par la protéine transmembranaire IRE1 et le facteur de transcription XBP1. En effet, la délétion du gène IRE1 entraîne une augmentation du contenu en protéines associées au stress du RE ainsi qu'une sensibilisation de l'épithélium à l'inflammation. De plus, des souris déficientes en XBP1 développent spontanément des inflammations intestinales caractéristiques des MICI (Bertolotti *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007).

## 2.6 TiO<sub>2</sub> et dommages à l'ADN

L'ADN est la molécule porteuse de l'information génétique présente dans toutes les cellules des organismes. Chez l'homme 99 % de l'ADN se trouve dans le noyau des cellules (Kazak *et al.*, 2012). Cette macromolécule (quelques nanomètres) est constituée de deux brins qui sont des chaînes de nucléotides (figure 29).

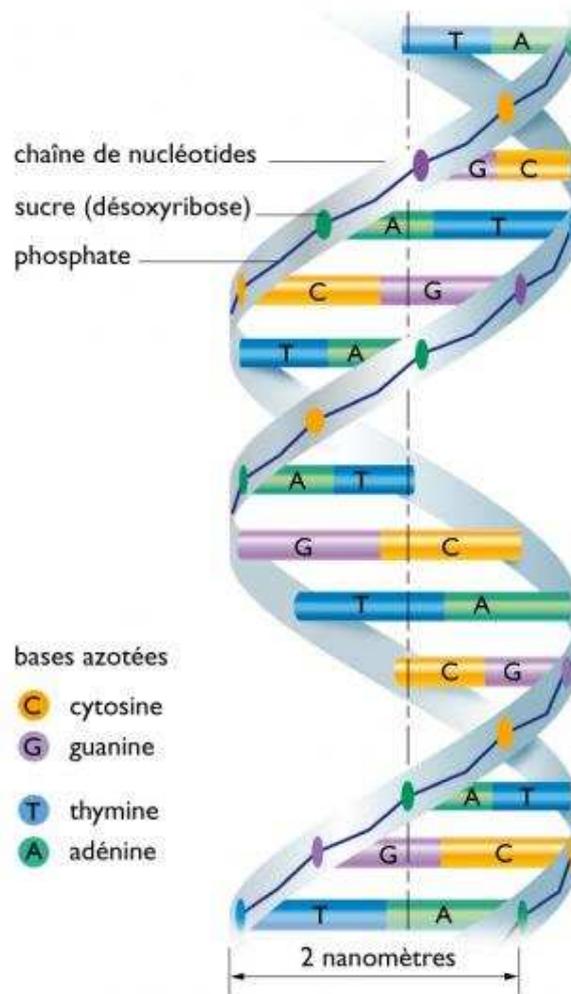


Figure 29 : Structure de la double hélice d'ADN. Les deux brins sont des chaînes de nucléotides avec une armature constituée d'un sucre (désoxyribose), de groupements phosphates et de nucléotides (cytosine, guanine, thymine, adénine). Les deux brins sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes entre les nucléotides, d'après le Larousse<sup>26</sup>.

Ces brins sont reliés par des liaisons hydrogène et forment une double hélice (Watson and Crick, 1953). Elle possède une instabilité intrinsèque (Lindahl, 1993) et subit chaque jour un très grand nombre d'agressions provenant de sources endogènes ou exogènes à la cellule. La principale source endogène de lésions à l'ADN est le stress oxydant. Les ROS causent notamment des petites lésions de l'ADN qui vont peu modifier la structure de la double hélice (Cadet *et al.*, 1999). Ces lésions peuvent être des cassures simple brin, des pontages ADN-protéines, des modifications (oxydation, déamination) ou des pertes de bases (formation de

<sup>26</sup> <http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/ADN/1001372>

sites abasiques). La 8-oxoguanine (8-oxoG), bien décrite dans la littérature (Teoule *et al.*, 1977), est une lésion oxydative utilisée comme marqueur du stress oxydant, notamment lorsqu'il est induit par les NPs (Magdolenova *et al.*, 2013). Les NPs sont parmi les sources exogènes d'agressions à l'ADN, au même titre que les rayonnements ultraviolets, les rayonnements ionisants, la fumée de cigarette ou les traitements de chimiothérapie.

Les NPs peuvent induire des dommages à l'ADN des cellules et ainsi compromettre leur intégrité physique et fonctionnelle. En fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, les NPs exercent une génotoxicité primaire (directe ou indirecte) ou secondaire (Magdolenova *et al.*, 2013; Petersen and Nelson, 2010). On parle de génotoxicité primaire directe lorsque les NPs interagissent directement avec l'ADN cellulaire, et primaire indirecte lorsque les dommages à l'ADN sont causés indirectement, par exemple suite à la production de ROS à la surface des NPs, à la libération d'ions toxiques par les NPs solubles ou lorsque la réparation de l'ADN est inhibée par les NPs. On parle de génotoxicité secondaire lorsqu'elle fait suite à une inflammation, via des composés oxydants provenant notamment de l'endocytose et/ou phagocytose des NPs (Magdolenova *et al.*, 2013; Tossa *et al.*, 2014).

D'autres mécanismes possibles qui pourraient causer une génotoxicité primaire indirecte sont une interaction ou un impact des NPs sur des protéines nucléaires, sur le fuseau mitotique ou sur le contrôle du cycle cellulaire, entraînant alors des mutations génétiques (Magdolenova *et al.*, 2013).

Concernant la génotoxicité du TiO<sub>2</sub>, les études sont contradictoires car sur tous modèles d'exposition confondus, le nombre d'études rapportant de la génotoxicité est environ équivalent à celui n'en rapportant pas (T. Chen *et al.*, 2014; Magdolenova *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013).

Lorsque des effets génotoxiques sont observés, l'induction de stress oxydant par les NPs de TiO<sub>2</sub> est le premier mécanisme invoqué pour expliquer ces effets. De plus, de par leurs propriétés photo-catalytiques, les NPs de TiO<sub>2</sub> semblent pouvoir induire des dommages oxydatifs à l'ADN, à la fois avec et sans exposition aux UV (Gurr *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2011; Magdolenova *et al.*, 2013).

Sur des modèles intestinaux, *in vitro*, l'exposition pendant 6 h de cellules Caco-2 non différenciées à des NPs de TiO<sub>2</sub> (anatase, 20-60 nm), entraîne l'augmentation des niveaux de 8-oxodG intracellulaire mais n'entraîne ni dommages à l'ADN, ni micronoyaux. De plus, les niveaux en 8-oxodG diminuent au cours du temps alors que l'expression de la glycosylase OGG1, impliquée dans la réparation de l'ADN, augmente. Cela semble montrer que les lésions à l'ADN sont bien réparées par les cellules (Zijno *et al.*, 2015). Une autre étude sur le modèle Caco-2 a montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> de structure mixte rutile/anatase induisent des dommages à l'ADN à la dose de 20 µg/cm<sup>2</sup>, contrairement aux NPs purement anatases (Gerloff *et al.*, 2012). *In vivo*, l'administration orale de NPs de TiO<sub>2</sub> P25 pendant 5 jours chez la souris induit l'augmentation de cassures double brins dans les cellules sanguines et des dommages de type oxydatif à l'ADN dans le foie des animaux (Trouiller *et al.*, 2009).

Cependant, les cellules possèdent la machinerie pour réparer l'ADN endommagé, afin de maintenir la stabilité de leur génome. Pour cela, cinq grandes voies de réparation de l'ADN sont disponibles. Les petits dommages peu volumineux sont pris en charge par le système de réparation par excision de base (BER), les lésions plus complexes et volumineuses sont prises en charges par le système de réparation par excision de nucléotides (NER) et les cassures double brins sont prises en charge par la recombinaison homologue (HR) ou non-homologue (NHEJ). Enfin, les mésappariements de bases sont pris en charge par un système de réparation spécifique, le MMR. Ces voies de réparation sont interconnectées (Christmann *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2013). Si les lésions à l'ADN ne sont pas réparées et s'accumulent alors cela peut conduire à l'apparition de mutations. Si celles-ci s'accumulent, alors les cellules entrent en apoptose. Mais si l'entrée en apoptose n'est pas induite, alors l'accumulation de mutations peut conduire à l'apparition de tumeurs. Les NPs de TiO<sub>2</sub> peuvent également interagir avec le système de réparation de la cellule et induire une génotoxicité primaire indirecte, c'est ce que notre équipe a rapporté il y a quelques années dans une étude sur le modèle pulmonaire A549, exposé à un panel de NPs de TiO<sub>2</sub> de différentes taille, forme et structure cristalline. En effet, nous avons observé une diminution des

capacités de réparation de l'ADN par les voies BER et NER dans ces cellules (Jugan *et al.*, 2011).

## 2.7 TiO<sub>2</sub> et induction de l'inflammation

L'induction de l'inflammation par des NPs est bien documentée dans des modèles pulmonaires (Shi *et al.*, 2013). Dans des modèles intestinaux, quelques études *in vivo* et *in vitro* rapportent l'augmentation de marqueurs inflammatoires après exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub>.

*In vivo*, une étude a montré l'augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-4, IL-23, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et TGF- $\beta$  dans l'intestin grêle de souris exposées au colorant alimentaire E171 et à des NPs de TiO<sub>2</sub> par gavage. La réponse inflammatoire qui est observée est de type Th1, c'est-à-dire favorisant la sécrétion de cytokines pour le recrutement de macrophages et la maturation des lymphocytes en lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Nogueira *et al.*, 2012). Sur des modèles murins de cancer colorectal, l'exposition par gavage au colorant E171 pendant 10 semaines induit une augmentation de l'expression de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription régulant des gènes impliqués dans l'inflammation, la réponse immunitaire et la survie cellulaire (Urrutia-Ortega *et al.*, 2016).

*In vitro*, sur des modèles cellulaires du système digestif, les NPs de TiO<sub>2</sub> de 5 et 10 nm de diamètre, contrairement aux microparticules de 490 nm, induisent l'augmentation des marqueurs de l'inflammation ICAM1, CCL20, COX2 et IL-8 dans le modèle intestinal Caco-2 non différencié. L'activation de IL-8 semble induite par la voie NF- $\kappa$ B et p38 (Krüger *et al.*, 2014). Toujours dans le modèle Caco-2 non différencié, et après 24 h d'exposition, les NPs de TiO<sub>2</sub> de structure anatase (<25 nm) induisent une faible augmentation de la sécrétion d'IL-8 (De Angelis *et al.*, 2012). Une autre étude montre que des NPs de TiO<sub>2</sub> entraînent l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  (ARNm) dans les cellules de l'épithélium buccal ainsi qu'une augmentation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par les macrophages (Tay *et al.*, 2014).

Suite à l'induction de l'inflammation, si les particules de TiO<sub>2</sub> rejoignent le système sanguin, elles peuvent impacter d'autres types cellulaires. *In vitro*, les NPs de TiO<sub>2</sub>, de différentes forme et structure cristalline induisent une augmentation de la

production des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8; IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  dans un modèle de tissu périphérique, constitué d'une coculture de cellules endothéliales humaines (HUVEC) et de cellules dendritiques (Schanen *et al.*, 2009). Dans une autre étude, les NPs de TiO<sub>2</sub> (commerciale P25 c'est-à-dire mixte anatase/rutile, ou anatase) induisent une augmentation de la production du marqueur de l'inflammation néoptérine, par des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) mais sans augmentation d'autres marqueurs de l'inflammation. Dans ce cas-là, le TiO<sub>2</sub> pourrait avoir un effet direct sur les macrophages via la production de ROS et l'activation du signal NF- $\kappa$ B (Becker *et al.*, 2014).

L'équilibre entre système immunitaire inné et adaptatif est important, contre les pathogènes, pour prévenir de cancers, d'allergies, ou d'inflammations chroniques. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les NPs peuvent impacter ces deux volets, mais les mécanismes conduisant au déséquilibre de la réponse immunitaire et à certaines maladies sont encore mal compris (Hussain *et al.*, 2012).

### 3. Le E171 en particulier

Le risque d'exposition par ingestion est dû à la consommation de produits alimentaires contenant l'additif E171 ou des médicaments contenant le TiO<sub>2</sub> comme excipient (Weir *et al.*, 2012). Comme indiqué précédemment de nombreuses études font état de la toxicité de NPs de TiO<sub>2</sub> sur les cellules de l'épithélium intestinal mais très peu utilisent le E171 à proprement parlé (Jovanović, 2015; McCracken *et al.*, 2016).

Chez l'homme, après ingestion, le colorant blanc (pharmaceutique ou alimentaire) est absorbé sous forme particulaire au niveau systémique chez des volontaires sains (Pele *et al.*, 2015). *In vivo*, l'exposition de rats (protocoles OECD) à des particules de TiO<sub>2</sub> aux propriétés similaires au colorant E171 n'entraîne pas de toxicité aiguë ou sub-chronique chez les animaux (Warheit *et al.*, 2015). Chez le rat encore, l'ingestion de fortes doses de TiO<sub>2</sub> pendant 28 jours a montré une absorption des particules et un stockage dans le foie des animaux (Onishchenko *et al.*, 2012). D'autre part, le colorant E171 participe à l'aggravation d'états

pathologiques, en l'occurrence il augmente la sécrétion de marqueurs de la progression tumorale, COX2, Ki67,  $\beta$ -caténine, détectés par immunohistochimie dans un modèle murin de cancer colorectal. Dans cette même étude, le colorant induit l'augmentation de l'expression de p65-NF- $\kappa$ B, un facteur impliqué dans l'inflammation (Urrutia-Ortega *et al.*, 2016). Une autre étude a montré l'induction d'une réponse inflammatoire de type Th1, favorisant la sécrétion de cytokines pour le recrutement de macrophages et la maturation des lymphocytes en lymphocytes tueurs. Les auteurs ont mesuré l'augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-4, IL-23, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et TGF- $\beta$  dans l'intestin grêle chez de souris exposées au colorant E171 et à des NPs de TiO<sub>2</sub> (Nogueira *et al.*, 2012). *In vitro*, le colorant E171 n'induit pas de mortalité sur plusieurs types cellulaires non intestinaux, humaines i.e. pulmonaire WI38, cellules souches mésenchymateuses (Athinarayanan *et al.*, 2015; Periasamy *et al.*, 2015). Dans le modèle intestinal Caco-2 différencié, des particules de TiO<sub>2</sub> anatase aux caractéristiques proches de E171 ne modifient pas la mortalité cellulaire. Cependant, lorsque ces particules sont prétraitées avec des fluides gastriques, leur translocation à travers l'épithélium diminue, de même que la croissance cellulaire. Cependant, d'après les auteurs, le risque de translocation des particules de TiO<sub>2</sub> est faible après leur ingestion (Z.-M. Song *et al.*, 2015). Chen *et al.*, ont montré que la part nanoparticulaire extraite de chewing-gum ne diminue pas la viabilité cellulaire, après 24 h d'exposition à de fortes doses i.e. 200  $\mu$ g/mL, des cellules intestinales Caco-2 et GES-1 (Chen *et al.*, 2013). L'exposition au colorant E171 commercial et aux particules de TiO<sub>2</sub> extraites de sucreries entrainerait la désorganisation des microvillosités dans le modèle intestinal Caco-2BBE1 (Faust *et al.*, 2014). Enfin, E171 entraîne une augmentation des ROS intracellulaires et l'augmentation de l'expression de certains gènes codant des enzymes antioxydantes ou des marqueurs du stress oxydant et notamment GSR1, GSTA4, CYP1A, sur des fibroblastes pulmonaires WI38 (Periasamy *et al.*, 2015).

#### 4. Impact sur la barrière intestinale et lien avec les maladies intestinales

A travers les études *in vivo* et *in vitro* utilisant différentes particules de TiO<sub>2</sub> variant par leur taille, structure cristalline, forme, milieu d'exposition etc., nous avons vu que celles-ci induisent généralement une accumulation de ROS, et peuvent parfois induire un stress oxydant, une inflammation ou des dommages à l'ADN. Elles n'induisent que très rarement la mortalité cellulaire. A travers ces effets, les particules de TiO<sub>2</sub> et notamment celles du colorant E171, peuvent indirectement affecter les cellules intestinales et en particulier leur fonction de barrière biologique. Lorsque celle-ci est altérée cela peut conduire à la mise en place ou à l'aggravation de maladies de l'intestin comme par exemple les MICI.

En effet, dans la littérature, des études *in vivo* et *in vitro* suggèrent qu'après leur ingestion, les NPs de TiO<sub>2</sub> sont susceptibles d'impacter la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, c'est à dire le microbiote, la couche de mucus, les transporteurs membranaires, les jonctions cellulaires, etc., bien que les mécanismes de toxicité associés ne soient pas encore forcément établis (Mercier-Bonin *et al.*, 2016).

Il n'y a pas d'étude publiée à ce jour montrant un impact direct du TiO<sub>2</sub> sur le microbiote. Cependant, de nombreuses études montrent un impact de ces particules sur différentes espèces bactériennes. Par exemple, les NPs de TiO<sub>2</sub>, après 1 h d'exposition aux UV, entraînent l'inhibition de la prolifération de *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. hirca* et *B. fragilis* (Tsuang *et al.*, 2008). En présence d'UV, les NPs de TiO<sub>2</sub> détruisent les membranes externes des bactéries *E. coli*. (S. Liu *et al.*, 2010). Le mécanisme d'action du TiO<sub>2</sub> est lié à la production de ROS formées sous UV, venant altérer les parois et membranes bactériennes. Cependant, son action a aussi été observée dans le noir, laissant supposer des mécanismes d'action complémentaires (Adams *et al.*, 2006; Gurr *et al.*, 2005). En effet, une étude a montré que l'induction de ROS intracellulaires suite à l'exposition de *E. Coli* aux NPs de TiO<sub>2</sub>, provoquait des dommages à l'ADN ainsi qu'une diminution de la viabilité des bactéries (Kumar *et al.*, 2011). Les particules de TiO<sub>2</sub> peuvent altérer la croissance et la diversité d'un large spectre bactérien, elles sont de ce fait utilisées comme agents antibactériens dans l'eau ou l'air

(Chawengkijwanich and Hayata, 2008; Kiwi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2008). Souvent, les NPs ne sont pas digérées et poursuivent leur route jusque dans le colon, là où la concentration de bactéries est la plus importante. On peut donc imaginer que les particules de TiO<sub>2</sub> ingérées sont susceptibles d'interagir avec le microbiote intestinal. La dysbiose, c'est-à-dire le déséquilibre des espèces bactériennes du microbiote est susceptible d'altérer la fonction de protection du mucus et d'entraîner une inflammation au niveau de l'épithélium intestinal (Hansson, 2012; Koropatkin *et al.*, 2012). De plus, la dysbiose intestinale est observée chez les personnes souffrant de MICI (Frank *et al.*, 2007; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2013). En effet, une étude a montré que des particules de TiO<sub>2</sub> de 200 nm et de structure anatase interagissaient avec les PAMPs bactériens et les ions Ca<sup>2+</sup>, et augmentaient ainsi la réponse pro-inflammatoire, notamment IL-1β, dans les cellules PBMC humaine (Ashwood *et al.*, 2007).

Les NPs de TiO<sub>2</sub> peuvent également augmenter la quantité de calcium libre dans la cellule et ainsi altérer la perméabilité de l'épithélium et impacter la sécrétion du mucus (Brown *et al.*, 2004; Gitrowski *et al.*, 2014; Koeneman *et al.*, 2009). En effet, le Ca<sup>2+</sup> extracellulaire participe, entre autre, à l'intégrité des jonctions cellulaires notamment via la chélation des ions par les protéines cadhérines (Artursson *et al.*, 2012; S. A. Kim *et al.*, 2011). D'autre part le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire participe à l'exocytose des vésicules contenant le mucus, régulant ainsi la sécrétion des mucines (Berridge *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 1998).

Concernant l'impact des NPs de TiO<sub>2</sub> sur la couche de mucus, peu de données sont disponibles sur le modèle intestinal contrairement au modèle pulmonaire (Rogers, 2007a, 2007b). *In vivo*, l'instillation de NPs de TiO<sub>2</sub> chez le rat induit l'hyperplasie des cellules caliciformes et l'augmentation de l'expression des gènes et protéines MUC5A (M.-H. Ahn *et al.*, 2005). *In vitro*, les NPs de TiO<sub>2</sub> stimulent la sécrétion de mucines dans le modèle pulmonaire ChaGo-K1, via le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Chen *et al.*, 2011). Des modifications dans la composition, la structure et la sécrétion du mucus sont notamment observées dans les MICI, les cancers colorectaux ainsi que d'autres pathologies intestinales (Buisine *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2013; MacAdam, 1993). TFF3 est une protéine co-sécrétée avec les mucines, elle intervient dans la rhéologie du mucus et également dans la restauration de

l'intégrité de la muqueuse intestinale, de par ses effets anti-apoptotiques et de prolifération cellulaire, à forte concentration (McGuckin *et al.*, 2009; Thim *et al.*, 2002). Sa surexpression est observée dans les cas d'inflammation de l'intestin (Taupin *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1993) et d'ulcère gastrique (Wright *et al.*, 1997). D'autre part, les souris n'exprimant pas MUC2 présentent des anomalies d'architecture de l'épithélium colique avec disparition des cellules caliciformes et réduction du volume de mucus, ce qui augmente la probabilité du développement d'adénomes (Velcich *et al.*, 2002).

Les jonctions cellulaires jouent un rôle important dans le maintien de la barrière intestinale. *In vitro et in vivo*, il a été montré que des NPs de TiO<sub>2</sub> induisent une modulation de l'expression des gènes codant les protéines des jonctions serrées, elles augmentent la perméabilité paracellulaire de l'épithélium (Brun *et al.*, 2011). Une autre étude *in vitro* rapporte la détérioration des jonctions cellulaires dans le modèle Caco-2 après exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub> (Koeneman *et al.*, 2009). Or un dysfonctionnement de la régulation et du maintien de ces jonctions cellulaires est observé chez des patients souffrant de la maladie de Crohn (Schmitz *et al.*, 1999). Des modifications de leur perméabilité sont également observées dans le cas de diabète, cancers, et de scléroses (Cereijido *et al.*, 2007). Enfin, les NPs de TiO<sub>2</sub> et le colorant E171 peuvent altérer la morphologie des microvillosités de l'épithélium intestinal, affectant leurs fonctions (Faust *et al.*, 2014; Koeneman *et al.*, 2009).

## *Partie IV : Maladies de l'intestin*

Parfois désigné comme étant un « deuxième cerveau », l'intestin associé au microbiote est un organe mal connu et souvent négligé alors qu'il est impliqué dans de nombreux problèmes de santé tels que le surpoids, la dépression, la maladie de Parkinson, ou encore les allergies (Enders, 2015). Cette dernière partie présente les MICI et le cancer de l'intestin, deux maladies dont l'incidence a augmenté dans les pays développés durant les dernières décennies, possiblement du fait de l'exposition à des polluants environnementaux dont les NPs.

### 1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

La recto-colite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn sont les deux principales dites Maladies Inflammatoires Chronique de l'Intestin (MICI). Elles touchent principalement les jeunes adultes (25-30 ans) mais les adolescents et les enfants sont de plus en plus touchés (figure 30).



Figure 30 : Image tirée de la campagne de l'association François Aupetit (afa) sur les MICI. La souffrance sous silence... La campagne solidaire contre les tabous autour des MICI imaginée depuis 2010 par l'agence Precision pour l'afa<sup>27</sup>.

<sup>27</sup> <http://www.afa.asso.fr/>

Au niveau mondial, une méta-analyse de plusieurs études conduites entre 1930 et 2008 pour l'Europe, 1950 et 2008 pour l'Asie, 1920 et 2004 pour l'Amérique du nord, a estimé que l'incidence, c'est à dire le nombre de nouveau cas dans une population donnée pendant une période définie, a été pour la RCH de 0,6 à 24,3 cas pour 100 000 personnes en Europe et de 0 à 19,2 cas pour 100 000 personnes en Amérique du Nord, contre 0,1 à 6,3 cas pour 100 000 personnes en Asie et au Moyen-Orient. Pour la maladie de Crohn, cette incidence était de 0,3 à 12,7 cas pour 100 000 personnes en Europe, de 0 à 20,2 cas pour 100 000 personnes en Amérique du Nord contre 0,04 à 5 cas pour 100 000 personnes en Asie et au Moyen-Orient. Même si peu d'études épidémiologiques sur ces maladies sont réalisées dans les pays en voie de développement, l'augmentation de l'incidence dans diverses régions du monde montre que celles-ci apparaissent de plus en plus comme des maladies mondialisées (Molodecky *et al.*, 2012).

En France, 200 000 personnes sont touchées par les MICI avec 10 000 nouveaux cas chaque année en moyenne. Le recueil de ces chiffres est réalisé à partir de plusieurs sources de données et notamment grâce à des registres comme Epimad, un registre des MICI recensées dans la région Nord-Ouest de la France et créé en 1988. Il est désormais l'un des plus grands registres du monde, et recense déjà 25 000 dossiers de patients<sup>28</sup>.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement définitif pour ces maladies, les traitements proposés sont destinés à soulager et espacer les crises. Ces maladies évoluent par poussées inflammatoires de durées et fréquences variables suivant les malades et entrecoupées de phases de rémission. Elles affectent l'ensemble de l'appareil digestif pour la maladie de Crohn et la muqueuse du colon pour la RCH. Ces maladies sont aussi associées à un risque accru de cancer colorectal. Les principaux symptômes sont des symptômes intestinaux, i.e. douleurs abdominales, diarrhées, abcès, perte d'appétit et amaigrissement. D'autres symptômes, oculaires et articulaires, peuvent aussi survenir. Bien que de nombreuses questions se posent encore sur la physiopathologie de ces maladies, il semble qu'elles aient une étiologie multifactorielle<sup>29</sup>, associant facteurs génétiques,

---

<sup>28</sup> <http://www.observatoire-crohn-rch.fr/>

<sup>29</sup> <http://www.inserm.fr/>

environnementaux et psychologiques (Farh *et al.*, 2015; Lees *et al.*, 2011; Strober *et al.*, 2007).

Dans 5 à 10 % des cas ces maladies sont familiales, affectant des personnes présentant un terrain génétique favorable (Kaser *et al.*, 2010). Des études de Genome Wide Association (GWAS) ont montré que plus de 30 loci de gènes différents étaient impliqués dans les MICI. Certains de ces locus sont semblables pour les deux maladies, alors que d'autres sont plus spécifiques à la maladie de Crohn. C'est le cas des gènes impliqués dans l'autophagie (*ATG16L1*, *IRGM*), les récepteurs intracellulaires NOD (*NOD2*) et les intellectines (*ITLN1*) (Henderson and Stevens, 2012; Xavier and Rioux, 2008). Pour la RCH, c'est le cas des gènes impliqués dans la fonction de barrière de la muqueuse intestinale (*ECM1*, *CDH1*, *HNF4a* et *laminin B1*) (Thompson and Lees, 2011). 30 % des malades de Crohn présentent une mutation sur au moins un des allèles du gène *NOD2* (Philpott *et al.*, 2014). Suivant les populations, ce ne sont pas les mêmes loci qui sont touchés. Par exemple, *NOD2*, *ATG16L* et *IRGM* sont particulièrement touchés dans la population caucasienne, mais pas dans la population asiatique (Thia *et al.*, 2008). Des facteurs environnementaux sont également mis en cause compte tenu de l'augmentation de l'incidence de ces maladies dans les pays industrialisés et ceux en voie de développement ayant une tendance à la « westernisation » des modes de vie (Kaser *et al.*, 2010; Thia *et al.*, 2008). L'industrialisation en masse des aliments, i.e. ajouts d'additifs, colorants, particules minérales etc., des changements dans les habitudes alimentaires des populations, i.e. augmentation de la consommation de sucres, émulsifiants, graisses, sel, solvants organiques et gluten, seraient des facteurs potentiellement favorisant. Certains de ces produits de consommation augmenteraient la perméabilité de la barrière intestinale en altérant les jonctions serrées (Lerner and Matthias, n.d.). Une étude a mis en évidence la présence de pigments (comme ceux contenus dans le colorant blanc E171) dans les plaques de Peyer d'enfants suspectés de souffrir de MICI (Hummel *et al.*, 2014). De ce fait, les micros et nanoparticules de TiO<sub>2</sub> présentes dans l'alimentation, associées à d'autres facteurs, participeraient à la physiopathologie de ces maladies ou à leur entretien (Lomer *et al.*, 2004).

Enfin, de nombreux autres facteurs de risque comme la cigarette, l'appendicectomie, les contraceptifs oraux ou l'hygiène infantine sont également suspectés mais jusqu'à présent les résultats sont insuffisants et de nombreuses études complémentaires sont nécessaires (Ponder and Long, 2013).

Ce sont principalement les modèles animaux de souris qui ont permis d'en apprendre plus sur la pathogénicité des MICI ainsi que sur leurs mécanismes inflammatoires. Plus d'une dizaine de modèles différents sont disponibles (Elson *et al.*, 2005; Kiesler *et al.*, 2015). Dans le cas des MICI, on suppose également que le système immunitaire et le microbiote sont à l'origine de l'inflammation. La dérégulation du système immunitaire de la muqueuse entraînerait une mauvaise réponse de celui-ci au microbiote de l'individu. Une autre hypothèse serait qu'un déséquilibre dans la communauté bactérienne et/ou que l'altération de la fonction de barrière et des activités antibactériennes de l'épithélium intestinal entraînerait une dérégulation du système immunitaire.

Or, le bon fonctionnement de l'immunité intestinale est primordial pour maintenir la diversité et la proportion des différentes espèces bactériennes au sein du microbiote. Chez les personnes atteintes de MICI, les cellules de l'épithélium intestinal et les cellules de l'immunité sous-jacente sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-10, IL-11, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) et des facteurs de croissance (EGF, KGF). De plus, on observe chez ces malades l'augmentation de l'expression de NF- $\kappa$ B associé à une augmentation d'IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8, ainsi qu'un stress du réticulum endoplasmique (Kaser *et al.*, 2010). De nombreux traitements sont disponibles pour diminuer les crises inflammatoires, malheureusement ils ne conviennent pas à tous les patients et le besoin en nouvelles thérapies est toujours présent. Le premier objectif des stratégies thérapeutiques est de contrôler l'inflammation présente. Pour cela un pipeline de molécules, principalement des immunosupresseurs, est déjà disponible dans le but de cibler le système immunitaire adaptatif (Danese, 2012). De nouvelles stratégies thérapeutiques se développent, avec par exemple l'utilisation d'anticorps anti-adhésion contre les lymphocytes T (i.e., le Natalizumab, l'anti- $\alpha$ 4-integrin IgG4 ou le Vedolizumab), l'utilisation d'inhibiteurs de récepteurs de la famille des tyrosines kinase (JAK), ou encore l'utilisation d'anticorps pour cibler la chimiokine IP-10 (Danese, 2012).

Le dysfonctionnement de la barrière intestinale participe aux troubles inflammatoires. Lorsque sa perméabilité est augmentée, elle est notamment perméable aux pathogènes et aux antigènes qui stimulent alors le système immunitaire et maintiennent un état inflammatoire chronique. Les jonctions serrées et la couche de mucus seraient impliquées (Johansson *et al.*, 2013; McGuckin *et al.*, 2009; Strober *et al.*, 2007). Restaurer la fonction de barrière de l'épithélium intestinal est donc une autre cible thérapeutique. Certaines thérapies ont pour objectif de renforcer la perméabilité de la couche de mucus aux antigènes grâce aux phospholipides de la phosphatidylcholine, de combattre le stress du réticulum endoplasmique grâce à des régulateurs de la voie PERK/eIF2, ou encore d'utiliser des molécules agissant sur la réponse cellulaire à l'hypoxie et notamment le facteur HIF-1 $\alpha$  (Torres *et al.*, 2013). Chez les personnes souffrant de MICI, on observe également une dysbiose intestinale (Frank *et al.*, 2007; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2013). Des traitements pour rétablir le microbiote intestinal et éradiquer des communautés bactériennes trop invasives sont testés par transplantation fécale ou par utilisation de probiotiques. D'autres thérapies utilisant une infection aux oxyures (vers du tube digestif), des bactéries ou des organismes génétiquement modifiés pour produire des cytokines/protéines d'intérêt comme de l'IL-10 ou de l'Elafin sont également étudiées (Torres *et al.*, 2013).

## 2. Cancers

L'étiologie du cancer colorectal est, elle aussi, multifactorielle. En cause, des mutations génétiques, l'alimentation, l'inflammation de l'épithélium et plus récemment le microbiote (Irrazábal *et al.*, 2014). Dans la majorité des cas il survient de façon sporadique chez des individus n'ayant pas de prédispositions génétiques (Watson and Collins, 2011).

En France, 41 150 nouveaux cas de cancers colorectaux ont été estimés en 2012, plus de la moitié sont survenus chez les hommes. Ce type de cancer est parmi les cancers les plus fréquents, avec le cancer du sein et de la prostate, il est aussi le

second le plus meurtrier après le cancer du poumon<sup>30</sup>. Ce cancer touche en majorité des personnes âgées de plus de 50 ans. Dans un premier temps il est asymptomatique, par conséquent il est la plupart du temps diagnostiqué tardivement et nécessite des traitements lourds. Un test immunologique de dépistage, rapide et performant, est désormais proposé gratuitement aux personnes âgées de 50 à 74 ans et peut leur être remis par leur médecin traitant<sup>31</sup>. *Helicobacter pylori* est une bactérie pathogène de l'intestin qui entraîne des états précancéreux et est l'un des premiers facteurs de risque associé au cancer colorectal (Wroblewski *et al.*, 2010). D'autres facteurs de risque sont également évoqués : le tabagisme, une consommation élevée d'alcool, l'obésité, le diabète ou une inflammation chronique. Les personnes souffrant de MICI présentent un risque accru de développer un cancer colorectal car la survenue d'un cancer a souvent lieu dans les zones touchées par l'inflammation chronique. Les cellules souches sont suspectées d'être à l'origine de la néoplasie cellulaire, c'est-à-dire une croissance anormale des cellules, via la voie Wnt, et l'inflammation semble intervenir dans toutes les étapes de la carcinogénèse, (figure 32) (De Lerma Barbaro *et al.*, 2014). Le taux de mortalité des suites de ces cancers diffère selon les zones géographiques. Des études sur les populations migrantes ont montré que lors du passage d'une région à haut risque à une région à plus faible risque alors l'incidence diminuait, celle-ci étant encore plus faible dans la deuxième génération (Ming, 1998). Le mode de vie dans les pays développés de l'ouest, et notamment le régime alimentaire, sont pointés du doigt comme participant au développement des cancers (McMichael *et al.*, 1980). Chez des souris, un régime surgras entraîne un dérèglement de la différenciation cellulaire au niveau des cryptes de l'épithélium intestinal ainsi qu'une modification de la taille de l'intestin et une incidence plus grande de tumeurs (Luo and Puigserver, 2016). Le régime alimentaire impacte également le microbiote intestinal (Doré and Blottière, 2015; Paul *et al.*, 2015). Le métabolome du microbiote semble être impliqué dans le cancer colorectal : certains métabolites comme les acides gras à courte chaînes i.e.

---

<sup>30</sup> [curie.fr/dossier-pedagogique/tout-ce-que-vous-avez-toujours-voulu-savoir-sur-cancers-digestifs](http://curie.fr/dossier-pedagogique/tout-ce-que-vous-avez-toujours-voulu-savoir-sur-cancers-digestifs) (08/06/16)

<sup>31</sup> <http://www.ameli-sante.fr/cancer-colorectal/vous-avez-entre-50-et-74-ans-le-test-de-depistage-du-cancer-colorectal-est-simple-et-gratuit.html>

acétate, propionate et butyrate auraient un effet bénéfique sur l'inflammation et les cancers alors qu'au contraire d'autres métabolites microbiens comme les acides biliaires secondaires favoriseraient la carcinogénèse (Louis *et al.*, 2014).



Figure 31 : Camembert imagé d'un régime alimentaire équilibré. Un régime alimentaire équilibré d'après le dossier d'information « Cancer et nutrition » de l'INSERM<sup>32</sup>.

Pour limiter les risques de cancers, les professionnels de santé recommandent d'avoir une bonne hygiène de vie et une alimentation équilibrée (figure 31). Certains aliments semblent protéger des cancers digestifs alors que l'augmentation de la consommation de graisses et de produits transformés est mise en cause. Il est conseillé de consommer plus de fruits, de légumes et du poisson, sources de nombreuses vitamines, fibres, minéraux, de favoriser les graisses d'origine végétale, sources de vitamine E, de favoriser les glucides complexes et de consommer du calcium. Au contraire il est recommandé de consommer moins de viande et de graisses animales et de réduire sa consommation en sel et en alcool (Steinmetz and Potter, 1991).

---

<sup>32</sup> <http://www.inserm.fr/thematiques/cancer/dossiers/cancer-et-nutrition>

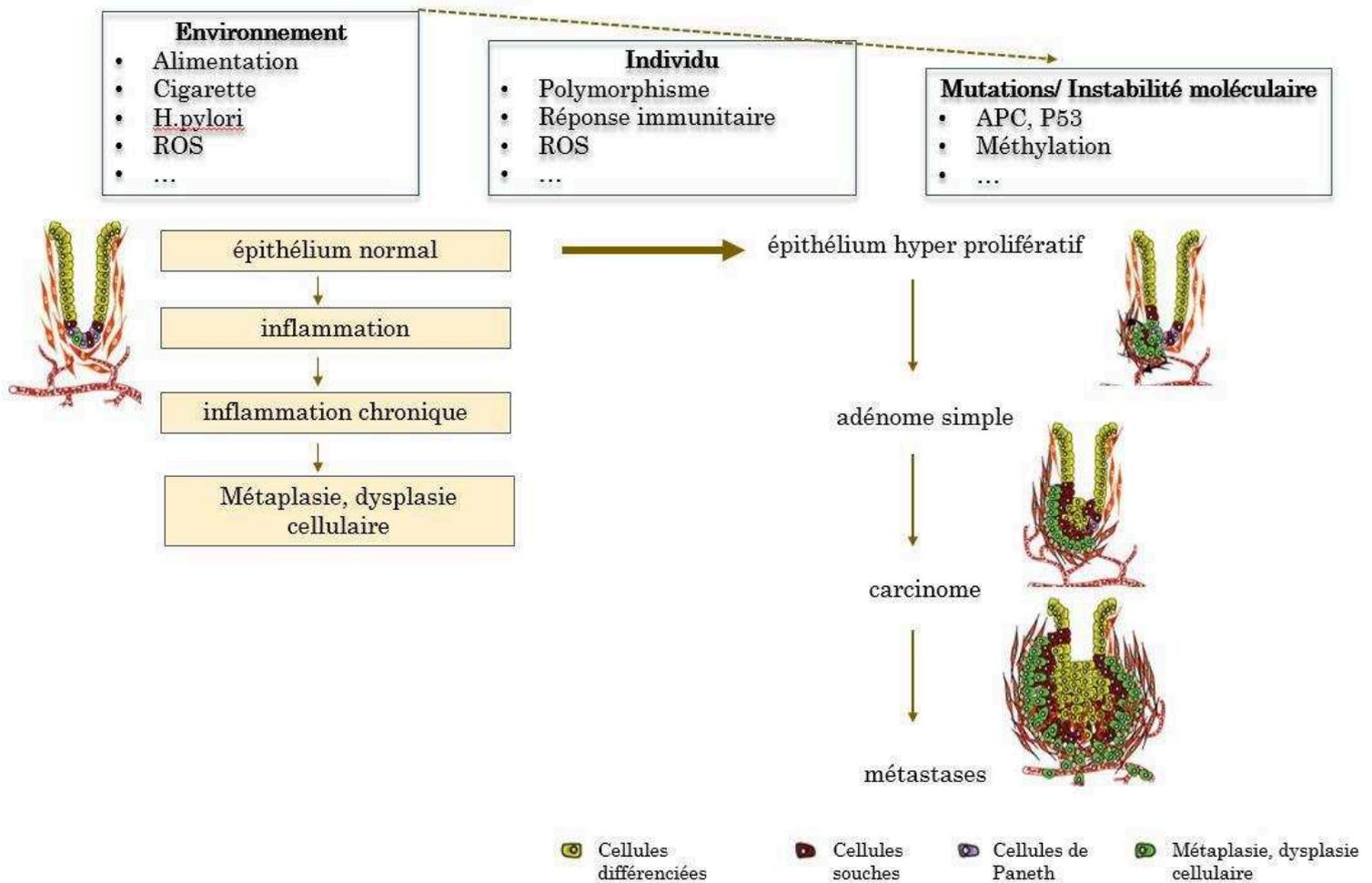


Figure 32 : Carcinogénèse intestinale. La carcinogénèse intestinale est un processus multifactoriel nécessitant plusieurs étapes jusqu'à la survenue d'un carcinome et de métastases. D'après (Korkaya and Wicha, 2010) et (Wroblewski *et al.*, 2010).

Certaines maladies sont des précurseurs du cancer. Les adénomes, tumeurs bénignes qui peuvent affecter une glande ou les muqueuses sont des précurseurs directs bien que peu fréquents dans ce cas-là. La maladie cœliaque est une intolérance permanente au gluten qui peut provoquer une destruction des villosités de l'intestin grêle. Il s'ensuit une malabsorption des nutriments, en particulier du fer, du calcium et de l'acide folique (Potet *et al.*, 1993). C'est la condition précancéreuse la plus répandue. Les modifications épigénétiques semblent aussi avoir un impact important dans le développement de ces cancers (Paul *et al.*, 2015). De même que la présence de foyers de cryptes aberrantes qui sont des lésions précancéreuses au niveau de l'épithélium intestinal (Bird, 1987).

Ces états précancéreux sont généralement associés à des mutations séquentielles sur des gènes spécifiques et notamment le gène APC (Adenomatous polyposis coli), qui code une protéine multifonctionnelle et dont découle la voie des Wnt/ $\beta$ -caténines. Les mutations de Kirsten-ras (K-ras) et p53 participent également à la transition de l'état sain à l'état cancéreux (Fodde *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). Enfin, une augmentation du nombre d'adénomes et une morphologie différente de l'épithélium intestinal ont été observés chez des souris déficientes en MUC2, laissant suggérer que les mucines et donc le mucus peuvent être impliqués dans la cancérogenèse intestinale. Leur altération peut entraîner des états pathologiques (Velcich *et al.*, 2002). De plus, l'expression des différentes mucines, MUC1, MUC2, MUC5AC est utilisée comme biomarqueur dans le cas de métaplasie intestinale (Reis *et al.*, 1999).

---

# OBJECTIFS ET DEMARCHE

---

De nombreux secteurs industriels emploient les particules de  $\text{TiO}_2$ , dont le secteur de l'agro-alimentaire. Elles sont notamment utilisées comme colorant alimentaire sous la mention, E171, sans qu'il n'existe de limitation de leur taille ou d'identification de leur phase cristalline. Le E171 est autorisé car le  $\text{TiO}_2$  micrométrique est insoluble et relativement inerte. Cependant, selon différentes études, entre 10 % et 43 % de ces particules sont nanométriques. Il convient donc, en plus d'évaluer les potentiels effets toxiques du E171, d'identifier la part de ces effets toxiques attribuables aux NPs. Pour répondre à cette question et par soucis de réalisme, j'ai non seulement utilisé du colorant E171, commandé sur un site pâtissier sur internet, mais également deux NPs de  $\text{TiO}_2$ .

La question principale de cette thèse à laquelle nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse est la suivante : **Quels sont les effets toxiques du colorant alimentaire E171 sur des modèles *in vitro* représentatifs d'un épithélium intestinal sain ?**

En particulier, une des principales fonctions de l'intestin est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures. Pour cela, plusieurs éléments participent à la fonction de barrière : les cellules de l'épithélium intestinal (transporteurs membranaires et jonctions cellulaires), le microbiote, la couche de mucus, et les tissus lymphoïdes. Je me suis également focalisée sur la question **de l'impact des microparticules et NPs de  $\text{TiO}_2$  sur cette fonction de barrière** car sa dysfonction semble impliquée dans le développement et l'aggravation des symptômes associés aux MICI.

Toujours par soucis de réalisme et afin d'évaluer l'impact de la durée d'exposition aux particules, les cellules ont été exposées de façon aiguë et chronique pendant 21 jours. Les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques qui seront prochainement soumis à un comité de lecture. La démarche de l'étude est illustrée dans la figure 33. J'insiste sur le fait que cette étude est réalisée sur des modèles cellulaires *in vitro*. Les résultats ne sont pas directement extrapolables à l'Homme

et des études complémentaires sur des modèles animaux sont nécessaires. Elles ont en partie été menées dans le cadre de la thèse de Sarah Bettini, co-encadrée par E. Houdeau et E. Boutet du laboratoire TOXALIM de l'INRA, avec qui j'ai étroitement collaboré. J'ai également étroitement collaboré durant ce doctorat avec F. Barreau, chercheur INSERM à l'Institut de recherche en santé digestive et spécialiste des MICI.

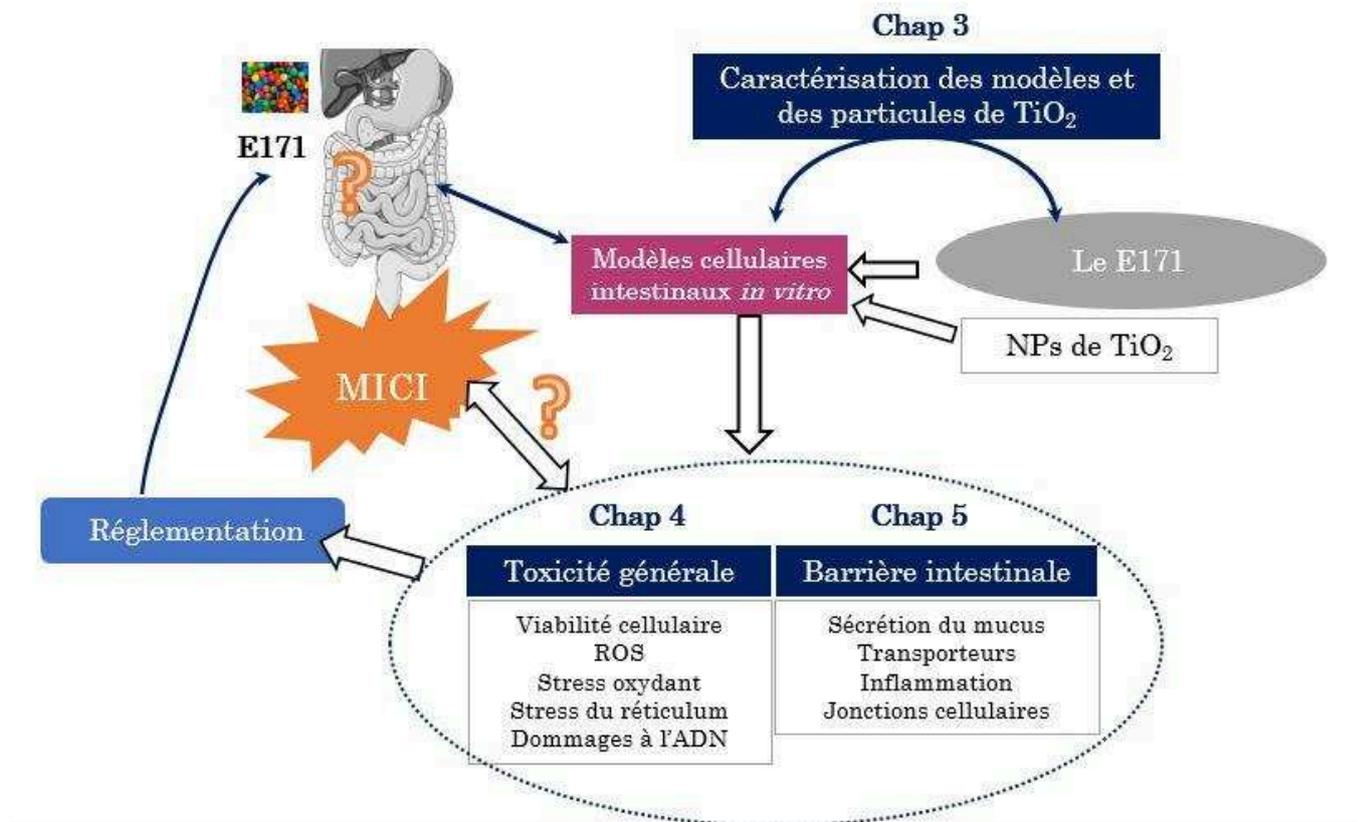


Figure 33 : Démarche de l'étude. Le chapitre 3 présente les résultats de caractérisation des particules de TiO<sub>2</sub> et des modèles cellulaires utilisés afin de déterminer l'impact toxicologique du E171 sur l'intestin et sa fonction de barrière. Les résultats sont présentés dans les chapitres 4 et 5.

# MATERIELS ET METHODES

---

## 1. Particules de TiO<sub>2</sub> utilisées

### 1.1 Identité des particules utilisées

Pour le colorant blanc E171, 5 lots provenant de différents fournisseurs ont été commandés sur internet. Ces 5 lots ont été caractérisés par l'équipe de Nathalie Herlin-Boime (CEA-Saclay). Plusieurs paramètres ont été caractérisés : la distribution en taille par des techniques de microscopie électronique (SEM et MET) et par DLS, la surface spécifique par la méthode Brunauer Emmett et Teller (BET), la structure cristalline par DRX, la pureté par EDS (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) et la stabilité des solutions de particules par turbidimétrie. Ces 5 lots ont des structures cristallines très proches et les propriétés physico-chimiques des particules sont similaires. Parmi ces 5 lots, c'est le lot A qui a été utilisé.

En parallèle, deux NPs de TiO<sub>2</sub> de « référence » sont utilisées. A12, élaborées par pyrolyse laser au laboratoire de Pignon *et al.*, (2008) et P25, (JRCNM01005a) qui sont des particules commerciales AEROXIDE®, Evonik, Allemagne (Pignon *et al.*, 2008). Ces NPs sont également bien caractérisées par l'équipe de Nathalie Herlin-Boime. Les résultats de caractérisation des lots de E171 et des NPs A12 et P25 sont présentés dans le chapitre 3.

### 1.2 Préparation des suspensions de particules

#### 1.2.1 Mise en suspension

Les NPs de TiO<sub>2</sub> et les particules du colorant E171 sont stockées sous forme de poudre à l'abri de la lumière. Les suspensions stock (environ 10 mL) de particules sont préparées à la concentration finale de 10 mg/mL dans de l'eau MilliQ préalablement stérilisée. Les suspensions sont stables dans le temps, i.e. le TiO<sub>2</sub> ne se dissout pas, et peuvent être conservées sur une longue durée à l'abri de la

lumière. Les suspensions mères sont dispersées par petits volumes, 100 ou 200  $\mu\text{L}$  pour A12 et P25, 500  $\mu\text{L}$  pour E171 à l'aide d'un sonificateur à ultrasons équipé d'une sonde externe : un Cup-Horn (Bioblock Scientific, Vibracell 75041, Huber minichiller) (figure 34). Cette technique de sonification permet de conserver des conditions stériles lors de la dispersion des NPs avant l'exposition des cellules. La sonication dure 30 min à 80 % d'amplitude. La puissance du sonificateur a été mesurée suivant la procédure de calorimétrie décrite par Taurozzi *et al.*, (2010), l'amplitude 28 % correspond à 16,7 W. Ce protocole permet d'obtenir des tailles de NPs similaires à celles obtenues par le sonificateur à sonde US, préalablement optimisé au laboratoire (Simon-Deckers *et al.*, 2008).



Figure 34 : Montage du Cup-Horn. Photographies de la dispersion d'une suspension de particules avec un sonificateur de type Cup-Horn. A) Générateur et enceinte contenant le montage du Cup-Horn. La sonde et l'échantillon (B) sont dans un bain d'eau à 4-5°C, refroidit par le dispositif de refroidissement (C).

### 1.2.2 Caractérisation des suspensions

La diffusion dynamique de la lumière (DLS), aussi appelée spectroscopie par corrélation de photons permet de mesurer le diamètre hydrodynamique de

particules en suspension, c'est-à-dire le diamètre réel des particules ou agglomérats de particules auquel est ajouté la correction due à la couche de solvant entourant ces particules. La zone de précision pour la mesure est de 1 à 1000 nm. La suspension est traversée par un faisceau de lumière dévié au contact des particules et dont la déviation fluctue en fonction du mouvement brownien des particules. Le photomultiplicateur de l'appareil détecte et analyse ces fluctuations afin de remonter à la vitesse du mouvement brownien des particules et déterminer leur diamètre en solution en fonction de la viscosité du solvant utilisé (via l'équation de Stokes-Einstein).

Le diamètre hydrodynamique des particules en suspension est mesuré par DLS grâce à un ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instrument) qui opère à un angle de 173° et une longueur d'onde de 633 nm. Avant chaque exposition, la mesure de la DLS permet de s'assurer de la reproductibilité du protocole de dispersion. Les paramètres pour la mesure sont les suivants : 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. Concernant les concentrations, les suspensions mères sont diluées dans de l'eau ou du milieu de culture avant la mesure aux 1/500<sup>ème</sup> pour A12 (20 µg/mL) ; 1/1 000<sup>ème</sup> pour P25 (10 µg/mL) et 1/1 000<sup>ème</sup> ou 1/2 000<sup>ème</sup> pour E171 (10 µg/mL ou 5 µg/mL). Le ZetaSizer NanoZS permet aussi de mesurer le potentiel zêta des particules, c'est à dire la charge de surface que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en suspension, ce qui renseigne sur l'affinité des particules pour certaines molécules biologiques.

## 2. Modèle cellulaires

### 2.1 Culture cellulaire et modèles cellulaires utilisés

#### 2.1.1 Entretien des lignées cellulaires

##### Caco-2 et HT29-MTX

Les cellules Caco-2 (ATCC® HTB-37, passages 49 à 60) et les cellules HT29-MTX (fournies par F. Barreau et T. Lesuffleur, respectivement INSERM U1220 et U843) sont cultivées dans le milieu DMEM + GlutaMAX™ (31-966, Thermo Fisher Scientific) dans lequel est ajouté 10 % de sérum de veau fœtal (SVF)

décomplémenté (chauffé pendant 30 min à 56°C), 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % d'antibiotique (pénicilline à 50 unités/ml et streptomycine à 50 µg/mL, Thermo Fisher Scientific). Les cultures cellulaires sont maintenues dans les incubateurs à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Pour leur entretien, les cellules sont passées 2 fois semaines. Lorsqu'elles atteignent 80 % de confluence, elles sont trypsinées à l'aide de 2 mL de trypsine-EDTA (0,5g/L trypsine, 0,2 g/L EDTA, Invitrogen), puis comptées. Elles sont alorsensemencées à 1,4x10<sup>6</sup> cellules/boîte 60 cm<sup>2</sup> dans 10 mL de milieu pour Caco-2 et 2x10<sup>6</sup> cellules/boîte 60 cm<sup>2</sup> dans 10 mL de milieu pour HT29-MTX.

Pour toutes les expériences, les deux lignées cellulaires sontensemencées à 24 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans les supports appropriés : boîtes de pétri de 60 cm<sup>2</sup> (Falcon), plaques multi-puits (6, 12, 24 ou 96 puits) ou inserts de type Transwell-Clear® (polyesther, pores 0.4 µm, Costar).

#### Caco-2(C1) et Raji B

Les cellules Caco-2(C1) (fournies par F. Barreau, INSERM U1220) sont cultivées dans le même milieu de culture que Caco-2 et HT29-MTX. Pour leur entretien elles sont passées 2 fois par semaine, elles sontensemencées à 24 000 cellules/cm<sup>2</sup> puis après plusieurs passages à 17 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules Caco-2(C1) n'ont pas le même phénotype que les cellules Caco-2, elles sont plus petites et forment des épithélia plus homogènes. Les cellules Raji B (ATCC® CCL-86™, fournies par F. Barreau, INSERM U1220) sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI (72400-021 Thermo Fisher Scientific) dans lequel est ajouté 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté (chauffé pendant 30 min à 56°C), 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % d'antibiotiques (pénicilline à 50 unités/ml et streptomycine à 50 µg/mL, Thermo Fisher Scientific). Elles sont cultivées dans des boîtes de pétri passées une fois par semaine et réensemencées à 5x10<sup>6</sup> cellules/boîte 60 cm<sup>2</sup> avec 10 mL de milieu de culture. Elles sont comptées au compteur automatique après marquage au bleu trypan pour s'assurer de la viabilité des cellules. Lorsque la viabilité diminue, elles sont passées, il y a alors entre 35 et 50x10<sup>6</sup> cellules/boîte. Pour toutes les expériences, ces deux lignées sont cultivées suivant le modèle cellulaire décrit dans le point 1.3.

### Congélation/décongélation

Les cellules sont congelées par culots de 2 millions de cellules repris dans 1mL de tampon de congélation, constitué de milieu de culture auquel est ajouté 10 % de SVF décomplémenté et 5 % de DMSO. Les cellules sont conservées 24 h à -80°C dans des boîtes de type Mr Frosty avant d'être conservées dans l'azote liquide. Les aliquots sont décongelés à 37°C puis directement ajoutés dans une boîte de pétri avec 10 mL de milieu de culture préalablement chauffé à 37°C. Lorsque les cellules ont adhéré, le milieu de culture est renouvelé.

### Mycoplasmes

Après chaque décongélation, et pour toutes les lignées, la recherche de mycoplasme est réalisée via le kit de détection MycoAlert™ (ref LT07-318 Lonza). Les lignées Caco-2, HT29-MTX et Raji B ne sont pas mycoplasmées contrairement à la lignée Caco-2(C1) (indice entre 1,8 et 2).

Témoin + : 12

Témoin - : 0,7

Culture non mycoplasmée : <0,9

Culture mycoplasmée : >1,2

Tableau 5 : Valeurs pour le test des mycoplasmes.

#### 2.1.2 Modèles représentatifs de l'iléon

Les cellules Caco-2 sont cultivées de façon à ce qu'elles soient, soit différenciées, soit non différenciées. Dans leur forme non différenciées, elles sont cultivées pendant une semaine jusqu'à sub-confluence (80-90 % de la confluence) puis exposées aux particules et récoltées pour les tests biologiques. Les cellules non différenciées sont plus actives métaboliquement que les cellules différenciées. Pour l'étude des épithélia différenciés, les cellules sont cultivées pendant 21 jours avec changement du milieu de culture tous les deux ou trois jours. Après 21 jours de culture, les épithélia sont jointifs et les cellules sont différenciées (Francisca Araújo, 2013).

### a. *Modèle d'entérocytes différenciés*

Le premier modèle utilisé est une monoculture des cellules Caco-2. C'est un modèle d'épithélium intestinal jointif composé d'entérocytes, ne sécrétant pas de mucus. Les cellules sontensemencées à 24 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans le même milieu de culture que pour l'entretien des cellules (figure 35).

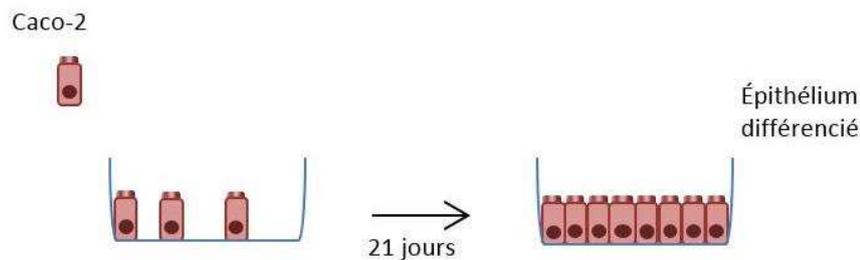


Figure 35 : Monoculture des cellules Caco-2.

### b. *Modèle d'épithélium sécrétant du mucus*

Le deuxième modèle de ce type est une coculture des cellules Caco-2 et des cellules HT29-MTX. C'est un modèle d'épithélium intestinal constitué d'entérocytes et de cellules caliciformes sécrétant du mucus. Les cellules sontensemencées à 24 000 cellules/cm<sup>2</sup> avec 70 % de Caco-2 et 30 % d'HT29-MTX, en nombre total de cellulesensemencées (figure 36).

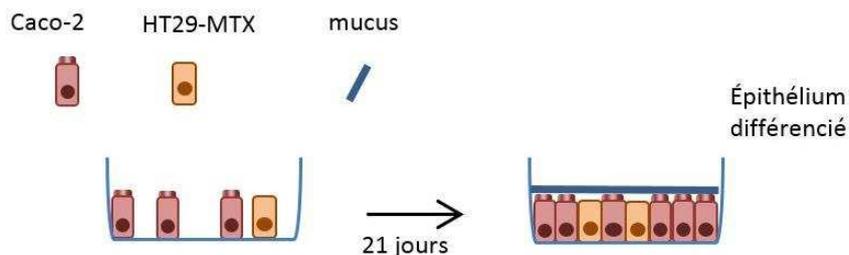


Figure 36 : Coculture des Caco-2 et HT29-MTX.

### 2.1.3 Modèle représentatif de l'épithélium associé aux plaques de Peyer

Les cellules Caco-2 (C1) sont cultivées en monoculture pendant 14 jours dans le compartiment apical de plaques Transwell. Ces supports, qui sont des membranes semi-perméables sur lesquelles poussent les cellules épithéliales, permettent la

mise en contact des cellules avec le milieu de culture au niveau de la membrane apicale et basolatérale des cellules (figure 37). Les cellules sontensemencées à 24 000 cellules/cm<sup>2</sup> (Transwell 12 puits : volume de milieu de culture dans le compartiment apical 500 µL, dans le compartiment basolatéral 1,5 mL et Transwell 6 puits : apical 1,5 mL, basolatéral 2,4 mL) avec changement du milieu de culture tous les deux jours. Les cellules RajiB sont ensuite ajoutées dans le compartiment basolatéral du Transwell à 500 000 cellules dans 1,5 mL de milieu de culture. Le modèle est conservé de la sorte pendant quatre jours en changeant le milieu de culture du compartiment apical tous les jours. La présence des lymphocytes RajiB induit la différenciation de 15 à 30 % des cellules Caco-2 en cellules M. Après les quatre derniers jours, les cellules sont récoltées pour les analyses.

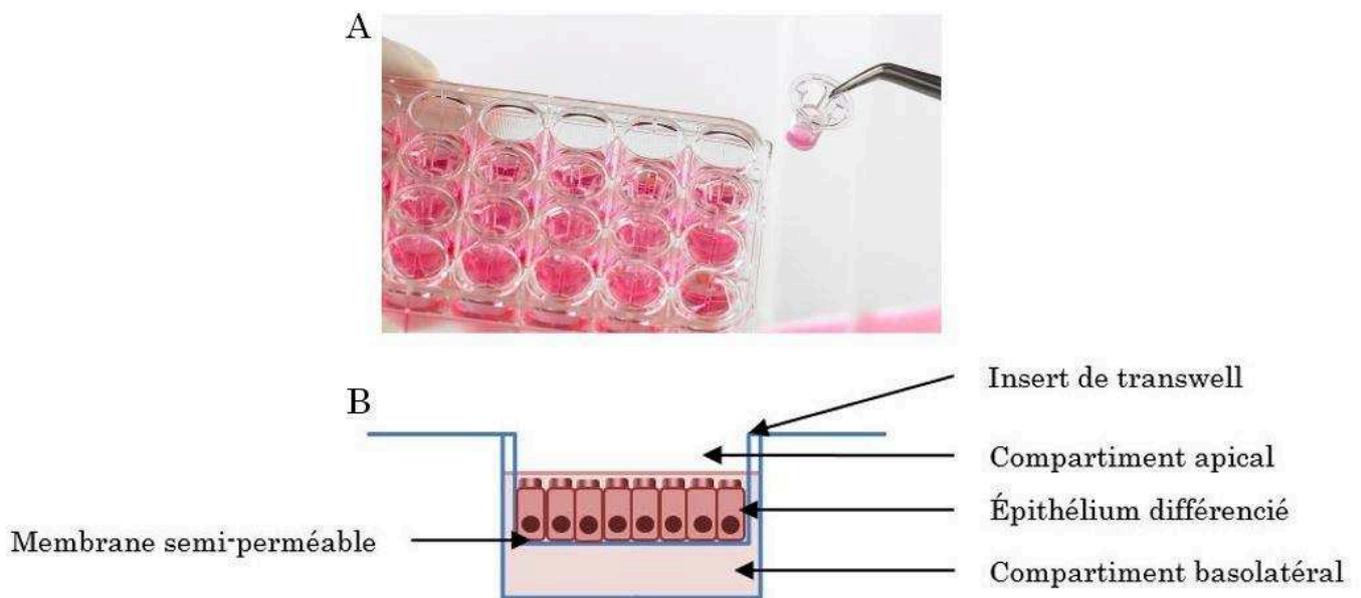


Figure 37 : Culture cellulaire en plaque Transwell. A) Transwell 24 puits. B) Représentation schématique d'un puit de Transwell.

Le troisième modèle mis en place durant cette thèse est une coculture des cellules Caco-2(C1) et RajiB, c'est un modèle d'épithélium intestinal associé aux plaques de Peyer (follicle-associated epithelium ou FAE) composé d'entérocytes et de cellules M (figure 38).

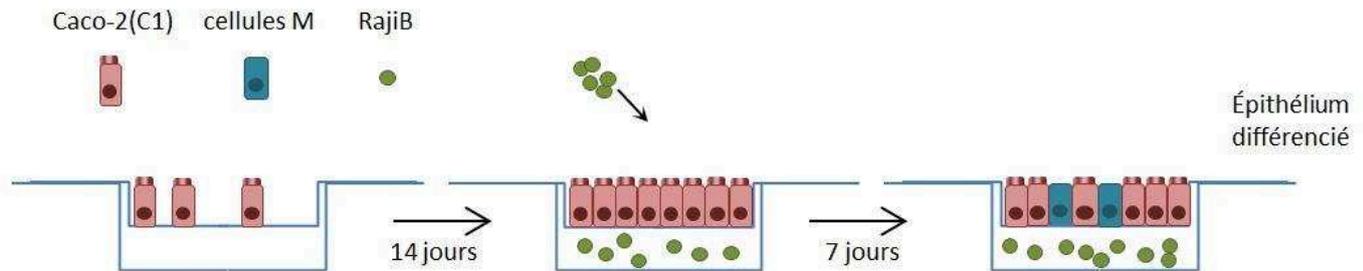


Figure 38 : Coculture de cellules Caco-2(C1) et de cellules RajiB. Modèle cellulaire de plaque de Peyer (cellules M).

### 3. Modalités d'exposition des cellules aux particules

Les particules sont diluées dans le milieu de culture des cellules contenant 10 % du sérum de veau décomplémenté. Les concentrations utilisées vont de 10  $\mu\text{g/mL}$  à 200  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 3.1 Exposition aigüe des cellules non différenciées

Les cellules sont exposées à sub-confluence, généralement après 5 jours de culture, pendant 6 h, 24 h ou 48 h au colorant E171 et aux NPs de  $\text{TiO}_2$ . En fonction de l'expérience, les cellules sont soit exposées en même temps puis la récolte est effectuée après 6 h, 24 h et 48 h, soit exposées en décalé et récoltées au même moment. Les protocoles d'expositions aigües aux particules sont présentés dans la figure 39.

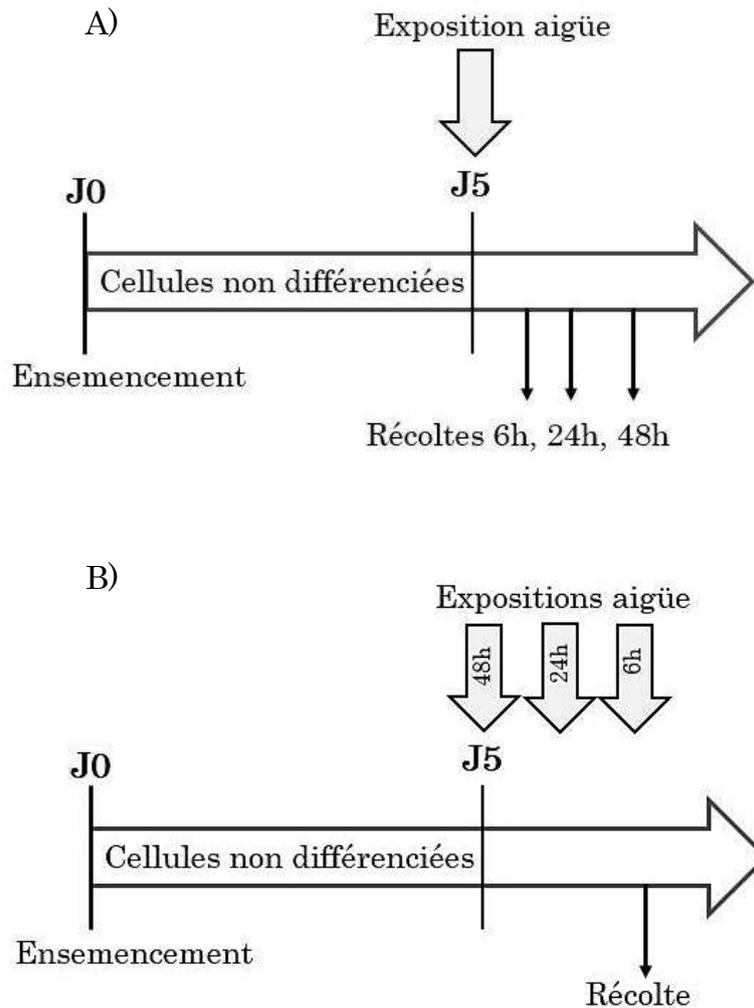


Figure 39 : Protocoles d'expositions aigües de cellules non différenciées. A) exposition aigüe de cellules non différenciées, dans ce schéma, les cellules sont exposées en même temps mais récoltées en différées. B) exposition aigüe de cellules non différenciées, dans ce schéma, les cellules sont exposées en différées mais récoltées en même temps.

### 3.2 Exposition aigüe des cellules différenciées

Les cellules sont exposées après 21 jours de culture pendant 6 h, 24 h ou 48 h au colorant E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub>. De la même manière que pour les cellules non différenciées, les cellules sont soit exposées en même temps puis une récolte est effectuée après 6 h, 24 h et 48 h, soit exposées en décalé et récoltées au même moment. Les protocoles d'expositions aigües aux particules sont présentés dans la figure 40.

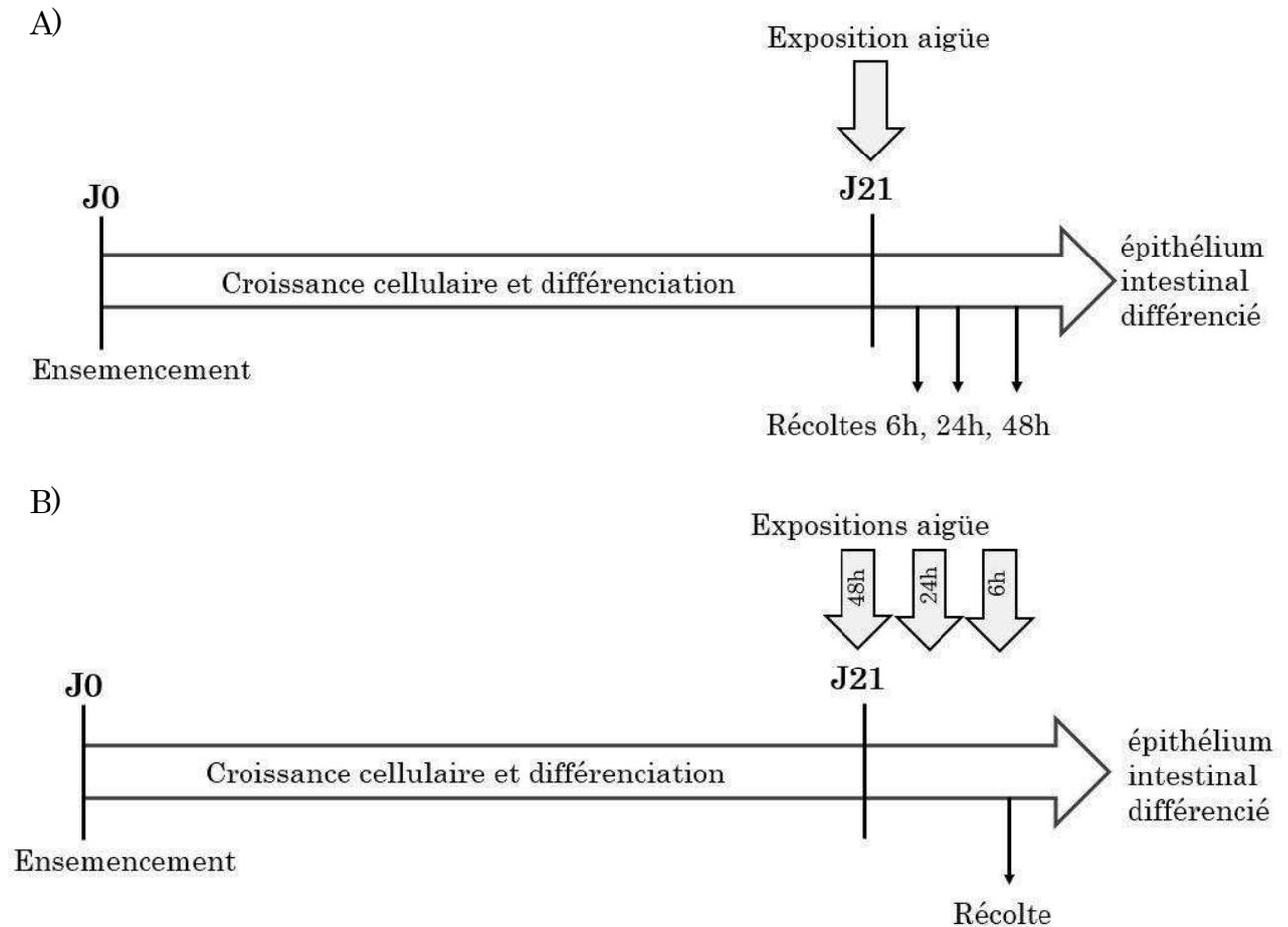


Figure 40 : Protocoles d'expositions aiguës de cellules différenciées. A) exposition aiguë de cellules différenciées, dans ce schéma, les cellules sont exposées en même temps mais récoltées en différées. B) exposition aiguë de cellules différenciées, dans ce schéma, les cellules sont exposées en différées mais récoltées en même temps.

### 3.3 Exposition chronique durant la phase de différenciation

Les cellules intestinales ont été exposées pendant les 21 jours de différenciation cellulaire. Elles sont ensemencées dans du milieu ne contenant pas de particules mais dès le premier changement de milieu, c'est du milieu contenant des particules qui est déposé sur les cellules. Pour l'exposition chronique, le milieu de culture cellulaire contenant les particules de  $\text{TiO}_2$  à différentes concentrations est changé tous les deux jours ou trois jours et jusqu'à 8 fois au total pendant cette période. Le protocole d'exposition chronique aux particules est présenté figure 41.

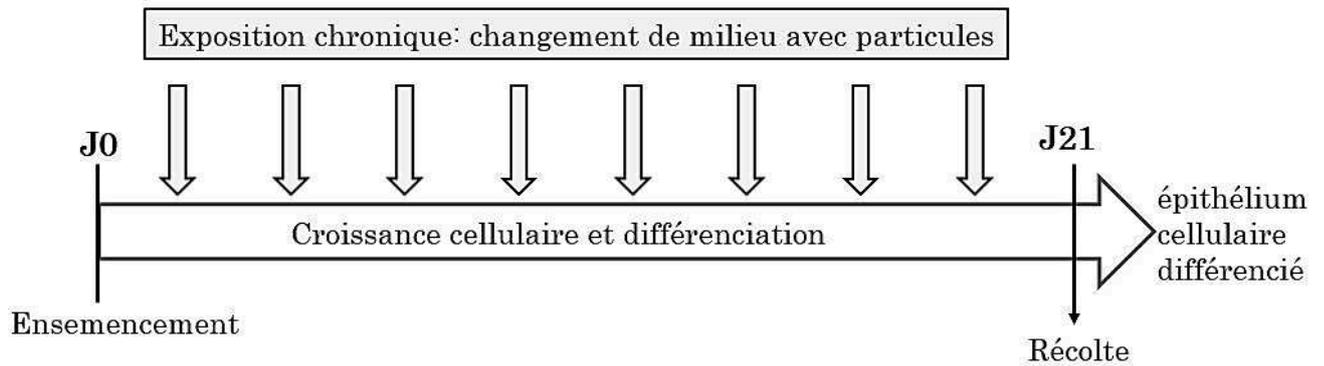


Figure 41 : Protocole d'exposition chronique. Les cellules sont exposées de façon répétée. Lors des 21 jours de différenciation des épithélia, le milieu de culture contenant des particules est changé 8 fois. Les cellules sont récoltées à la fin des 21 jours.

#### 4. Techniques utilisées pour évaluer des effets des particules sur les différents modèles cellulaires

##### 4.1 Observation de l'accumulation cellulaire par microscopie électronique à transmission

Les cellules exposées aux particules ont été observées par microscopie électronique en transmission (MET). Ces manipulations sont réalisées sur la plateforme de microscopie électronique de l'institut des neurosciences de Grenoble (GIN, INSERM/univ. Grenoble Alpes), en collaboration avec K. Perney-Gallay et A. Bertrand. Les cellules sont ensemencées en plaque 12 puits dans lesquelles ont été préalablement déposées des lamelles de verre. Les cellules sont différenciées pendant 15 jours et exposées aux particules, elles poussent à la surface des lamelles qui sont récupérées à la fin de l'exposition, rincées plusieurs fois avec du PBS puis fixées dans un tampon 2 % PFA, 2 % glutaraldéhyde ( $C_5H_8O_2$ ) dans un tampon phosphate 0,1 M à pH= 7,2 pendant 15 min à température ambiante. Le tampon de fixation est ensuite renouvelé pour 45 min à température ambiante puis les cellules sont conservées à 4°C. Les lamelles avec les cellules sont ensuite déshydratées dans un gradient d'éthanol puis imprégnées de résine Epoxy. Des coupes ultra fines (80 nm) sont ensuite préparées et colorées par de l'acétate d'uranyle à 1 %. Ces coupes sont observées avec le microscope JEOL 1200EX TEM du GIN fonctionnant à 80 kV.

## 4.2 Quantification de l'accumulation cellulaire par spectrométrie de masse à couplage inductif

L'accumulation des particules dans les cellules exposées a été mesurée par spectrométrie de masse à couplage inductif (ICP-MS). Ces manipulations sont réalisées en collaboration M.Dubosson et C.Desvergne (LBM, CEA-Grenoble). Après les expositions aux particules en plaques 12 puits, les cellules sont récoltées et les culots secs congelés à -80°C. Pour leur minéralisation, les culots cellulaires sont repris dans 125 µL de PBS, 25 µL sont utilisés pour le dosage des protéines totales via l'utilisation de réactif de Bradford (Sigma-Aldrich, B6916) par lecture spectrophotométrique à 595 nm. Les 100 µL restant sont utilisés pour la minéralisation de l'échantillon. Les échantillons cellulaires et le contenu en titane sont dilués au 1/70<sup>ème</sup> dans 7 mL d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ultra pure préparé à 24 % (V/V) dans des lainer en téflon puis ils sont dissous à haute pression et haute température dans un micro-onde at 1100 W pendant 30 min. Au préalable, nous avons montré que le E171, A12 et P25 étaient 100 % minéralisés avec ce protocole. Les échantillons minéralisés sont ensuite dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans de l'acide nitrique HNO<sub>3</sub> puis ils sont analysés par l'ICP-MS Nexion 300X (Perkin Elmer), équipé d'un nébuliser et opérant en mode standard. La courbe de calibration est obtenue avec une gamme de Ti ionique (0, 0,25, 0,5, 1, 5, 10 et 50 µg/L) minéralisée dans les mêmes conditions. L'interprétation finale se fait en utilisant l'isotope <sup>47</sup>Ti, à cause des interférences observées entre l'isotope le plus abondant <sup>48</sup>Ti et l'atome de soufre de l'acide sulfurique.

## 4.3 Mesure reflétant un impact sur la viabilité cellulaire et l'intégrité des épithélia

### 4.3.1. Résistance transépithéliale

La mesure de la résistance transépithéliale des épithélia (TEER) permet de s'assurer de la mise en place des jonctions serrées et de l'intégrité de l'épithélium cellulaire. Si elle diminue, cela signifie que la perméabilité de l'épithélium cellulaire est modifiée donc l'épithélium n'est plus jointif.

Les cellules sont ensemencées en plaques Transwell 6 ou 12 puits. La TEER (gamme 20 k $\Omega$ ) est mesurée à l'aide de deux électrodes placées dans les inserts du transwell (figure 42), associées à un multimètre (Millicell® ERS-2, Millipore). Les électrodes sont stérilisées pendant 30 min dans de l'éthanol 70 %, rincées à l'eau MilliQ puis équilibrées dans le milieu de culture pendant 30 min à température ambiante. La résistance des épithélia (Rcell en  $\Omega$ ) est mesurée dans chaque insert y compris dans un insert sans cellules pour la mesure du « blanc » (Rblanc en  $\Omega$ ). A est la surface des inserts, en cm<sup>2</sup>. La TEER en  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> est obtenue grâce à la formule :  $TEER = (R_{cellules} - R_{blanc}) \times A$ . Trois mesures sont réalisées pour chaque insert.

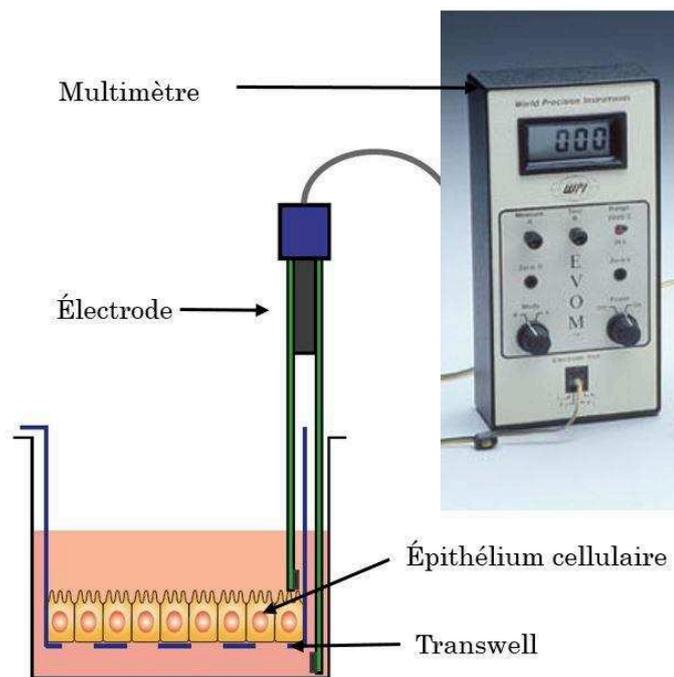


Figure 42 : Représentation schématique de la mesure de la TEER d'un épithélium cellulaire.

#### 4.3.2 Tests d'exclusions de colorants : bleu trypan et iodure de propidium

Le bleu trypan, (3,3'-[(3,3'-diméthyl[1,1'-biphényl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonate] de tétrasodium) est un colorant vital qui est exclu des cellules vivantes. Il colore donc uniquement les cellules mortes, dont l'intégrité membranaire est altérée. Ce test a été utilisé pour quantifier la viabilité cellulaire après exposition aigüe et chronique des modèles Caco-2 et Caco-2/HT29-

MTX, différenciées pendant 21 jours. Après la récolte des cellules, les culots cellulaires sont repris dans du milieu de culture. Pour les compter, 10  $\mu$ L de bleu de trypan (ref T10282 Thermo Fisher Scientific) est ajouté à 10  $\mu$ L de suspension cellulaire. 10  $\mu$ l de cette suspension est ensuite déposé dans la lame du compteur automatique (Countess automatic cell counter, Invitrogen). S'il y a trop de cellules, les préparations sont diluées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules mortes et vivantes par rapport au contrôle, c'est-à-dire des cellules non exposées aux particules.

L'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant des acides nucléiques fluorescent. De même que le bleu trypan, il est exclu des cellules vivantes, donc il est couramment utilisé afin de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Grâce à cette molécule, les cellules mourantes sont marquées puis quantifiées par de la cytométrie en flux. Ce test a été utilisé pour obtenir la viabilité cellulaire après exposition chronique du modèle Caco-2/HT29-MTX. Les cellules sont cultivées en plaque 6 puits pendant 21 jours. Elles sont récoltées et les culots cellulaires sont dilués de façon à avoir  $2 \times 10^6$  cellules/mL, centrifugés 5 min à 250 rcf puis repris dans 500  $\mu$ L de solution d'IP préparé dans du PBS (50  $\mu$ L de solution stock d'IP, Enzo, RGT-51029-PI, dans 5 mL de PBS). Les échantillons sont conservés dans la glace puis analysés à l'aide d'un cytomètre FACS Calibur (BD Biosciences, Franklin Lanes, NJ) équipé du logiciel CXP (Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA) avec les conditions d'excitation/émission suivantes : 538/617nm. Les données collectées sont analysées grâce au logiciel Flowing Software 2.5.1<sup>33</sup>. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de cellules mortes et vivantes par rapport au contrôle, c'est-à-dire des cellules non exposées aux particules.

#### 4.3.3 Tests d'activité métabolique : MTT et WST-1

Les sels de tétrazolium MTT (bromure de 3-[4,5-diméthyl-2-thiazolyl]-2,5-diphényltétrazolium et WST-1 (4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzène disulfonate) sont couramment utilisés pour évaluer la

---

<sup>33</sup> <http://www.flowingsoftware.com/>

cytotoxicité de composés en mesurant l'activité déshydrogénase succinique mitochondriale dans les cellules viables. Lorsque ces sels sont internalisés dans les cellules, ils sont clivés par cette enzyme mitochondriale pour former le formazan (produit de la réduction des sels de tétrazolium), qui précipite sous forme de cristaux bleus. Pour le test MTT, ces cristaux de formazan sont dissous dans du DMSO alors que pour le WST-1, les cristaux de formazan sont directement solubles dans l'eau. Plusieurs publications ont montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> pouvaient interférer avec le test MTT alors qu'elles n'interfèrent pas avec le test WST-1 (Guadagnini *et al.*, 2013). Le test WST-1 a donc été privilégié. L'absorbance est ensuite mesurée ; elle reflète alors l'activité métabolique des cellules. Ces deux tests ont été utilisés sur les cellules Caco-2 en monoculture et le modèle Caco-2/HT29-MTX en coculture, non différenciés après exposition aiguë aux particules. Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits, lorsqu'elles atteignent 80-90 % de confluence, les solutions de NPs sont ajoutées pendant 6 h ou 48 h. A la fin de l'exposition aiguë, le surnageant des plaques est vidé et les plaques sont rincées avec du milieu de culture sans sérum (100 µL/ puit). 100 µL d'une solution à 0,5 µg/mL de MTT (M5556 Sigma-Aldrich) ou une solution au 1/10<sup>ème</sup> de WST-1 (Roche), préparée dans du milieu de culture sans sérum sont ajoutées dans chaque puit de la plaque puis sont laissés pendant 1 h 30 à 37 °C, à l'abri de la lumière dans l'incubateur. A la fin de l'incubation, dans le test WST-1 l'absorbance est mesurée directement à 438 nm au spectrofluorimètre (Molecular Devices, spectramax M2). Dans le test MTT, la plaque est vidée par retournement puis 100 µL de DMSO est ajouté par puit. L'absorbance est ensuite mesurée à 550 nm au spectrofluorimètre. Pour ces deux tests, dans le but de s'affranchir de l'interférence entre les NPs et les mesures d'absorbance, les plaques sont centrifugées à 500 rpm pendant 5 min puis le surnageant est transféré dans une nouvelle plaque 96 puits puis une seconde lecture de l'absorbance est réalisée.

#### 4.4 Quantification des dommages à l'ADN par la méthode des comètes

Les cassures simple et double brin de l'ADN ainsi que les sites alkali-labile sont détectés dans les cellules par le test des comètes dans sa version alcaline. Pour mesurer en plus les sites Fpg-sensibles (en particulier les lésions de type 8-oxo-dG)

une étape d'incubation avec l'enzyme glycosylase ADN formamidopyrimidine (Fpg) est ajoutée au protocole (Dušinská and Collins, 1996; Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000). Les cellules sont cultivées en plaques 12 puits et pour chaque puit, 4 aliquots sont récoltés. Les cellules sont congelées à -80 °C dans un tampon de congélation spécifique (4,28 g sucrose, 588 mg citrate de Sodium, 2,5 mL DMSO, pH 7,6) à 1- 2 millions de cellules par aliquots. Le jour de la manipulation, les cellules sont décongelées, les culots sont repris dans du PBS puis dans de l'agarose à faible température de fusion (low melting point agarose, A-9414 Sigma-Aldrich) préparée à 0,5 % dans du PBS et maintenu à 37 °C. 100 µL de la suspension cellulaire sont ensuite déposés sur des lames de verre préalablement recouvertes d'agarose et séchées. La lame est alors recouverte d'une lamelle et déposée sur de la glace. Ces lames sont ensuite lysées durant une nuit, à 4°C, dans un tampon de lyse alcalin (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10 % DMSO and 1 % Triton). Après la lyse, les lames sont rincées dans un tampon Tris-HCL à 0,4 M pH=7,4. La suite du protocole est réalisée dans le noir. Les cellules sont ensuite incubées avec l'enzyme Fpg (0,05 u/µL ref 4040-100-01, Interchim) ou dans son tampon, pendant 45 min à 37 °C. Pour stopper la réaction, les lames sont déposées sur de la glace. Après l'incubation avec la Fpg, les cellules sont immergées dans le tampon de migration (NaOH 300 mM, EDTA 1mM) dans une cuve d'électrophorèse et incubées pendant 30 min pour permettre à l'ADN de se dérouler. L'électrophorèse est alors réalisée, pendant 30 min à 25 V (ce qui génère un courant de 300 mA). Les lames sont ensuite neutralisées par 3 rinçages de 5 min avec le tampon 0,4 M Tris-HCl à pH 7,4, puis les noyaux cellulaires sont marqués avec une solution de GelRed préparée à 1/ 10 000<sup>ème</sup> (ref 41003 VWR, 10000X) dans du PBS. L'ADN présentant des cassures migre plus rapidement que l'ADN intact. Le taux de cassures est défini par le % d'ADN dans la queue des comètes (figure 43) alors que l'absence de cassures se traduit par l'observation de pelotes d'ADN sphériques, sans "queue". 50 cellules par lame au minimum sont comptées (150 cellules par condition) à l'aide d'un microscope à fluorescence et du logiciel Comet IV (Perceptive instruments, Suffolk, UK). Les contrôles positifs pour la Fpg sont des cellules pulmonaires humaines A549 préalablement exposées à de la riboflavine (1

$\mu\text{M}$ ) pendant 20 min à 37°C et irradiées sous UVA (010.0 J/cm<sup>2</sup>) (Forestier *et al.*, 2012).

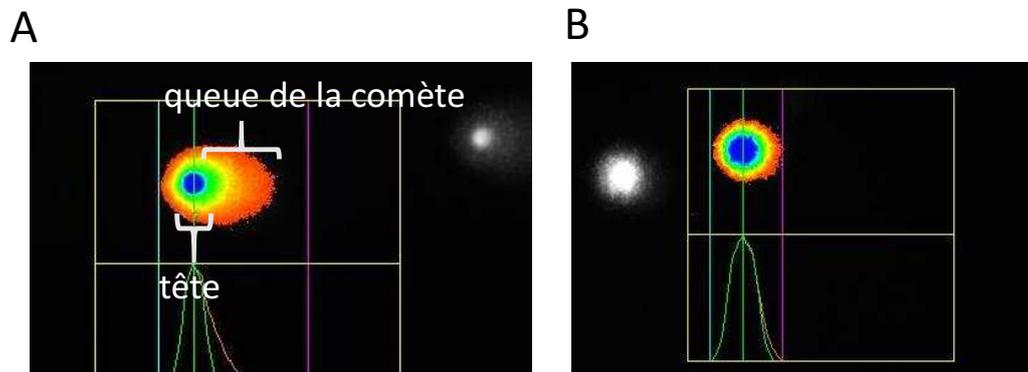


Figure 43 : Test des comètes pour la quantification des cassures de l'ADN dans les noyaux cellulaires. A) et B) sont des spots d'ADN cellulaire visualisés à l'aide du microscope à fluorescence et du logiciel Comet IV. A) Spot d'ADN présentant une forme de comète, typique des cellules ayant subi des dommages de l'ADN. B) Spot d'ADN intact, sans « queue ». Le % d'ADN présent dans la « queue » des comètes par rapport à la « tête » est quantifié ici par la mesure de l'intensité de fluorescence et il définit le taux de cassures dans les cellules.

#### 4.5 Quantification des espèces réactives de l'oxygène

Le composé H<sub>2</sub>-DCF-DA, le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ester acétyl (D399 Thermo Fisher Scientific), a été utilisé pour quantifier les ROS intracellulaires. Ce composé devient fluorescent (DCF) après clivage des acétates par les estérases intracellulaires puis oxydations par les ROS. Ainsi, lorsque la fluorescence intracellulaire augmente, on peut déduire que la quantité de ROS a augmenté. Les cellules sont cultivées en plaques 6 puits avec quatre puits par conditions. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS puis incubées pendant 30 min à 37 °C avec 1 mL/ puit de composé H<sub>2</sub>-DCF-DA préparé à 80  $\mu\text{M}$  dans le milieu de culture. Elles sont ensuite rincées deux fois puis reprises dans 300  $\mu\text{L}$  de PBS à 4°C froid. Les cellules sont récoltées par grattage des puits, 200  $\mu\text{L}$  de suspension sont ensuite déposés dans une plaque 96 puits noire. La fluorescence est mesurée au spectrofluorimètre (Molecular Devices, spectramax M2) par excitation à 480 nm et mesure de l'émission à 530 nm. Les résultats sont présentés normalisés par la fluorescence obtenue dans les puits de cellules contrôles (non exposées) et moyennés pour chaque condition.

Pour s'assurer que les NPs n'interfèrent pas avec la mesure de la fluorescence, des mesures de fluorescences ont été réalisés sur des puits contenant du PBS, du H<sub>2</sub>-DCF-DA et les solutions de NPs à plusieurs concentrations, après incubation pendant 30 min à 37 °C. Un deuxième test a consisté à mesurer la fluorescence des NPs avec le même protocole que celui décrit ci-dessus, mais sans ajouter le composé H<sub>2</sub>-DCF-DA. La fluorescence est ensuite mesurée.

#### 4.6 Evaluation de l'expression des gènes par RT-qPCR

La RT-qPCR permet de quantifier les ARN messagers de gènes choisis dans une cellule. Dans des cellules exposées aux particules de TiO<sub>2</sub>, elle permet donc d'évaluer l'impact de ces expositions sur l'expression de ces gènes. Le principe de cette technique consiste à extraire l'ARN des cellules, 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 grâce à une polymérase à ADN stable et active à température élevée (72°C).

Cette technique a été utilisée pour étudier l'expression des gènes codant des protéines du mucus, des enzymes de régulation du stress oxydant, des protéines de la réponse UPR/stress du RE, des transporteurs membranaires et des protéines caractéristiques des cellules M.

Les cellules sont cultivées en plaques 6 puits, récoltées puis lysées grâce au Kit d'extraction GenElute™ mammalian total RNA Miniprep (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fournisseur et avec l'étape optionnelle de traitement à la DNase (Sigma-Aldrich, on-column DNase I digestion set). A la fin du protocole, les ARN sont élués des colonnes dans 50 µL du tampon d'élution. La concentration en ARNm récoltés est mesurée par une lecture d'absorbance à 260 nm au Nanodrop et les éventuelles contaminations par des protéines et des molécules organiques sont contrôlées via les ratios 260/280 nm et 260/230 nm. Enfin, les échantillons sont conservés à -80°C.

Dans un deuxième temps, L'ARN total est reverse transcrit en ADNc à l'aide du kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). 2 µg d'ARN total sont incubés à 70°C pendant 5 minutes en présence de 100 ng de Random Primers (C18A Promega) et 10 mM d'un mix de dNTPs (D7295 Sigma-Aldrich) puis incubés

dans la glace pendant 1 minute. Le tampon 5X de l'enzyme ainsi que 2  $\mu\text{L}$  de DTT à 0,1 M, 45 unités d'inhibiteurs de ribonucléases (Sigma-Aldrich) sont ajoutés puis incubés 2 min à 25°C. Enfin 1  $\mu\text{L}$  de reverse transcriptase III RT à 200 U est ajouté et les échantillons sont incubés pendant 10 min à 25°C puis pendant 50 min à 42 °C. Enfin, la réaction est inactivée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes. La quantité d'ADNc est ensuite quantifiée au Nanodrop par mesure de la DO à 260 nm. La pureté des échantillons est contrôlée via les ratios 260/280 nm et 260/230 nm. Le volume des échantillons est ajusté de façon à avoir la même concentration d'ADNc dans toutes les conditions, puis ces échantillons sont dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau MilliQ pour avoir une concentration de 30 ng/ $\mu\text{L}$ . Les ADNc sont stockés à -20 °C.

Dans un dernier temps, les ADNc dérivés des gènes choisis sont quantifiés par qPCR grâce au fluorophore SYBR Green. Le mélange réactionnel est composé de 5  $\mu\text{L}$  d'ADNc à 30 ng/ $\mu\text{L}$ , 12,5  $\mu\text{L}$  de Mesa Blue (Eurogentec, RT-SY2X-03+WOUHRB), 2,5  $\mu\text{L}$  de chaque amorce (sens et antisens) à 2  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  d'amorce indirecte à 2  $\mu\text{M}$  et 2,5  $\mu\text{L}$  d'eau MilliQ nuclease free. Les ADNc sont amplifiés grâce à un thermocycleur MX3005P (Stratagène) 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 tracée selon les recommandations de Stratagène (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. Le seuil de Cq est fixé d'après les paramètres par défaut du logiciel Mx-Pro 3.20 (Stratagène). 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). L'expression relative des gènes est calculée selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .  $\Delta Cq$  est la différence entre la valeur seuil (Cq) pour le gène cible et le gène de référence, pour chaque condition. Ensuite le  $\Delta\Delta Cq$  est la différence entre la condition étudiée et la condition contrôle (cellules non exposées). Les gènes de ménages qui ont été utilisés pour la normalisation sont *CYCLO A*, *CYCLO B* (cyclophiline A et B), *S18* (18S ribosomal 1), *GAPDH* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), et *RPL20* (60S ribosomal L18a).

Leur variabilité a été préalablement contrôlée à l'aide de l'outil BestKeeper qui permet la corrélation par paires (Pfaffl *et al.*, 2004). La normalisation de l'expression des gènes et l'analyse statistique sont obtenues par le logiciel REST 2009, qui utilise un test de randomisation par réallocation fixe de paires (Pfaffl *et al.*, 2002). Les expressions relatives des gènes par rapport à la condition contrôle i.e., cellules non exposées, obtenues par le logiciel REST est ensuite exprimée en pourcentage. L'efficacité des amorces qui sont utilisées est préalablement testée, nous avons choisi de n'utiliser que des amorces dont l'efficacité est de  $2 \pm 0,3$ . Toutes les amorces utilisées dans ce travail de thèse sont répertoriées dans les tableaux 6 et 7. D'un côté les amorces qui ont fonctionné, de l'autre celles qui n'ont pas été utilisées car leur efficacité, leur courbe de fusion ou leur courbe de dissociation n'étaient pas bonnes dans nos conditions.

	Amorce sens (5'>3')	Amorce antisens (5'>3')
<b>Stress oxydant</b>		
<i>CAT</i>	AGCTTAGCGTTCATCCGTGT	TCCAATCATCCGTCAAAACA
<i>GSR</i>	GATCCCAAGCCCACAATAGA	CTTAGAACCCAGGGCTGACA
<i>SOD1</i>	AGGGCATCATCAATTTTCGAG	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC
<i>SOD2</i>	TCCACTGCAAGGAACAACAG	TCTTGCTGGGATCATTAGGG
<i>NRF2</i>	CAGTCAGCGACGGAAAGAGT	ACCTGGGAGTAGTTGGCAGA
<b>Stress du RE</b>		
<i>GRP78</i>	GGTGAAAGACCCCTGACAAA	GTCAGGCGATTCTGGTCATT
<i>CHOP</i>	TGGAAGCCTGGTATGAGGAC	TGTGACCTCTGCTGGTTCTG
<i>IRE1</i>	AGAGAGGCGGGAGAGCCGTG	5'CGAGGAGGTGGGGGAAGCGA
<i>sXBP1</i>	GCAGGTGCAGGCCAGTTGT	TGGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC
<i>ATF6</i>	CCAGCAGCACCCAAGACTCAAACA	GTGTGACTCCCCAGCAACAGC
<b>Mucus</b>		
<i>TFF3</i>	AGGAGTACGTGGGCCTGTCT	AAGGTGCATTCTGCTTCCTG
<i>MUC1</i>	AGACGTCAGCGTGAGTGATG	CAGCTGCCCCGTAGTTCTTTC
<i>KLF4</i>	ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC	CCCACACAGGTGAGAAACCT
<i>MUC12</i>	ACCTTAGCACCAGGGTTGTG	GGAGGATGCGTCATTCATCT
<i>MUC17</i>	TGCAGAACAGGACCTCAGTG	AGGTCATCTCAGGGTTGGTG
<b>Transporteurs ABC</b>		
<i>MDR1</i>	GCCAAAGCCAAAATATCAGC	TTCCAATGTGTTCCGGCAT
<i>BCRP</i>	TGCAACATGTACTGGCGAAGA	TCTTCCACAAGCCCCAGG
<i>MRP1</i>	GGGCTGCGGAAAGTCGT	AGCCCTTGATAGCCACGTG
<i>MRP2</i>	TGAGCAAGTTTGAAACGCACAT	AGCTCTTCTCCTGCCGTCTCT
<b>Inflammation</b>		
<i>IL-8</i>	TGGCAGCCTTCCTGATTTCT	ATTTCTGTGTTGGCGCAGTG
<i>IL-18</i>	CTCGCCAGTGAAATGATGGCT	TAGGTCGATGCTTAGAGGCTG
<i>MCP1</i>	CATTGTGGCCAAGGAGATCTG3	TTCGTTTCCCTTTGAGGCTTC
<i>TNF-α</i>	GGCGTGGAGCTGAGAGATAAC	GGTGTGGGTGAGGAGCACAT
<b>Modèle cellulaire 3</b>		
<i>C5AR</i>	TGCCCCAGAAGACCCAGGCA	AGGGGACATCGGGCCACAGT
<i>GP2-1</i>	CAATGTGCCTACCCACTGGA3	ATGGCACCCACATACAGCAC
<i>GP2-2</i>	TCAACGTGATTCCACCATCC	TAGGTCGATGGCCGGTACTT

<b><i>ACTB1</i></b>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
<b><i>ACTB2</i></b>	CCTCGCCTTTGCCGATCC	GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC
<b>Gènes de ménage</b>		
<b><i>GAPDH</i></b>	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
<b><i>CYCLOA</i></b>	TTCATCTGCACTGCCAAGAC	TCGAGTTGTCCACAGTCAGC
<b><i>CYCLOB</i></b>	GCAAGATCGAGGTGGAGAAG	CTGTGGAATGTGAGGGGAGT
<b><i>S18</i></b>	AACGTCTGCCCTATCAACTTT	TGGATGTGGTAGCCGTTTTTCT
<b><i>RPL20</i></b>	GCAATGTTGCCAGTGTCTG	GCCTTGACCTTTTCAGCAA

Tableau 6 : Amorces utilisées pour l'analyse des gènes par RT-qPCR. Les amorces pour les gènes de ménage, les gènes du stress oxydant et du mucus sont de notre propre design, celles du stress du RE selon Bouvier *et al.*, 2012, RPL20 et ACTB2 selon Dydensborg *et al.*, 2006, celles relatives aux transporteurs ABC selon Maubon *et al.*, 2007, C5aR selon (S.-H. Kim *et al.*, 2011), GP2-1 et GP2-2 selon Roggenbuck *et al.*, 2009, ACTB1 selon Piana *et al.*, 2008. Les amorces relatives à l'inflammation nous ont été fournies par Serge Candéias (LCBM-BIG, CEA-Grenoble).

	Amorce sens (5'>3')	Amorce antisens (5'>3')
<b>Stress Oxydant</b>		
<b>GPX1</b>	CCAGTCGGTGTATGCCTTCT	CTCTTCGTTCTTGGCGTTCT
<b>Stress du RE</b>		
<b>SelS</b>	CGCCAAGAGGAGTCTCTGTC	AGACGATGTACCAGCCATAGG
<b>Mucus</b>		
<b>MUC4</b>	TTCAGTCCAACCTGTCAACCTAGA	5CCACCGAGGCGTTGACTT
<b>MUC2</b>	CAAGATCTTCATGGGGAGGA	AACACGGTGGTCCTCTTGTC
<b>MUC22</b>	ACCCGCACTATGTCACCTTC	GGGATCGCAGTGGTAGTTGT
<b>MUC42</b>	CTTCAGATGCGATGGCTACA	GTTTCATGCTCAGGTGCTCA
<b>MUC43</b>	TTCTAAGAACCACCAGACTCAGAGC	GAGACACACCTGGAGAGAATGAGC
<b>MUC6</b>	AGCGAAGCCATCATCTCAGT	CTCCACCAGAACCATGAGGT
<b>MUC12</b>	ACCTTAGCACCAGGGTTGTG	GGAGGATGCGTCATTCATCT
<b>MUC16</b>	GCCTCTACCTTAACGGTTACAATGAA	GGTACCCCATGGCTGTTGTG
<b>RETNLB</b>	TGTTCCCTTAGACTCCGTTATGG	AGTGACAGCCATCCCAGCA
<b>Inflammation</b>		
<b>IL-6</b>	CCTCGACGGCATCTCAGCCCT	TCTGCCAGTGCCTCTTTGCTGC
<b>CCL3</b>	GACCGCCTGCTGCTTCAGCTA	CACAGACCTGCCGGCTTCGC
<b>Gènes de ménage</b>		
<b>MAN1B1</b>	ACCGTGGAGAGCCTGTTCTA	GTTTGGGTCATCGGAGAAGA

Tableau 7 : Amorces qui n'ont pas marché dans nos conditions. Les amorces pour les gènes du stress oxydant et du mucus sont de notre propre design, celles du stress du RE selon Speckmann *et al.*, 2014, celles des gènes de ménage selon Roggenbuck *et al.*, 2009. Les amorces relatives à l'inflammation nous ont été fournies par Serge Candéias (LCBM-BIG, CEA-Grenoble).

#### 4.7 Quantification de protéines par western Blot

Les protéines cellulaires totales sont extraites à partir de culots cellulaires, préalablement congelés à -80 °C sous forme de culots secs, dans du tampon de lyse Cell Lytic Buffer (Sigma-Aldrich, C2978) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 pastille pour 10 mL de tampon, Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets Roche, 11 836 153 001). 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-Aldrich, B6916) par lecture

spectrophotométrique à 595 nm. Pour l'expression des protéines, 15 à 20 µg de protéines sont préparées en conditions dénaturantes (mélange des échantillons avec 1X de bleu de Laemmli (Bio-Rad, 1610747), chauffage de 10 min à 90°C) puis déposées en quadruplicats pour chaque condition sur les gels de polyacrylamide (1,0 mm d'épaisseur, 15 puits, 7,5 % pour la détection des protéines MRP1, MRP2, BCRP, MDR1, MUC1, MUC4 et 12 % pour TFF3, GP2 et C5aR, TGX Stain Free FastCast Acrylamide Kit, 12 % ou 7,5 % Bio-Rad). La quantité totale de protéines déposées dans chaque puit est vérifiée par l'intensité globale des pistes obtenues grâce à la technologie StainFree (Bio-Rad) ce qui a permis de normaliser les quantités obtenues. Les protéines migrent par électrophorèse pendant 40 min à 200 V dans un tampon Tris-Glycine contenant 0,1 % de dodécylsulfate de sodium puis elles sont transférées sur des membranes de nitrocellulose avec le mode de transfert standard de 30 min (Trans-Blot Turbo Transfer Pack 0,2 µm Nitrocellulose Midi, (ref Bio-Rad 1704159). Les membranes sont bloquées pendant une heure sous agitation dans une solution de TBS tween 20 à 0,5 % contenant 0,5 % de lait ou de BSA (en fonction du tampon utilisé pour les anticorps primaires et secondaires). Les protéines sont ensuite détectées via les anticorps primaires, les références et les conditions d'utilisation de ces anticorps primaires sont répertoriées dans les tableaux 8, 9, 10. Pour ce faire, les membranes sont incubées dans des pochettes soudées contenant un volume de 3 mL de chaque anticorps. Les anticorps secondaires, anti-souris (Amersham Biosciences NA931) ou anti-lapin (Amersham Biosciences NA934) sont préparés dans le même tampon que les anticorps primaires, après dilution au 1/20 000<sup>ème</sup>, et incubés pendant 2 h à température ambiante. La détection des bandes protéiques immuno-marquées est effectuée par chimioluminescence avec le substrat Clarity Western ECL (Bio-Rad, 1705061) et le lecteur Chemidoc XRS+ (Bio-Rad). L'intensité des bandes est quantifiée grâce au logiciel ImageLab 5.1 (Bio-Rad), elle est normalisée par rapport à la quantité totale de protéines par bande puis divisée par les intensités normalisées obtenues sur les bandes provenant des cellules non exposées. Les résultats sont exprimés en facteur d'induction par rapport aux contrôles.

### Pour l'étude des transporteurs membranaires ABC :

Les anticorps primaires et secondaires sont préparés dans un tampon TBS tween 20 à 0,5 % préparé dans 0.5 % (en masse) de lait, les anticorps primaires sont incubés sur la nuit à 4 °C et les anticorps secondaires pendant 2 h à température ambiante.

<b>Protéine</b>	<b>Taille</b>	<b>Référence</b>	<b>Dilution</b>	<b>Anticorps secondaire</b>
<b>MDR1</b>	141 kD	ab170904 Abcam	1/2500	Anti-lapin
<b>MRP1</b>	160-190 kD	ab24102 Abcam	1/500	Anti-souris
<b>MRP2</b>	170 kD	ab3373 Abcam	1/750	Anti-souris
<b>BCRP</b>	72 kD	ab108312 Abcam	1/2500	Anti-lapin

Tableau 8 : Anticorps primaires pour Western-Blot-Transporteurs ABC.

### Pour l'étude la caractérisation des cellules M :

Les anticorps primaires et secondaires sont préparés dans un tampon TBS tween 20 à 0,5 % et BSA à 0,5 %, les anticorps primaires sont incubés sur la nuit à 4 °C et les anticorps secondaires pendant 2 h à température ambiante.

<b>Protéine</b>	<b>Taille</b>	<b>Référence</b>	<b>Dilution</b>	<b>Anticorps secondaire</b>
<b>C5aR</b>	39kD	NBP-1-61567 Novus Bio	1/500	Anti-lapin
<b>GP2</b>	43 kD	ab105503 Abcam	1/500	Anti-lapin

Tableau 9 : Anticorps primaires pour Western-Blot-Modèle de plaque de Peyer.

### Pour l'étude de la production de mucus :

Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau 10. De nombreux tests ont été effectués pour optimiser les différentes conditions du protocole : blocage des membranes, incubations des anticorps primaires et secondaires dans le lait ou la BSA, incubation sur la nuit à 4°C ou pendant 2 h à température ambiante. Les anticorps secondaires sont incubés pendant 2 h à température ambiante.

Protéine	Taille	Référence	Dilution	Anticorps secondaire
<b>TFF3 (1)</b>	33kD	ab57752 Abcam	1/250	Anti-souris
<b>TFF3 (2)</b>	9 kD	ab108599 Abcam	1/1000	Anti-lapin
<b>MUC1</b>	100, 400 kD	ab181133 Abcam	1/1500	Anti-lapin
<b>MUC4</b>	232,268, 75 kD	ab76038 Abcam	1/250	Anti-lapin

Tableau 10 : Anticorps primaires pour Western-Blot-Mucus.

Malheureusement malgré de nombreuses tentatives (conditions de blocage des membranes, utilisation de lait ou de BSA, incubation des anticorps pendant différents temps), nous n'avons pas réussi à quantifier les protéines du mucus.

#### 4.8 Marquage de protéines en immunofluorescence

Les antigènes cellulaires ont été immunomarqués à l'aide d'anticorps spécifiques, eux-mêmes détectés grâce à un anticorps secondaire associé à un fluorophore. Plus particulièrement le récepteur membranaire C5aR, caractéristique des cellules M (Kim and Jang, 2014) a été ainsi détecté grâce à un anticorps primaire Anti-C5aR (C5AR1 NBp1-61567-0,1 mg Novus Bio). Après 21 jours de culture, les membranes Transwell sur lesquelles ont poussé les cellules sont découpées au scalpel afin de récupérer les épithélia et de les déposer dans une nouvelle plaque 12 puits. Les épithélia sont rincés délicatement au PBS puis les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA 3 %) pendant 20 min à température ambiante. Les épithélia sont perméabilisés avec du tampon BTP (BSA 0,2 %, Triton 100X 0,2 % dans du PBS, pH=7,4) pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps primaire préparé suivant différentes dilutions, i.e. 1/200<sup>ème</sup>, 1/400<sup>ème</sup> et 1/500<sup>ème</sup>, dans le tampon PBS et BSA 2 % puis 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (Anti-Rabbit Atto 488, Sigma-Aldrich 18772) dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du tampon PBS / BSA 2 %, à l'obscurité cette fois-ci. Les épithélia sont ensuite montés entre lame et lamelle avec du milieu de montage contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), qui permet de détecter l'ADN. Ces lames sont alors observées au microscope Axio Imager A1 couplé à une caméra AxioCam MRm (Carl Zeiss).

## 4.9 Tests ELISA et Luminex pour l'évaluation de l'inflammation

### 4.9.1 Dosage de cytokines individuelles

Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est une technique immunoenzymatique utilisée ici pour doser les cytokines sécrétées dans le milieu cellulaire. Elles sont détectées par des anticorps qui réagissent ensuite avec un anticorps secondaire associé à une enzyme permettant la détection. L'ajout du substrat enzymatique entraîne la formation d'un produit coloré, quantifié par spectroscopie. Trois kits ELISA (BD Biosciences, références tableau 11) ont été utilisés pour détecter la sécrétion des cytokines IL-8, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  par les cellules exposées au colorant E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub>. Les anticorps et l'enzyme de détection proviennent des kits ELISA et le substrat TMB (Le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine), chromogène utilisé comme révélateur de la peroxydase dans la technique ELISA, provient du kit OptEIA BD™ ELISA (BD Biosciences). Les produits chimiques utilisés pour les différents tampons (rinçage, blocage, solution stop, etc.) proviennent de chez Sigma-Aldrich. Les témoins positifs sont des cellules traitées pendant 24 h avec les interleukines IL-1 $\beta$  (PHC0814 Thermo Fisher Scientific, 2  $\mu$ g) ou TNF- $\alpha$  (PHC3015 Thermo Fisher Scientific, 10  $\mu$ g) à 10 ng/mL dans le milieu de culture. Après les expositions, les surnageants cellulaires sont récoltés et congelés à -20 °C, ils sont ensuite décongelés le jour de la manipulation. Le protocole fourni avec le kit a été optimisé. Les plaques 96 puits (Nunc maxisorp, thermo scientific) sont incubées durant une nuit à 4 °C avec les anticorps de capture. Entre chaque étape du protocole, les puits sont rincés 3 à 5 fois, avec le tampon PBS / Tween 20 0,05 % (Invitrogen). Les échantillons ne sont pas dilués, hormis pour le modèle Caco-2/HT29-MTX, et le modèle de cellules M pour la mesure de l'IL-8. Dans ces cas, ils sont dilués au 1/100<sup>ème</sup> pour rester dans la gamme. Pour la gamme, les solutions stocks en IL-8, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  sont préparées à 69 ng/mL, 35 ng/mL et 50 ng/mL respectivement, aliquotés puis stockées à -80 °C. Les gammes sont préparées par dilutions en cascades (7 points et un point contrôle). Après 1 h de blocage à température ambiante avec le tampon de dilution (10 % de sérum de veau foetal décomplémenté préparé dans du PBS) les échantillons, la gamme, et les contrôles positifs sont déposés dans la plaque 96 puits et incubés pendant 2 h à température ambiante. Les anticorps de détection

sont ensuite ajoutés aux puits et incubés pendant 1 h à température ambiante. Enfin les puits sont exposés aux enzymes de détection pendant 30 min, toujours à température ambiante. Après cette étape, les puits sont rincés 7 fois avec le tampon PBS Tween 20 0,05 % pendant 30 s sous agitation. Enfin, le substrat TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) est ajouté dans les puits et incubé pendant 30 min, à l'abri de la lumière, avant de stopper la réaction par l'ajout d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 1 M. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm avec correction à 570 nm. Les concentrations en cytokines sont déterminées en pg/mL à partir de la courbe d'étalonnage, préparée en duplicats. Les expériences, comprenant des triplicats biologiques et des duplicats techniques, ont été reproduites 3 fois.

	<b>IL-8</b>	<b>IL-18</b>	<b>TNF-α</b>
<b>Ref BD Biosciences</b>	Eisa Set 555244	Elisa Set 557953	Elisa Set 555212
<b>Anticorps de capture</b>	1/250	1/250	1/250
<b>Anticorps de détection</b>	1/500	1/1000	1/250
<b>Enzyme</b>	1/250	1/250	1/250
<b>1<sup>er</sup> point de gamme</b>	200 pg/mL (4 μL dans 1,380 μL)	250 pg/mL (5 μL dans 700 μL)	500 pg/mL (6 μL dans 600 μL)

Tableau 11 : kits ELISA utilisés.

#### 4.9.2 Essai multiplexé BioPlex MagPix™

Le kit « Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay » (M50-0KCAF0Y, Bio-Rad) a été utilisé pour quantifier 27 cytokines humaines dans le surnageant des cellules exposées au colorant E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub>. Ce test de criblage est basé sur le même principe que les tests ELISA en sandwich : les cytokines sont détectées à la fois par les anticorps associés à des billes magnétiques et des anticorps associés à un fluorophore, la phycoérythrine, excité à 525 nm. Ce test permet de détecter les 27 cytokines simultanément dans chaque échantillon (figure 44). Pour cela, en fonction des cytokines qu'elles détectent, i.e. IL-8 par exemple, les billes magnétiques ont une signature spectrale caractéristique après excitation à 635 nm (grâce à la combinaison de quantités variables de 2 colorants fluorescents). Les cytokines sont donc dans un premier temps classées grâce aux billes magnétiques à 635 nm. Elles sont dans un deuxième temps quantifiées grâce aux anticorps

associés à la phycoérythrine qui est excitée à 525 nm et émet à une longueur d'onde particulière. Les 27 cytokines étudiées sont : FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEG. Le protocole utilisé est celui fourni avec le kit, il a été réalisé en collaboration avec M. Dubosson et C. Marie-Desvergne (LBM, CEA-Grenoble).

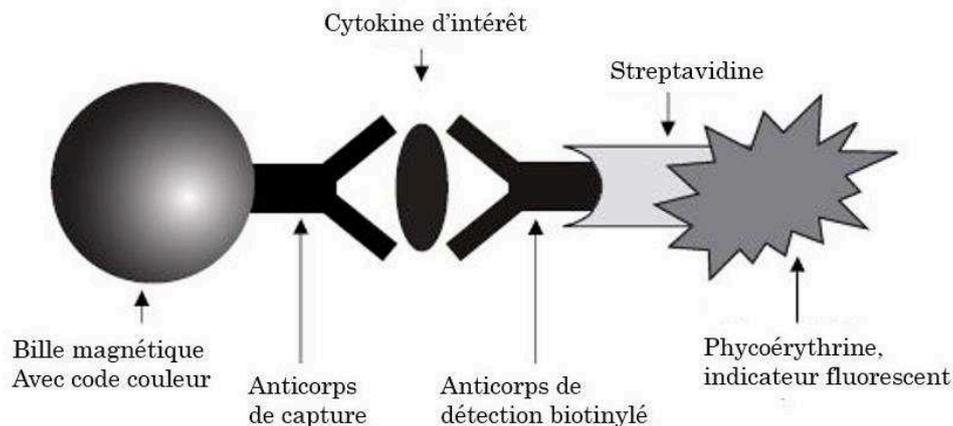


Figure 44 : Principe de l'ELISA BioPlex MagPix<sup>TM</sup>. Ce test permet de détecter et quantifier simultanément 27 cytokines dans un milieu cellulaire. Pour cela, les cytokines sont isolées grâce aux anticorps associés à des billes magnétiques puis détectées et quantifiées grâce à un anticorps associé à un fluorophore, la phycoérythrine. En fonction des cytokines qu'elles reconnaissent les billes magnétiques ont une signature spectrale différente à 635 nm. Les cytokines sont donc, dans un premier temps, triées grâce aux billes magnétiques à 635 nm, puis quantifiées grâce à la phycoérythrine à 525 nm.

#### 4.10 Marquage, quantification blocage de la sécrétion de la couche de mucus

##### 4.10.1 Marquage au bleu Alcian

Le bleu Alcian est un colorant cationique ayant une affinité pour les groupements négatifs des macromolécules. Il colore principalement les mucopolysaccharides et les mucines en milieu acide (pH=2,5) (Walter *et al.*, 1996). Les cellules sontensemencées dans des boîtes de pétri de 60 cm<sup>2</sup> ou dans des plaques 6 puits. Après 21 jours, les épithélia sont rincés plusieurs fois avec du PBS puis fixés avec un mélange d'éthanol à 90°C (3 volumes) d'acide acétique à 3 % (1 volume) pendant 20 min à température ambiante. La solution de fixation est ensuite retirée avant d'ajouter le bleu alcian (Sigma-Aldrich) préparé dans de l'acide acétique (pH 2,5). Après incubation pendant 30 min sous agitation et à température ambiante, le bleu

alcian est retiré et les épithélia sont rincés 2 fois avec du PBS. Les épithélia cellulaires sont ensuite observés au microscope optique (Axiovert 25 Zeiss), les images sont obtenues par l'ajout d'un appareil photo sur le microscope.

#### 4.10.2 Marquage à l'acide périodique de Schiff

Au cours de cette coloration, les glycols sont oxydés en aldéhyde en libérant l'adduit pararosaniline qui colore ensuite les glycoprotéines, glycolipides et mucines de l'épithélium. Il a été utilisé pour évaluer la production du mucus par les cellules HT29-MTX. Les réactifs utilisés dans ce test proviennent du kit de coloration 395B-1KT (Sigma-Aldrich). Les cellules sontensemencées dans des boîtes de pétri de 60 cm<sup>2</sup> ou dans des plaques 6 puits. Avant la coloration, les épithélia sont rincés avec du PBS puis les cellules sont fixées comme décrit pour la coloration au bleu alcian avant d'être rincées 1 min avec de l'eau distillé. Le réactif de Schiff est ensuite ajouté et incubé pendant 15 min à température ambiante puis les épithélia sont rincés pendant 5 min avec de l'eau distillé. Enfin, l'hématoxyline est ajoutée et incubée pendant 90 s et les cellules sont rincées 30 s avec de l'eau. Après la coloration, les images sont obtenues comme décrit pour la coloration au Bleu Alcian.

#### 4.10.3 Quantification par l'acide Périodique de Schiff

Les réactifs sont ceux du kit (395B-1KT Sigma-Aldrich), le protocole a été optimisé à partir du papier de Kilcoyne *et al.*, 2011. Les cellules sont cultivées en plaques 12 puits pendant 21 jours. Le milieu est retiré, les cellules sont récoltées dans un tampon PBS + triton 1X, vortexées, puis 25 µL de chaque condition sont déposés dans une plaque 96 puits, en duplicats technique. 120 µL d'une solution d'acide périodique (dans 50 % d'eau MilliQ) à 0,6 %, préparé dans de l'acide acétique (7 % dans de l'eau MilliQ), sont ajoutés dans chaque puit et incubés pendant 1 h30 à 37 °C. 100 µL de réactif de Schiff sont ensuite ajoutés et incubés pendant 5 min à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation puis pendant 40 min sans agitation. L'absorbance est lue à 550 nm au spectrophotomètre (Molecular Devices, spectramax M2). En parallèle, une gamme préparée avec des mucines porcines, et permet de s'assurer que le dosage fonctionne (mucines d'estomac de porc, M2378 Sigma-Aldrich, 100 à 5000 µg/mL dans la solution PBS et triton 1X).

#### 4.10.4 Blocage de la sécrétion des protéines du mucus

Etant donné que nos résultats préliminaires ont révélé que la méthode de mesure n'était pas suffisamment sensible, nous avons cherché à bloquer la sécrétion des mucines, de façon à quantifier la production cellulaire des mucines extracellulaires avant que celles-ci ne soient sécrétées dans le milieu extracellulaire. Deux antibiotiques connus pour bloquer le transport intracellulaire des protéines ont été utilisés : la bréfeldine A (B6542-5Mg, Sigma-Aldrich) qui bloque le transport des protéines entre les différents organites (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique) et la membrane plasmique (Klausner, 1992), et la tunicamycine (T7765-5Mg Sigma-Aldrich) qui bloque la N-glycosylation et indirectement l'O-glycosylation des protéines entraînant ainsi leur rétention dans la cellule (Shah, 2009). La solution stock de bréfeldine A est préparée à 5 mg/mL dans du DMSO et la tunicamycine à 1 mg/mL dans du DMSO. Des aliquots de 10  $\mu$ L sont préparés et stockés à -20 °C. Des tests MTT ont été réalisés pour déterminer la DL20 de ces deux antibiotiques suivant le protocole décrit dans le point 4.2.3.

D'après les données de la littérature et en fonction des résultats des tests MTT effectués, les cellules HT29-MTX et le modèle cellulaire Caco-2/HT29-MTX ont été exposés en plaque 6 puits pendant 48 h à 0,1  $\mu$ g/mL de bréfeldine A ou à 0,3  $\mu$ g/mL de tunicamycine.

#### 4.11 Quantification de l'activité phosphatase alcaline

##### 4.11.1 Coloration au Fast-Red

Cette coloration permet de mettre en évidence l'activité des enzymes phosphatases alcalines (PAL) présentes dans les microvillosités des entérocytes différenciés. Le substrat Naphtol AS-MX Phosphate (4-Chloro-2-methylbenzenediazonium/3-Hydroxy-2-naphthoic acid 2,4-dimethylanilide phosphate) du kit de coloration est déphosphorylé par les PAL et réagit ensuite avec un deuxième composé du kit, Fast-Red TR, pour former un précipité rouge qui absorbe à 405 nm. Les cellules sont ensemencées dans les boîtes de pétri de 60 cm<sup>2</sup>. Après 21 jours, la coloration est réalisée directement sur les cellules non fixées avec les réactifs du kit SIGMA *FAST*<sub>TM</sub> F4523 (Sigma-Aldrich). Les deux réactifs sont sous forme de tablette, les

substrats et le Tris sont dissous dans 10 mL d'eau MilliQ. La solution est ajoutée dans les boîtes de pétri et incubée pendant 1 h à 37°C. La solution de coloration doit être utilisée dans l'heure pour de meilleurs résultats. Cette solution est ensuite retirée et de l'eau MilliQ est ajoutée pour stopper la réaction. Après la coloration, les images sont obtenues comme pour les deux colorations précédentes.

#### 4.11.2 Mesure de l'activité phosphatase alcaline

Ce test permet de mesurer l'activité des phosphatases alcalines qui sont spécifiques de la présence de microvillosités dans les entérocytes différenciés. En effet, le substrat pNPP (para-nitrophénylphosphate) est déphosphorylé par ces enzymes et fluoresce à 440 nm après excitation à 360 nm. Cette activité a été mesurée avec le kit de fluorométrie K422-500 (Biovision). Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits et cultivées pendant 21 jours. Le protocole fourni avec le kit a été utilisé pour la préparation des réactifs et la courbe d'étalonnage, qui permet de s'assurer que le protocole a fonctionné. Pour la quantification de l'activité enzymatique par fluorescence, plusieurs protocoles adaptés du protocole du fournisseur ont été testés. Ils sont présentés dans le tableau 12.

##### **Essai 1 : « mesure dans le surnageant »**

- pipeter le surnageant de la plaque 24 puits
- transférer 230 µL dans un tube (duplicats techniques)
- déposer 110 µL dans la plaque 96 puits noirs
- ajouter 20 µL/ puit du substrat MUP à 0,5 mM
- laisser 35 min à température ambiante, dans le noir
- ajouter 20 µL/ puit de solution STOP
- lecture exc/em 360 nm /440 nm

##### **Essai 2 : « mesure dans les cellules trypsinées »**

- ajouter 250 µL Trypsine/puit 12 min 37 °C
- ajouter 250 µL de milieu, compter
- centrifuger 250 rcf 5 min
- retirer le surnageant, puis laver au PBS, puis centrifugation
- ajouter le tampon du kit : 230 µL/tube (duplicats techniques)
- centrifugation, 13 000 rcf 3 min
- récolte du surnageant, dépôt de 110 µL/puit plaque 96 puits noirs
- ajouter 20 µL/ puit du substrat MUP à 0,5 mM
- laisser 35 min à température ambiante, dans le noir
- ajouter 20 µL/ puit de solution STOP
- lecture exc/em 360 nm /440 nm

**Essai 3 : mesure dans les cellules et le surnageant**

- ajouter directement dans la plaque 24 puits 40  $\mu\text{L}$ /puits de substrat MUP à 0,5 mM
- laisser incuber 20 min dans le noir, TA
- ajouter 40  $\mu\text{L}$ /puits de solution STOP
- Transférer dans la plaque 96 puits (duplicats techniques)
- lecture exc/em 360 nm /440 nm

**Essai 4 : « mesure dans les Cellules, dans le puits »**

- retirer le surnageant des puits
- ajouter 200  $\mu\text{L}$ /puits de tampon
- ajouter 40  $\mu\text{L}$ /puits de substrat MUP à 0,5 mM
- laisser incuber 20 min dans le noir, TA
- ajouter 40  $\mu\text{L}$ /puits de solution STOP
- Transférer dans la plaque 96 puits (duplicats techniques)
- lecture exc/em 360 nm /440 nm

Tableau 12 : Protocoles testés pour la quantification de l'activité phosphatase Alcaline dans les cellules.

L'essai 2 qui permet de mesurer l'activité de la phosphatase alcaline par rapport au nombre total de cellules est celui qui a été utilisé pour caractériser les modèles cellulaires. Les résultats sont donnés en unité de fluorescence par cellule.

## 5. Analyse statistique

Dans nos conditions, du fait de la non-normalité/hétéroscédasticité des données, les tests paramétriques (ANOVA et t-test) ne sont pas appropriés. La significativité statistique est alors 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), ou comparaisons multiples des moyennes par groupe. Les résultats sont considérés comme étant statistiquement significatifs lorsque la p-value est inférieure à 0,05. Le logiciel Statistica 8.0 (Statsoft, Chicago, USA) a été utilisé pour l'analyse statistique des données.

# CARACTERISATION : MODELES CELLULAIRES ET PARTICULES

---

Ce troisième chapitre présente les résultats obtenus lors de la caractérisation des modèles cellulaires et des particules de TiO<sub>2</sub> utilisés dans ces travaux de thèse. Dans un premier temps, le modèle cellulaire composé de cellules Caco-2, et le modèle composé de cellules Caco-2 en coculture avec les cellules HT29-MTX, ont été caractérisés par des tests mettant en évidence la présence d'entérocytes et la sécrétion du mucus. Le modèle de coculture des cellules Caco-2(C1) et RajiB, qui est un modèle de plaques de Peyer, a quant à lui été caractérisé en mettant en évidence la présence de cellules M au sein de l'épithélium de cellules Caco-2(C1). Enfin, la résistance transépithéliale (TEER) des épithélia cellulaires a été mesurée afin de s'assurer de leur l'intégrité.

Dans un second temps, sont présentées les caractéristiques physico-chimiques du colorant E171 et des NPs de TiO<sub>2</sub> A12 et P25, ainsi que les résultats obtenus lors de la dispersion des particules en vue d'effectuer des expositions aiguës et chroniques.

## *Partie I : modèles cellulaires*

Les modèles cellulaires ont été cultivés pendant 21 jours, qui est la période nécessaire pour que la majorité des cellules soient différenciées et acquièrent leurs caractéristiques particulières : pour les entérocytes (Caco-2) la présence de microvillosités apicales et d'activités enzymatiques spécifiques, i.e. l'activité phosphatase alcaline ; pour les cellules caliciformes (HT29-MTX) ; la sécrétion de mucus et la différenciation des entérocytes en cellules M (Artursson *et al.*, 2012; des Rieux *et al.*, 2007; Schimpel *et al.*, 2014).

### 1. Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX

La monoculture de cellules Caco-2 est un modèle d'épithélium intestinal composé d'entérocytes jointifs alors que la coculture de cellules Caco-2 (70 % des cellules, en nombre) et de cellules HT29-MTX (30 %), est un modèle d'épithélium intestinal composé d'entérocytes et de cellules sécrétant une couche de mucus recouvrant l'épithélium (Chen *et al.*, 2010; Lesuffleur *et al.*, 1990; Walter *et al.*, 1996). Ces proportions représentent le meilleur équilibre entre un épithélium jointif, c'est-à-dire un épithélium contenant suffisamment de cellules Caco-2 qui forment les jonctions serrées, et une couche de mucus homogène, sécrétée par les cellules HT29-MTX. Cette proportion découle des résultats obtenus par Schimpel *et al.*, (2014) qui ont ensemencé ces deux modèles cellulaires selon plusieurs ratios (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7) et étudié leurs caractéristiques.

Ces deux modèles cellulaires sont largement utilisés pour étudier la toxicologie et le transport de molécules, particules ou NPs à travers l'épithélium intestinal (Artursson *et al.*, 2012; Gerloff *et al.*, 2009; Koeneman *et al.*, 2009; Pontier *et al.*, 2001).

Les épithélia sont différenciés, à partir de 15-21 jours post-confluence il est alors possible de les caractériser. Lorsqu'ils sont différenciés, les entérocytes présentent des microvillosités sur leur membrane apicale. Ces microvillosités sont le siège d'activités enzymatiques caractéristiques comme la phosphatase alcaline, la

lactase, l'aminopeptidase-N, la sucrase-isomaltase (Lea, 2015). Quant aux cellules HT29-MTX, elles ont été obtenues par la sélection et l'isolation de sous-populations HT29, résistantes à des expositions élevées et prolongées à du méthotrexate. Ces sous populations étaient majoritairement sécrétrices de mucus (Lesuffleur *et al.*, 1990). Ensuite ces cellules secrètent le mucus de façon stable, sans qu'il ne soit nécessaire de prolonger l'exposition au méthotrexate. La sécrétion de mucus est visible une semaine post-confluence (Lesuffleur *et al.*, 1993).

À l'œil nu, lors de l'entretien des modèles cellulaires, il est possible de voir la couche de mucus qui recouvre l'épithélium, elle a un aspect brillant et visqueux lorsque l'on fait jouer les reflets de lumière sur l'épithélium. Cependant, afin de bien caractériser ces deux modèles cellulaires, trois tests de coloration et une mesure d'activité enzymatique ont été utilisés. La coloration au bleu Alcian et celle à l'acide périodique de Schiff ont permis de directement colorer la couche de mucus alors que la coloration Fast-Red a permis de mettre en évidence l'activité phosphatase alcaline des entérocytes au sein des épithélia. Enfin, la diminution de l'activité de la phosphatase alcaline de l'épithélium du modèle Caco-2/HT29-MTX a permis de mettre en évidence la présence des cellules HT29-MTX au sein de l'épithélium.

### 1.1 Bleu Alcian

Le colorant bleu Alcian utilisé est un colorant cationique ayant une affinité plus importante pour les groupements négatifs des macromolécules, il colore ainsi principalement les muco-polysaccharides et les mucines en milieu acide (pH=2,5) (Walter *et al.*, 1996). Ce colorant a été utilisé pour colorer les épithélia Caco-2 et HT29-MTX en monoculture et la coculture Caco-2/HT29-MTX (figure 45).

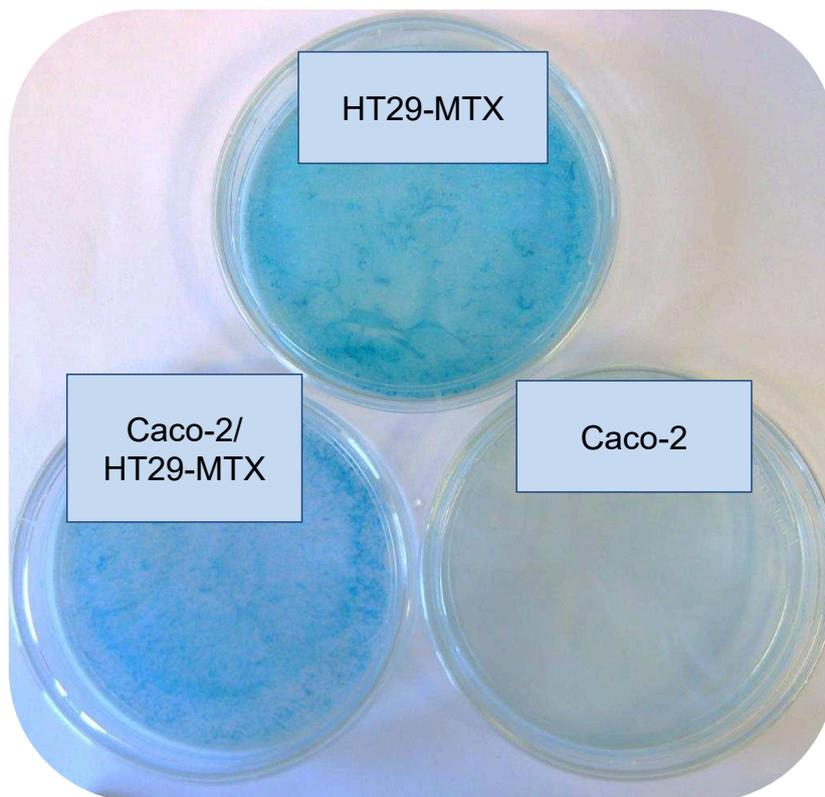


Figure 45 : Coloration au bleu Alcian des modèles cellulaires Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX et de la lignée cellulaire HT29-MTX. Photographie des boîtes de pétri.

Grâce à cette coloration, nous voyons bien que le bleu Alcian permet de différencier des cellules Caco-2 en monoculture, ne sécrétant pas de mucus, alors colorées en bleu ciel (figure 46A), des cellules HT29-MTX sécrétant le mucus alors colorées en bleu plus foncé (figure 46B). Nous avons mis en évidence que la coculture Caco-2/HT29-MTX sécrète bien du mucus, que l'on observe par les zones colorées en bleu foncé présentes dans l'épithélium (figure 47C et 47A). Il est important de noter que dans le modèle de coculture, le mucus se répartit de façon inhomogène : il recouvre des zones peuplées par les cellules HT29-MTX. Ainsi, les cellules ne se répartissent pas de façon homogène dans la coculture.

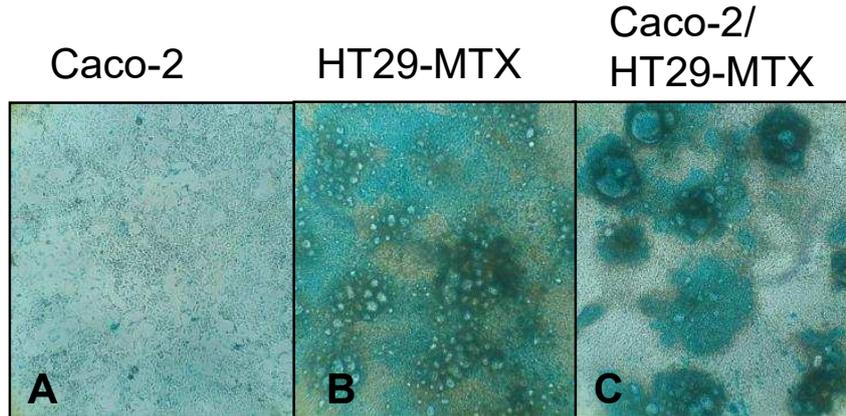


Figure 46 : Coloration au bleu Alcian des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX. Photographies prises au microscope (objectif x10). A) monoculture Caco-2. B) cellules HT-29-MTX. C) coculture Caco-2/HT29-MTX.

### 1.2 Acide périodique de Schiff (APS)

La coloration à l'acide périodique de Schiff est une coloration en plusieurs étapes. L'acide périodique est un oxydant puissant qui rompt la liaison covalente entre deux fonctions -OH des glucopyranoses, créant des fonctions aldéhyde. Celles-ci réagissent ensuite avec le réactif de Schiff, libérant un adduit pararosaniline qui colore les glucides oxydés (kit 395B-1KT, Sigma-Aldrich). Cette coloration permet de mettre en évidence les glycolipides des membranes cellulaires, les mucines du mucus et les glycoprotéines qui sont colorés en rose.

Avec ce second test, nous cherchions à obtenir un résultat plus sensible et quantifiable. Cependant il s'avère que cette coloration est moins sensible que celle au bleu Alcian, le bruit de fond est important puisque la coloration est déjà bien marquée dans la monoculture Caco-2, qui ne sécrète pas de mucus (figure 47A). Cependant, il est toutefois possible de voir une différence de coloration entre les deux modèles cellulaires (figure 47B). Les cellules Caco-2 sont marquées en rose foncé alors que les cellules HT29-MTX sont marquées en violet plus sombre (figure 47B). Ce test confirme que la coculture Caco-2/HT29-MTX sécrète bien du mucus et que celui-ci se répartit de façon inhomogène en recouvrant principalement des zones peuplées par les cellules HT29-MTX.

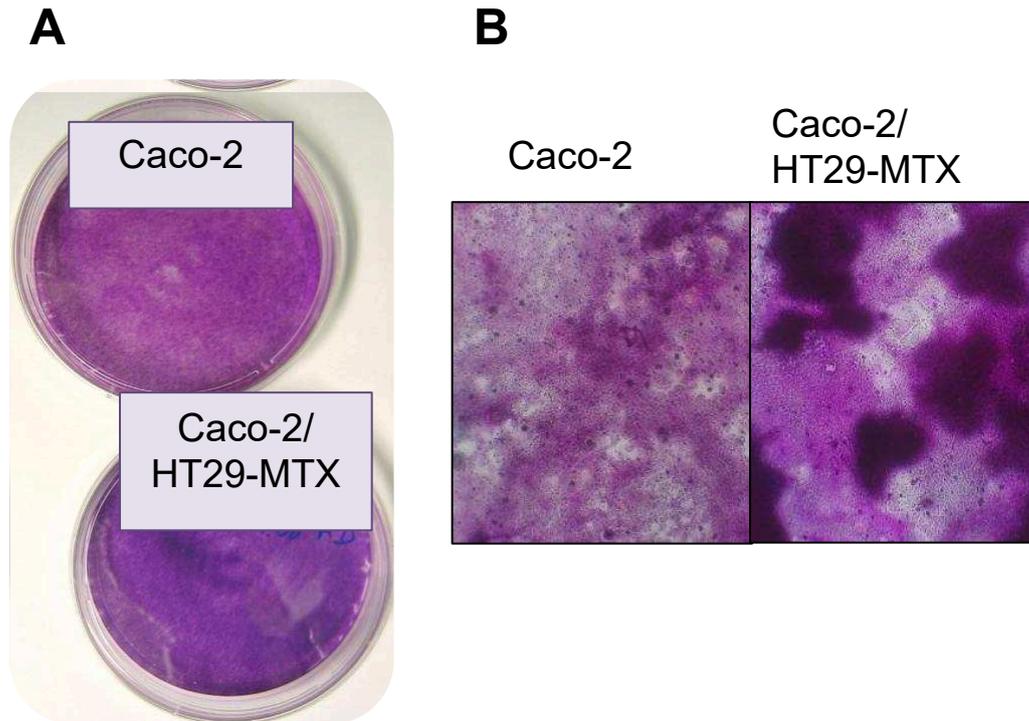


Figure 47 : Coloration à l'acide périodique de Schiff de la monoculture Caco-2 et de la coculture Caco-2/HT29-MTX. A) Photographies des boîtes de pétri. B) Photographies réalisées sur le microscope (objectif x10).

### 1.3 Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une glycoprotéine catalysant une réaction de déphosphorylation des molécules et macromolécules biologiques par hydrolyse. Au niveau de l'intestin, les phosphatases alcalines humaines sont présentes et actives dans les microvillosités des entérocytes (Harris, 1990). Dans la coloration de la phosphatase alcaline utilisée ici, le substrat Naphtol AS-MX Phosphate du kit de coloration SIGMA *FAST*<sub>TM</sub> (Sigma-Aldrich) est déphosphorylé par la phosphatase alcaline, il réagit ensuite avec le deuxième réactif du kit, le composé Fast-Red TR, et forme un précipité rouge qui absorbe à 405 nm.

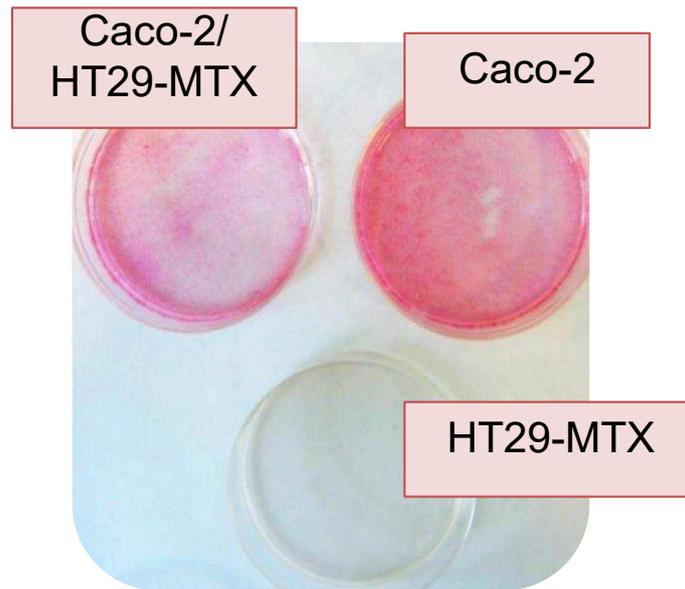


Figure 48 : Coloration Fast-Red des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX. Photographies des boîtes de pétri colorées des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX.

Grâce à cette méthode, la présence de l'activité de la phosphatase alcaline est facilement observable, à l'œil nu (figure 48) ou au microscope (figure 49), par une coloration rouge, que l'on voit dans le modèle de monoculture de Caco-2 (figure 49A) alors que cette coloration est totalement absente pour la lignée cellulaire HT29-MTX (figure 49B). Le modèle cellulaire Caco-2/HT29-MTX est coloré en rouge plus clair, ce qui montre bien la présence des entérocytes mais aussi des cellules HT29-MTX, dépourvues de microvillosités, au sein de l'épithélium (figure 48 et 49C).

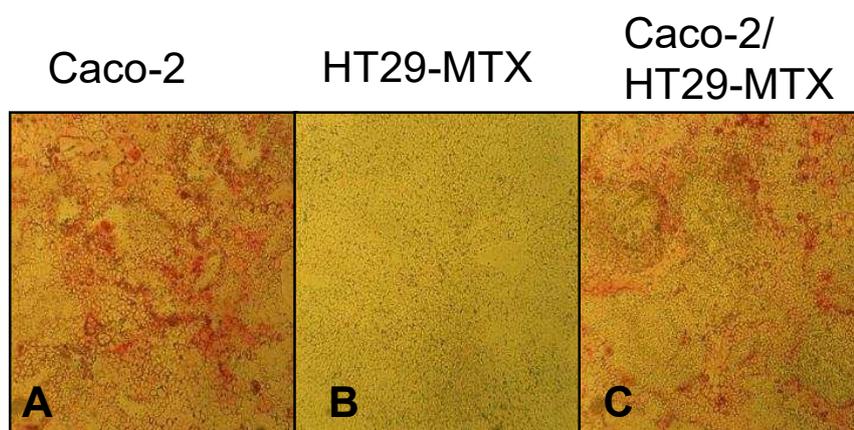


Figure 49 : Coloration Fast-Red des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX. Photographies réalisées sur le microscope (objectif x10). A) cellules Caco-2. B) cellules HT29-MTX. C) cellules Caco-2/HT29-MTX.

#### 1.4 Mesure de l'activité phosphatase alcaline

Nous avons mesuré l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline dans le modèle cellulaire Caco-2 à l'aide du kit de fluorométrie K422-500 (Biovision). L'intensité de fluorescence obtenue est de  $34757 \pm 13210$  RFU, alors qu'elle est de  $791 \pm 137$  RFU dans la lignée cellulaire HT29-MTX (figure 50). Dans le modèle cellulaire Caco-2/HT29-MTX, l'intensité de fluorescence est de  $14003 \pm 3507$  RFU, ce résultat intermédiaire montre bien que ce modèle est composé à la fois de cellules Caco-2 qui expriment l'activité phosphatase alcaline, et de cellules HT29-MTX ne possédant pas de microvillosités (figure 50).

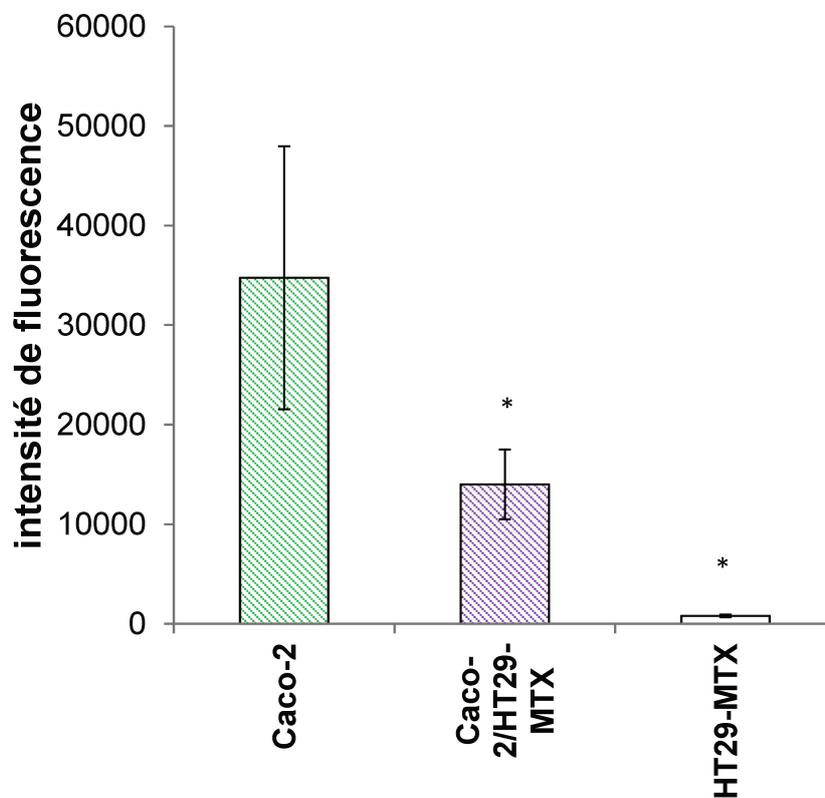


Figure 50 : Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline des monocultures Caco-2 et HT29-MTX et de la coculture Caco-2/HT29-MTX. L'intensité de fluorescence (RFU) représentative ici de l'activité de la phosphatase alcaline est mesurée dans les monocultures Caco-2 et HT29-MTX et la coculture Caco-2/HT29-MTX, \* $p < 0,05$ .

## 1.5 Conclusion

L'ensemble de ces tests a permis de mettre en évidence que le modèle de coculture Caco-2/HT29-MTX est bien composé d'entérocytes qui expriment l'activité phosphatase alcaline et de cellules HT29-MTX qui sécrètent du mucus. Le modèle de monoculture de Caco-2 ne sécrète pas de mucus et présente une activité phosphatase alcaline plus forte. D'autre part dans la coculture, la sécrétion du mucus est inhomogène et concentrée au niveau des cellules HT29-MTX.

## 2. Caco-2(C1)/RajiB

La coculture de cellules Caco-2(Clone1) et de cellules RajiB, est un modèle d'épithélium intestinal associé aux plaques de Peyer, il est composé d'entérocytes et de cellules Microfold (M).

Les cellules M sont issues de la différenciation d'entérocytes ; elles n'ont pas de microvillosités et présentent une activité phosphatase alcaline réduite (Mowat, 2003). En revanche elles expriment à leur surface des marqueurs spécifiques tels que le récepteur C5aR ou la glycoprotéine 2 (GP2).

Pour obtenir ce modèle, les cellules Caco-2(C1) sont cultivées seules pendant 14 jours dans le compartiment apical de plaques Transwell puis les lymphocytes RajiB sont ajoutés dans le compartiment basolatéral du Transwell. Ils induisent alors la différenciation de 15 à 30% des entérocytes en cellules M. L'entretien des lignées cellulaires Caco-2(C1) et RajiB ainsi que du modèle de coculture Caco-2(C1)/RajiB est décrit dans le chapitre 2 (des Rieux *et al.*, 2007).

La différenciation des entérocytes en cellules M peut être caractérisée suivant différentes approches. L'approche « directe » consiste à identifier la présence de marqueurs spécifiques de cellules M au sein de l'épithélium alors que l'approche « indirecte » consiste à montrer que les propriétés/caractéristiques de l'épithélium sont modifiées et donc de conclure quant à la présence des cellules M.

Afin de caractériser ce dernier modèle cellulaire, nous avons cherché à immunomarquer deux marqueurs protéiques spécifiques : le récepteur C5aR et la glycoprotéine 2 (GP2). Ces récepteurs membranaires sont exprimés sur la membrane apicale des cellules, ils sont impliqués dans la fonction immunitaire des

cellules M, i.e. reconnaissance, transport d'antigènes et macromolécules jusqu'aux follicules lymphoïdes sous-jacent (Kim and Jang, 2014; Mabbott *et al.*, 2013; Ohno and Hase, 2010). C5aR est le récepteur à l'anaphylatoxine C5a, un peptide du complément de la réponse immunitaire innée (S.-H. Kim *et al.*, 2011; Sayah *et al.*, 1998). Le récepteur GP2 quant à lui initie la transcytose d'antigènes bactériens et reconnaît les bactéries pathogènes et commensales grâce à l'antigène FimH, un composant des pilis, les protéines d'adhésion des bactéries Gram<sup>-</sup> (Hase *et al.*, 2009; Ohno and Hase, 2010).

La présence de ces marqueurs a été évaluée par immunofluorescence, Western Blot, et RT-qPCR. Pour finir, la diminution de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline dans les épithélia a permis de mettre en évidence la présence des cellules M par une méthode indirecte ; selon les méthodes décrites dans les chapitres précédents.

## 2.1 Immunofluorescence

Le marquage du récepteur C5aR par immunofluorescence n'a pas été concluant car le bruit de fond était important et ne permettait pas de distinguer les cellules M. Soit le récepteur C5aR n'est pas un bon marqueur pour les cellules M, soit l'anticorps que nous avons utilisé manquait de spécificité car les contrôles négatifs (monocultures de Caco-2) étaient également immunomarqués. D'autre part, l'observation microscopique en immunofluorescence était rendue difficile par la croissance en multicouches de ce modèle cellulaire. L'immunofluorescence ne semblait pas être la technique la plus adaptée pour caractériser ce modèle cellulaire.

## 2.2 Western Blot

Nous avons ensuite ciblé les protéines C5aR (39 kD) et GP2 (43 kD) des cellules M au sein de l'épithélium grâce à des anticorps primaires anti-C5aR et anti-GP2 que nous voulions détecter par Western Blot.

A nouveau, il n'a pas été possible de différencier l'épithélium Caco-2(C1) en monoculture de l'épithélium Caco-2(C1)/cellules M. Ce résultat pourrait être dû à un trop faible nombre de cellules M dans la coculture, entraînant la présence d'une

trop faible quantité de C5aR et de GP2, qui n'ont pas pu être correctement détectés du fait du manque de sensibilité de la technique du Western Blot.

### 2.3 RT-qPCR

Avec ce troisième test, nous avons détecté l'expression des gènes codant les protéines C5aR et GP2 au sein du modèle de coculture, en comparaison avec les cellules Caco-2(C1) en monoculture.

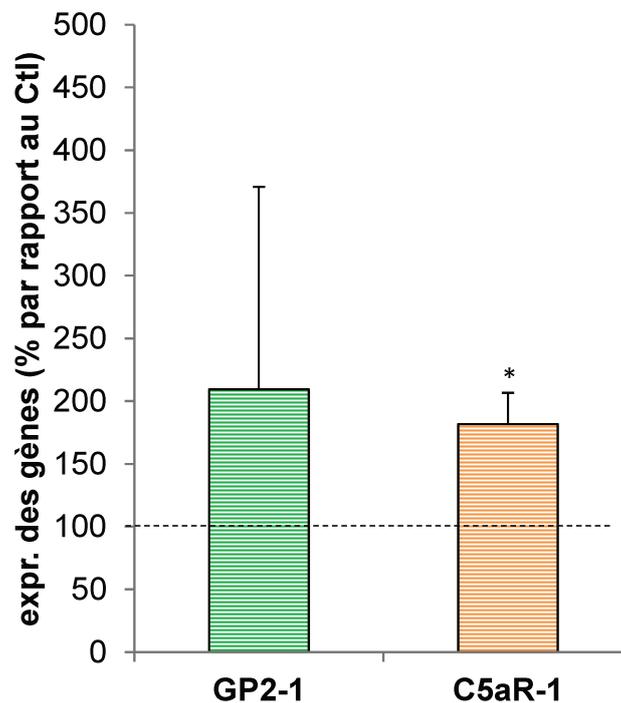


Figure 51 : Expression des gènes codant les protéines GP2 et C5aR. Les résultats obtenus par RT-qPCR sont exprimés comme rapport par rapport au contrôle, c'est à dire aux cellules Caco-2(C1) uniquement, GP2-1 et C5aR-1 correspondent aux amorces qui ont été utilisée dans cette manipulation (voir chapitre 2), \*p<0,05.

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une surexpression significative du gène codant la protéine C5aR avec une expression relative de 181,7±33,8 % par rapport au contrôle, dans le modèle Caco-2(C1)/RajiB. En revanche l'expression relative de GP2 dans la coculture, n'est pas significativement différente de celle de la monoculture, en effet le rapport des deux est de 209,4±110,6 % (figure 51).

Ces résultats confirment qu'il a bien des cellules M dans notre modèle de coculture Caco-2(C1)/RajiB, même si ces résultats devraient être confirmés par une autre méthode.

#### 2.4 Dosage de l'activité phosphatase alcaline

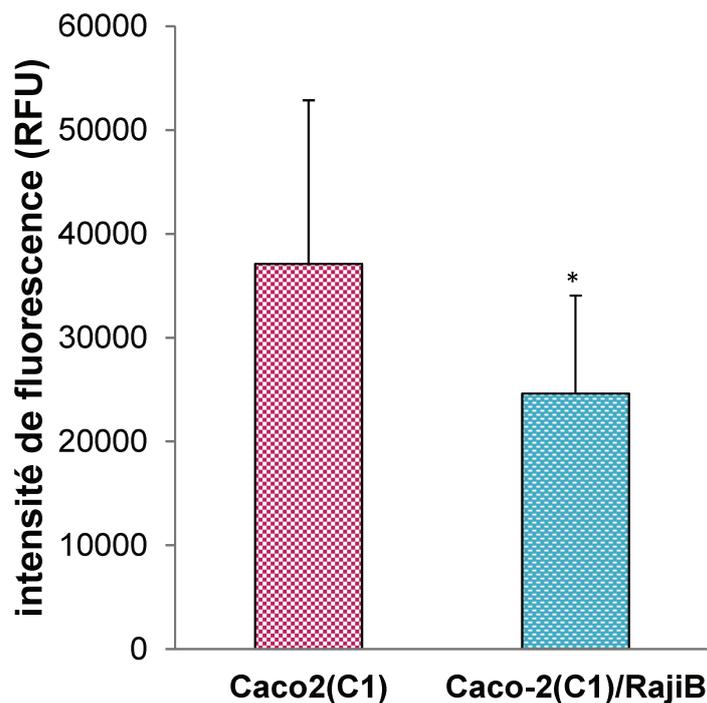


Figure 52 : Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline dans le modèle cellulaire de coculture Caco-2(C1)/RajiB. \* $p < 0,05$ .

Nous avons mesuré l'activité de la phosphatase alcaline comme précédemment. Dans le modèle cellulaire Caco-2(C1) l'intensité de fluorescence obtenue est de  $37110 \pm 15755$  RFU. Dans le modèle cellulaire Caco-2(C1)/RajiB, elle est significativement plus faible, avec  $24613 \pm 9441$  RFU (figure 52), ce qui confirme la présence de cellules ne présentant pas de microvillosités, donc des cellules M, au sein de l'épithélium.

## 2.5 Conclusion

La caractérisation du modèle de plaque de Peyer est rendue difficile par le peu de marqueurs spécifiques disponibles pour identifier les cellules M. D'autre part, du fait de la faible proportion d'entérocytes qui se différencient en cellule M dans la coculture, la méthode de caractérisation doit être sensible (Ohno, 2016). Pour ces raisons malgré nos efforts nous n'avons pu obtenir qu'une réponse partielle. Ainsi nous avons observé une diminution du nombre de cellules présentant des microvillosités, ainsi qu'une expression significativement plus importante de C5aR dans le modèle de coculture, comparativement au modèle de monoculture.

## 3. Intégrité des épithélia intestinaux par mesure TEER

La mesure de la résistance transépithéliale (TEER) permet de s'assurer de l'intégrité des jonctions cellulaires mises en place au sein des épithélia, *in vitro*. Cette mesure permet à la fois de caractériser l'épithélium, mais aussi d'évaluer l'effet de composé chimiques ou de particules pouvant affecter la perméabilité épithéliale et donc ces valeurs TEER (Srinivasan *et al.*, 2015).

### 3.1 Avant exposition aux particules

L'intégrité des épithélia cellulaires a été mesurée après 21 jours de différenciation cellulaire, avant l'exposition des cellules au colorant E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub>. Pour le modèle cellulaire Caco-2, la TEER est de 3942±147 Ω.cm<sup>2</sup> et pour le modèle cellulaire Caco-2/HT29-MTX elle est de 302±12 Ω.cm<sup>2</sup> (figure 53). Dans la littérature, les valeurs TEER pour le modèle cellulaire Caco-2 sont généralement de l'ordre de 150 à 1400 Ω.cm<sup>2</sup> (Schimpel *et al.*, 2014; Srinivasan *et al.*, 2015). D'autres études ont rapporté des valeurs de TEER plus élevées (Lu et al, 1996). La TEER semble dépendante du sous-clone de Caco-2 qui est utilisé ainsi que de paramètres techniques comme le nombre de passage, le milieu de culture, l'état de différenciation, la température lors de la mesure etc. (Srinivasan *et al.*, 2015). Dans le modèle cellulaire Caco-2/HT29-MTX, la TEER est diminuée à cause de la présence des cellules HT29-MTX, qui forment moins de jonctions serrées que les cellules Caco-2 (Walter *et al.*, 1996). Une étude montre qu'en fonction du ratio de

cellules Caco-2 et HT29-MTX dans l'épithélium, la TEER varie. Pour un ratio similaire à celui de notre modèle, i.e. 7:3 (Caco-2 : HT29-MTX), la TEER est de  $340 \pm 6 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ; pour un ratio 6:4 la TEER est de  $311 \pm 7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Schimpel *et al.*, 2014). Les valeurs de TEER que nous obtenons sont donc conformes à celles rapportées dans la littérature, et considérées comme représentatives d'épithélia intermédiaires, alors que des valeurs de  $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  et plus sont généralement mesurées dans des épithélia dits « serrés » et celles de  $50-100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , dans des épithélia faiblement jointifs (Srinivasan *et al.*, 2015). Nous pouvons donc considérer que dans notre modèle l'épithélium est jointif et que la perméabilité épithéliale est contrôlée.

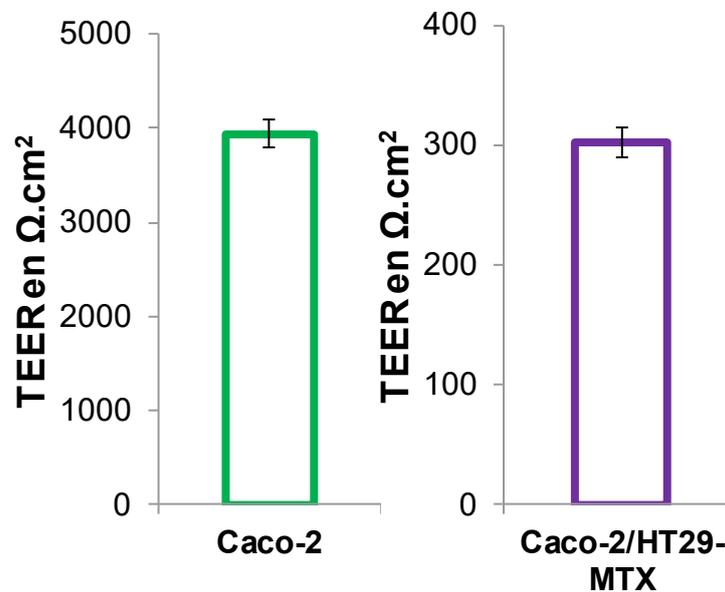


Figure 53 : Mesure de la TEER des modèles cellulaires Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX, en tant que contrôle. La valeur TEER des épithélia Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX est mesurée à l'aide de deux électrodes placées dans les inserts du Transwell associées à un multimètre (Millicell® ERS-2, Millipore).

## *Partie II : caractérisation des particules de TiO<sub>2</sub>*

Comme discuté dans le chapitre 1, des effets biologiques des particules de TiO<sub>2</sub> très variés, parfois même contradictoires, sont mis en évidence par différents travaux de recherche. En dehors de la composition chimique des particules, d'autres caractéristiques peuvent influencer leur l'impact. Il peut s'agir de caractéristiques physico-chimiques telles que la forme, la structure cristalline, la taille, l'état de surface etc., ou encore de l'état de dispersion des NPs (Oberdörster *et al.*, 2005; Sayes *et al.*, 2006).

Dans cette partie sont donc présentées les caractéristiques physico-chimiques puis l'état d'agglomération des particules du colorant E171 et des deux NPs de TiO<sub>2</sub>, A12 et P25

### 1. Le colorant E171

Cinq lots de poudres (Lot A-B-C-D-E) du colorant alimentaire E171 ont été commandés sur internet et caractérisés en collaboration avec l'équipe de Nathalie Herlin-Boime (CEA-Saclay).



Figure 54 : Exemple de poudre du colorant E171, commercialisée sur un site internet.

Concernant ces différents lots commerciaux de poudre E171, la surface spécifique des particules (SSA en m<sup>2</sup>/g) a été déterminée par la méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET), la taille primaire des particules et leur distribution par microscopie électronique à transmission (MET), la structure cristalline par diffraction des rayons X (DRX) et enfin la stabilité des particules en suspension, par turbidimétrie. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

	SSA (m <sup>2</sup> /g)	D. moy. theor. (nm)	D.MET (nm)	%<100 nm	DRX
E171 A	9,4	160	119±65	47	Anatase
E171 B	12,4	121	117±41	40	Anatase + traces rutile
E171 C	8,4	180	136±53	30	Anatase + traces rutile
E171 D	10,8	139	100±36	55	Anatase
E171 E	11,8	128	109±37	45	Anatase + traces rutile

Tableau 13 : Caractérisation physico-chimique des différents lots du colorants E171. La surface spécifique (SSA (m<sup>2</sup>/g)) est obtenue par Brunauer, Emmett et Teller (BET), le diamètre moyen théorique (D. moy. Theor. (nm)) est déterminé à partir de la SSA par l'équation de Sherrer, le diamètre des particules (D.MET (nm)) est obtenu par microscopie électronique à transmission (MET), le pourcentage (%<100 nm) de particules inférieures à 100 nm est quantifié grâce aux mesures de microscopie électronique (MET), enfin la structure cristalline est obtenue par diffraction des rayons X (DRX).

Les différents lots de poudre ont des caractéristiques proches, ils sont tous majoritairement constitués de particules de TiO<sub>2</sub> de structure anatase, et 3 des 5 lots présentent aussi des traces de rutile ; leur surface spécifique est proche, allant de 8,4 à 12,4 m<sup>2</sup>/g. Plus la surface spécifique est grande et plus les particules sont réactives (INRS, 2013). Le diamètre moyen des particules se situe entre 100±36 nm et 136±53 nm et 30 à 55 % des particules sont sous forme nanoparticulaire. Mis à part le lot E171-D, les lots de E171 que nous avons caractérisés ne sont pas

considérés comme des nanomatériaux selon la recommandation de définition européenne<sup>34</sup> des nanomatériaux, car ils contiennent moins de 50 %, en nombre, de particules dont au moins l'une des dimensions est inférieure à 100 nm.

Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi une seule poudre représentative de ces 5 lots, la E171-A, pour mener les études d'effets sur les modèles intestinaux dans le cadre de ce travail.

Ces particules ont été mises en suspension et leur état de dispersion a été évalué par mesure de diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un zetasizer Nano ZS (Malvern). Pour pouvoir comparer les résultats entre eux et s'assurer de la reproductibilité des régimes d'expositions, ces mesures sont également réalisées avant chaque série d'expositions.

Cette mesure est réalisée dans de l'eau et dans le milieu de culture ; elle nous donne des informations sur le diamètre des particules dans la suspension (aussi appelé diamètre hydrodynamique, il tient compte des interactions des particules avec le solvant), l'indice de polydispersité des particules (est-ce que les tailles des particules sont très disparates) et donc de l'état d'agglomération des particules.

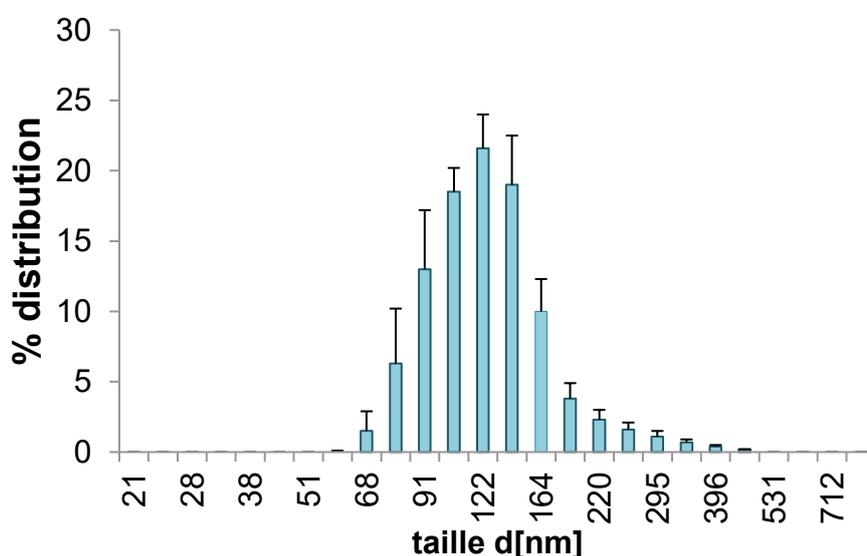


Figure 55 : Diagramme de distribution de taille dans l'eau des particules E171 mesurée par DLS.

<sup>34</sup> Consultée sur [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-11-1202\\_fr.htm?locale=en](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_fr.htm?locale=en) (15/06/16)

Dans l'eau, les particules du colorant E171 ont un diamètre hydrodynamique se situant entre 68 nm et 295 nm (figure 55). Le diamètre hydrodynamique moyen des particules est de  $415,4 \pm 69,5$  nm, avec un pic de distribution du diamètre des particules se situant à  $110,8 \pm 16,8$  nm. L'indice de polydispersité est de  $0,48 \pm 0,071$  nm, qui est une valeur haute qui signifie que la poudre est très polydisperse. L'observation en microscopie électronique ne révèle pas une agglomération importante de la suspension, donc cette polydispersité s'explique par des tailles de grain allant de très fine à très importante. Lorsque les particules sont ajoutées à du milieu de culture complet, préalablement filtré à  $0,22 \mu\text{m}$ , le diamètre hydrodynamique moyen des particules augmente et atteint  $739,3 \pm 355,3$  nm. L'indice de polydispersité augmente et atteint  $0,64 \pm 0,221$ , suggérant que les particules s'agglomèrent.

Les valeurs du potentiel zêta des particules, dans l'eau et dans le milieu de culture, sont présentées dans le tableau 14. Les particules de E171-A sont chargées négativement dans l'eau et le milieu de culture. Dans le milieu de culture, la valeur du potentiel zêta est proche de 0, ce qui suggère que les particules auront tendance à s'agglomérer.

	$\zeta$ dans l'eau (mV)	$\zeta$ dans le milieu d'exposition (mV)
E171 A	$-31,3 \pm 1,04$	$-19 \pm 0,7$

Tableau 14 : Potentiel zêta des particules E171. Le potentiel zêta est mesurée dans de l'eau et dans du milieu de culture.

## 2. Les NPs de $\text{TiO}_2$ : A12 et P25

Les résultats des caractérisations de A12 et P25 sont présentés dans le tableau 15. Ces poudres sont des nanomatériaux d'après la recommandation de la définition européenne citée dans le paragraphe précédent.

	SSA (m <sup>2</sup> /g)	D. MET (nm)	DRX	ζ dans l'eau (mV)	ζ dans le milieu d'exposition (mV)
A12	83	12	95% anatase, 5% rutile	20,0±0,6	-10,8±0,6
P25	46	24	86% anatase, 14% rutile	-6,4±0,3	-11,2±0,8

Tableau 15 : Caractérisation physico-chimique des NPs de TiO<sub>2</sub> A12 et P25. La surface spécifique SSA (m<sup>2</sup>/g) est obtenue par Brunauer, Emmett et Teller (BET), le diamètre des particules (D.) (nm) est obtenu par microscopie électronique en transmission (MET), le pourcentage (%) de particules inférieures à 100 nm sont aussi quantifiées par microscopie MET, la structure cristalline est obtenue par diffraction des rayons X (DRX), le potentiel zêta (ζ) est mesuré dans de l'eau et dans du milieu de culture au Zetasizer.

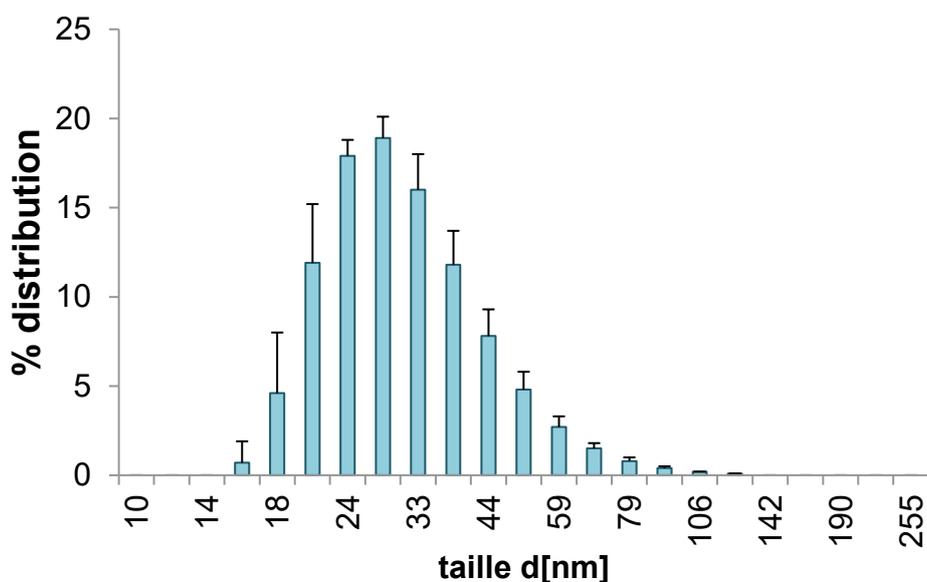


Figure 56 : Diagramme de distribution de taille dans l'eau des particules A12 mesurée par DLS.

Dans l'eau, les NPs A12 ont un diamètre en solution se situant entre 15 nm et 91 nm (figure 56). Le diamètre hydrodynamique moyen des particules en suspension est de 85±2,9 nm, avec le pic de distribution du diamètre des particules se situant à 27,7±3,2 nm. L'indice de polydispersité est de 0,170±0,021 nm. Lorsqu'elles sont ajoutées à du milieu de culture complet, préalablement filtré à 0,22 μm, le diamètre hydrodynamique moyen des particules en suspension augmente jusqu'à 447,9±0,3

nm. Elles sont également plus polydispersées avec un indice de polydispersité à  $0,25\pm 0,015$ .

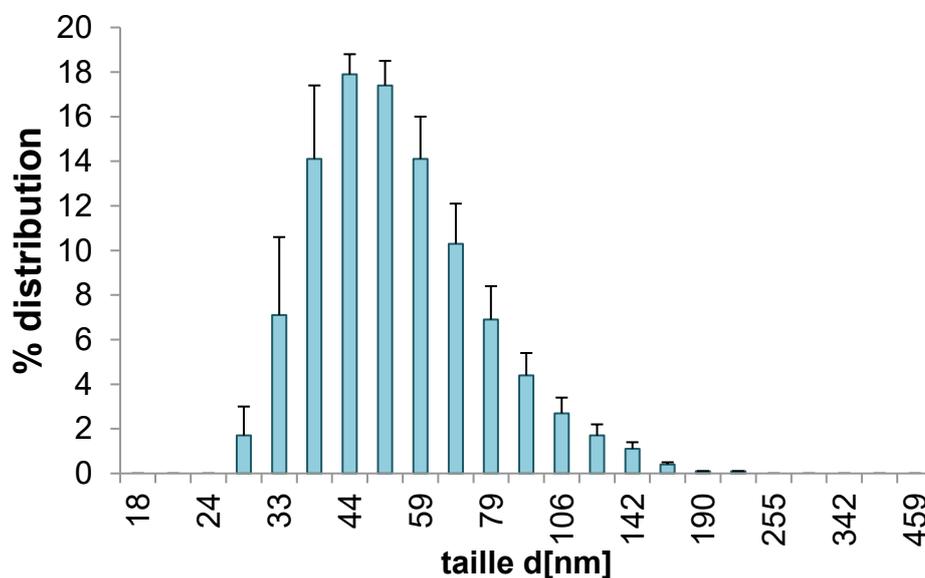


Figure 57 : Diagramme de distribution de taille dans l'eau des particules P25 mesurée par DLS.

Dans l'eau, les NPs P25 ont un diamètre en solution se situant entre 28 nm et 142 nm (figure 57). Le diamètre hydrodynamique moyen des particules en suspension est de  $157,6\pm 1,0$  nm, avec le pic de distribution du diamètre des particules se situant à  $59,3\pm 4,5$  nm. L'indice de polydispersité est de  $0,16\pm 0,012$  nm. Lorsqu'elles sont ajoutées à du milieu de culture complet, préalablement filtré à  $0,22\ \mu\text{m}$ , le diamètre hydrodynamique moyen des particules en suspension grimpe à  $439,9\pm 6,7$  nm. Elles sont également plus polydispersées avec un indice de polydispersion à  $0,18\pm 0,014$ .

Les valeurs du potentiel zêta des particules A12 et P25 dans l'eau et dans le milieu de culture, sont présentées dans le tableau 15. Les NPs A12 se chargent positivement dans l'eau et négativement dans le milieu de culture, alors que les NPs P25 se chargent négativement dans l'eau et le milieu de culture. Cependant, comme déjà remarqué avec les particules E171, ces valeurs sont encore assez proches de 0 pour considérer que les particules sont neutres à pH 7, et qu'elles vont alors avoir tendance à s'agglomérer.

### 3. Récapitulatif des trois particules de TiO<sub>2</sub> de l'étude

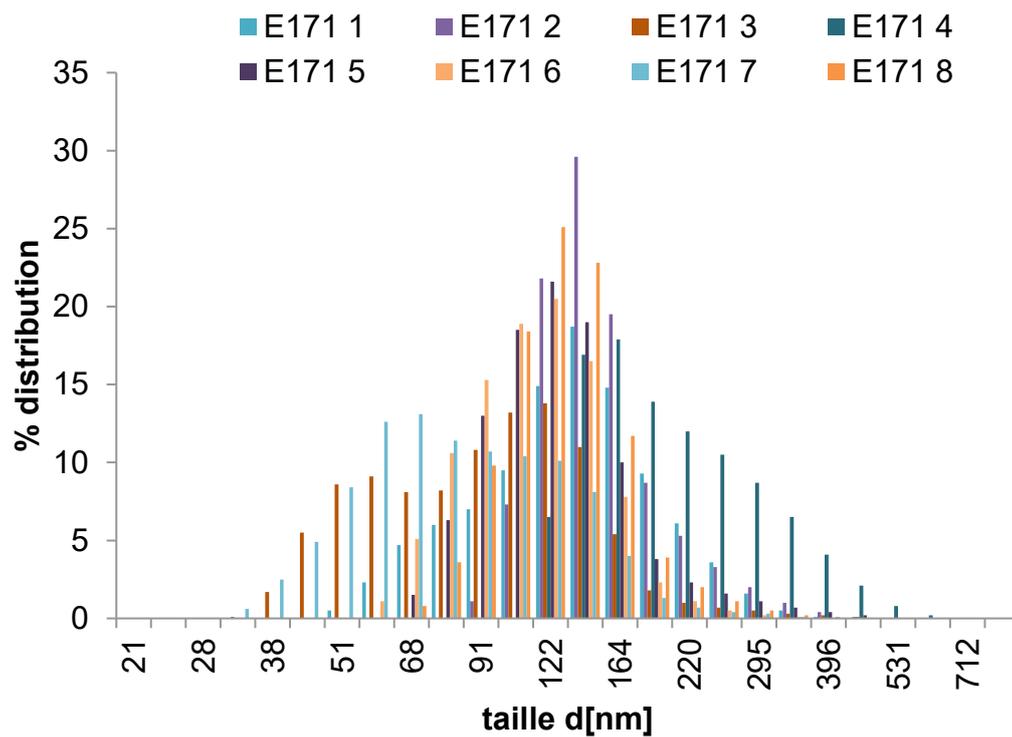
	% NPs	Structure Cristalline	D. MET	D.H (nm) dans milieu de culture + (I.P.)	ζ dans le milieu d'exposition (mV)
E171	47%	>95% anatase	119	739,3±355,3 (0,64±0,221)	-19±0,7
A12	100%	>95% anatase	12	447,9±0,3 (0,25±0,015)	-10,8±0,6
P25	100%	86% anatase 14% rutile	24	439,9±6,7 (0,18±0,014)	-11,2±0,8

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des principales informations sur les trois particules de TiO<sub>2</sub> utilisées dans cette thèse. Le pourcentage de nanoparticules dans les trois poudres (% NPs), la structure cristalline des particules, le diamètre moyen des particules obtenu par microscopie électronique en transmission (D. MET) le diamètre hydrodynamique moyen (D.H) dans le milieu de culture filtré 0,22 μm, ainsi que les indice de polydispersion (I.P.) et le potentiel zêta (ζ) obtenu dans le milieu de culture.

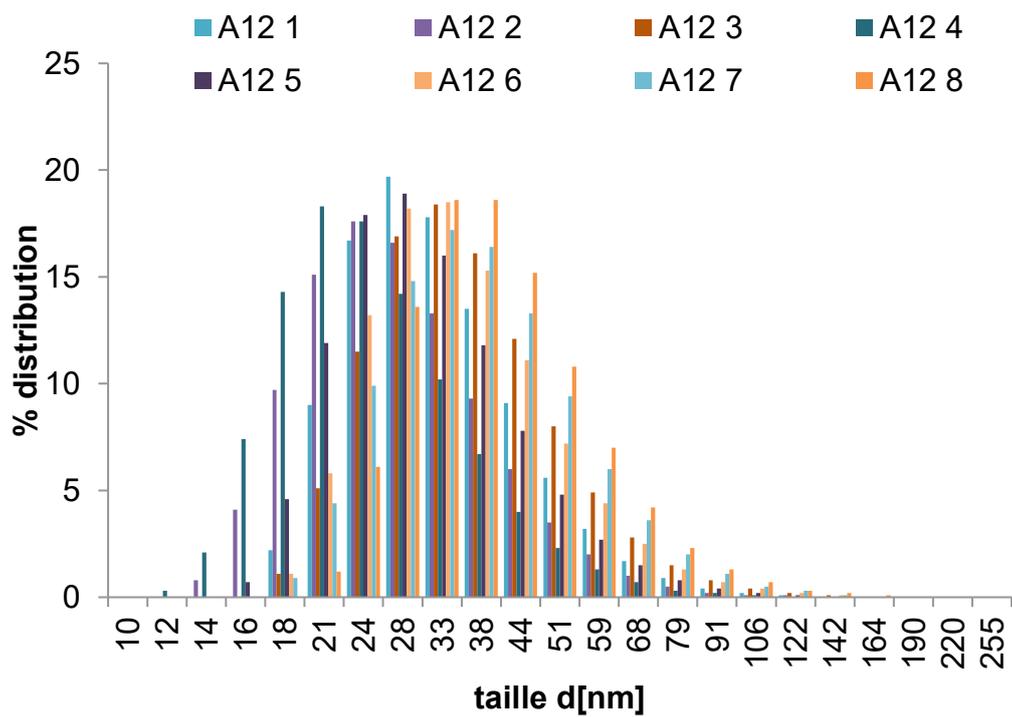
### 4. Suivi de la dispersion après les expositions chroniques

Lors des expositions chroniques, les cellules sont exposées aux suspensions de particules E171, A12 ou P25 pendant 21 jours consécutifs. Le milieu de culture contenant des particules est renouvelé 8 fois, tous les 2 à 3 jours. Pour l'ensemble de ces expositions, une seule suspension « mère » de particules, préparée dans l'eau, a été utilisée. Par contre à chaque changement de milieu, un certain volume de cette suspension « mère » était dispersé extemporanément par sonification avant d'être dilué dans du milieu de culture. Afin de s'assurer de la reproductibilité de la dispersion des particules tout au long de ce protocole d'exposition, nous avons suivi par DLS la distribution de taille des particules, après chaque sonification. Les résultats sont présentés dans la figure 58.

**A**



**B**



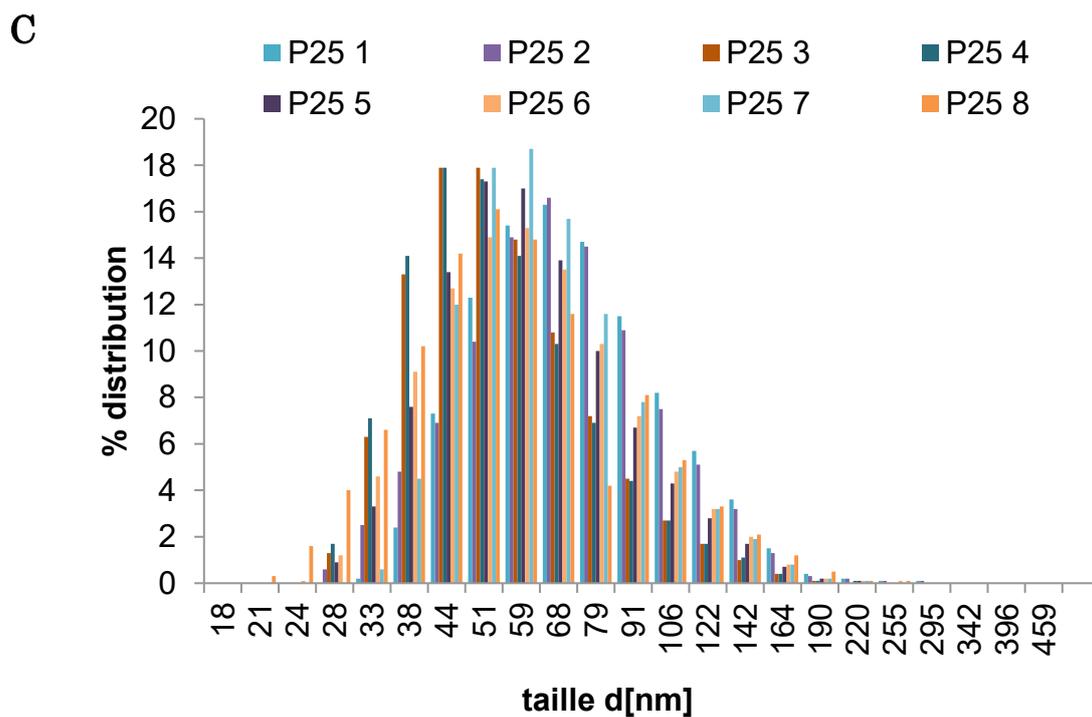


Figure 58 : Suivi de la dispersion des particules par DLS lors d'une exposition chronique. Dispersion des particules A) E171, B) A12, C) P25, en nombre, en solution lors des huit changements de milieu (E171 1... E171 8, A12 1...A12 8, P25 1...P25 8) durant l'exposition chronique.

Le suivi de la dispersion des particules dans l'eau montre bien que les dispersions par sonification au Cup-Horn donnent des suspensions de particules présentant une distribution de taille reproductible.

# CYTO-, GENO-TOXICITE, STRESS OXYDANT ET STRESS DU RETICULUM

---

Dans un premier temps, les effets toxiques du colorant E171 et des NPs de TiO<sub>2</sub> ont été évalués sur les modèles cellulaires intestinaux, *in vitro*, exposés de façon aigüe ou chronique, en se basant sur une évaluation des effets sur la viabilité cellulaire, l'induction d'un stress oxydant, d'un stress du réticulum endoplasmique et de lésions à l'ADN. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de deux articles scientifiques : ceux obtenus sur les cellules différenciées sont présentés dans la première partie de ce chapitre et ceux obtenus sur des cellules intestinales non différenciées sont présentés dans une deuxième partie.

# *Partie I : effets des particules sur des épithélia intestinaux différenciés*

## 1. Introduction

Dans l'intestin, les cellules subissent des expositions répétées aux micros et NPs minérales contenues dans les produits alimentaires. Se pose alors la question des effets toxiques d'une telle exposition sur ces cellules.

Pour évaluer ces effets, nous avons utilisé le modèle Caco-2 en monoculture et le modèle Caco-2/HT29-MTX en coculture (70 % et 30 %). Ils ont été cultivés pendant 21 jours de manière à obtenir des épithélia différenciés, comme nous l'avons montré dans le chapitre 3. Caco-2 forme alors un épithélium composé d'entérocytes jointifs et Caco-2/HT29-MTX un épithélium composé d'entérocytes et de cellules caliciformes sécrétant une couche de mucus. Les cellules ont été exposées au E171 commercial ainsi qu'à deux NPs de TiO<sub>2</sub>, A12 (anatase, 12 nm) et P25 (anatase/rutile, 25 nm), de façon aiguë pendant 6 h et 48 h ou de façon chronique, c'est-à-dire qu'elles sont exposées 8 fois consécutives pendant les 21 jours que dure leur différenciation (chapitre 2). Dans ce premier article, nous avons évalué l'impact des particules sur la viabilité cellulaire par les tests WST-1 et bleu de trypan. Enfin, nous avons mesuré par le test H<sub>2</sub>-DCF-DA la quantité de ROS intracellulaires, pour identifier une éventuelle sur-accumulation qui pourrait traduire l'apparition d'un stress oxydant. Comme nous observons une augmentation des ROS intracellulaires, nous en avons évalué les conséquences, en particulier l'induction de dommages oxydatifs de l'ADN, par le test des comètes. Enfin, nous avons analysé par RT-qPCR, l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans la régulation de l'équilibre redox de la cellule ainsi que l'expression de gènes codant des protéines intervenant dans la réponse physiologique UPR (unfolded protein response), initiée lors d'un stress du réticulum endoplasmique (RE).

## 2. Article 1

# Toxicological impact of chronic vs acute exposure of two in vitro intestinal epithelial cell models to E171 food additive and TiO<sub>2</sub> nanoparticles

Marie Dorier<sup>1,2</sup>, David Béal<sup>1,2</sup>, Caroline Desvergne<sup>3</sup>, Karin Pernet-Galley<sup>4,5</sup>, Frédéric Barreau<sup>6</sup>, Eric Houdeau<sup>7,8</sup>, Nathalie Herlin-Boime<sup>9</sup>, Thierry Rabilloud<sup>10</sup>, Marie Carriere<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, INAC, SyMMES, Laboratoire Lesions des Acides Nucleiques, F-38000 Grenoble, France, <sup>2</sup>CEA, INAC, LCIB, Laboratoire Lesions des Acides Nucleiques, F-38054 Grenoble, France, <sup>3</sup>Université Grenoble-Alpes, CEA, Nanosafety Platform, Medical Biology Laboratory (LBM), 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France, <sup>4</sup>Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble F-38000, France, <sup>5</sup>INSERM U 836, F-38000 Grenoble, France, <sup>6</sup>INSERM, UMR 1220, Institut de Recherche en Santé Digestive, Toulouse, France, <sup>7</sup>INRA, UMR1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France, <sup>8</sup>Université de Toulouse, UPS, UMR1331, Toxalim, F-31062 Toulouse, France, <sup>9</sup>UMR3685, univ. Paris Saclay, IRAMIS, NIMBE, LEDNA, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France, <sup>10</sup>ProMD, UMR CNRS 5249, CEA Grenoble, DRF/BIG/CBM, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, Grenoble, France.

\*Correspondence:

Dr., Marie Carriere, Ph.D

E-mail: marie.carriere@cea.fr

Phone +33 4 38 78 03 28 ; Fax: +33 4 38 78 5090

## Abstract

E171 is used as a food- additive for its white color, especially in candies and gums. This powder, composed of TiO<sub>2</sub> microparticles, contains up to 43 % of nanoparticles. Based on sufficient evidence of toxicity via inhalation in experimental animals, TiO<sub>2</sub> was classified by IARC as possible carcinogenic to humans. Conversely, its toxicity via the ingestion route is less documented. Our study aimed at evaluating

the toxicological impact of E171 and two TiO<sub>2</sub>-NPs, on two *in vitro* models of intestinal epithelium, i.e., a monoculture of differentiated Caco-2 enterocytes and a co-culture of Caco-2 enterocytes and HT29-MTX mucus-secreting cells. Their impact was evaluated either when acutely exposed (6 h or 48 h) or chronically exposed (21 days). Cell viability, redox metabolism and DNA integrity was assessed in both cells lines and exposure regimens. In addition, we investigated the impact of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs on actors of the UPR pathway that is activated in ER stress condition, known to participate in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Our results show that E171 cause reactive oxygen species accumulation in exposed cells and oxidatively damage their DNA, without altering cell viability, even at high doses. It modulates the expression of some markers of oxidative stress and ER stress. These effects are more intense in the chronic exposure regimen than in the acute one, and the mucus-secreting epithelium model is more sensitive than the enterocyte model. Our data thus suggest that TiO<sub>2</sub>, either micro-sized or nano-sized, is not a massive toxicant to intestinal cells. It however causes oxidative stress and ER stress, and may thus participate in the initiation and/or aggravation of inflammatory bowel diseases.

## Introduction

Micro-sized titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) particles are used for years as a pigment for their opacifying and whitening capacities, in daily-life products including paints, plastics, paper, medicines and food (INRS, 2013). Traditionally, micro-sized TiO<sub>2</sub> particles have been considered as poorly soluble and with low toxicity (Jovanović, 2015). The use of TiO<sub>2</sub> as a food additive, i.e. E171 in the EU, has thus been authorized in most countries, by the US-FDA in 1966 (section 21-73 Code of Federal Regulations Food and Drug Administration (FDA)) and then by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA) in 1969 (Amenta *et al.*, 2015; Jovanović, 2015) without any established acceptable daily intake provided that it does not exceed 1% of product (by weight)<sup>35</sup>.

---

<sup>35</sup> JECFA (1970). Thirteenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Rome, 27 May - 4 June 1969). WHO Technical Report Series No. 445 and FAO Nutrition Meetings Report Series No. 46, WHO, Geneva.

E171 is present in a wide range of food products; especially in candies and chewing gums (0.01-1 mg). Human daily exposure has thus been estimated to be 5 mg/person in UK (Powell *et al.*, 2010), 1-2 mg TiO<sub>2</sub>/kg b.w. for US children under 10 and 0.2-0.7 mg TiO<sub>2</sub>/kg b.w. for other US consumers (Chen *et al.*, 2013; Weir *et al.*, 2012) and 0.035 mg/kg b.w. equivalent to 2.5 mg/person (Fröhlich and Roblegg, 2012). Food-grade TiO<sub>2</sub> is not a nanomaterial with respect to the European recommendation of definition<sup>36</sup> because it contains less than 50 % of particles, in the number size distribution, with at least one dimension <100 nm (i.e. NPs). Depending on the batch, E171 however contains up to 43% of NPs (Chen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014; Weir *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014) and TiO<sub>2</sub>-NPs were effectively detected in food products (Chen *et al.*, 2013).

Current knowledge on TiO<sub>2</sub> impact on human health, derived from *in vivo* and *in vitro* studies, especially on the inhalation exposure route, has been largely reviewed based on reports that are sometimes contradictory. Depending on their physico-chemistry and of the exposure dose, they cause moderate or high cytotoxicity, DNA damage, oxidative stress, inflammation and impair autophagic processes (Johnston *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). Based on sufficient evidence of toxicity via inhalation in experimental animals, TiO<sub>2</sub> was classified as possible carcinogenic to humans (Group 2B) in 2006 by the international agency for research on cancer (IARC) (IARC, 2010). Contrary to this abundant literature on the inhalation exposure route, the impact of oral exposure to TiO<sub>2</sub>-NPs or food-grade TiO<sub>2</sub> is poorly documented (McCracken *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011).

Absorption of TiO<sub>2</sub>-NPs through the intestine after oral intake is low (Gitrowski *et al.*, 2014; Janer *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2015; MacNicoll, 2015; Pele *et al.*, 2015). OECD guideline studies show no acute or sub-chronic oral toxicity in rats for TiO<sub>2</sub> particles with properties similar to those of E171 (Warheit *et al.*, 2015). Conversely several studies (OECD guideline or not) report systemic toxicity of TiO<sub>2</sub> micro- or nanoparticles on the cardiovascular system (Chen *et al.*, 2015b), kidneys (Al-Rasheed *et al.*, 2013a), liver (Wang *et al.*, 2007), spleen (Jani *et al.*, 1994) and reproductive organs (Jia *et al.*, 2014). It was observed when TiO<sub>2</sub> was administered

---

<sup>36</sup> 2011 Official Journal of the European Union (2011/696/EU) 18/10/2011

at a single dose (Warheit *et al.*, 2007) or repeatedly (Chen *et al.*, 2015b; Koeneman *et al.*, 2009); Warheit *et al.*, 2007) either in mice (S. Liu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007) or in rats (Al-Rasheed *et al.*, 2013a; Wang *et al.*, 2013; Warheit *et al.*, 2015). It can cause genotoxicity (Trouiller *et al.*, 2009) and inflammation (Chen *et al.*, 2015b) when administered at either realistic doses (Geraets *et al.*, 2014; Sheng *et al.*, 2012) or very high doses (Wang *et al.*, 2007) as compared to the estimated daily ingestion.

*In vitro*, TiO<sub>2</sub> particles extracted from gum induce only a slight increase of ROS production and no obvious decrease of cell viability on enterocytes and gastric cells (Chen *et al.*, 2013). So do TiO<sub>2</sub>-NPs on *in vitro* models of ileum and Peyer's patches (Brun *et al.*, 2014). Conversely food-grade TiO<sub>2</sub> alters various metabolic stress indicators linked to oxidative stress in human lung fibroblasts (Periasamy *et al.*, 2015). While E171 pretreated with simulated digestive fluids at 200 µg/mL shows no obvious effects on differentiated Caco-2 cells, it inhibits the growth of undifferentiated Caco-2 cells, because of lower intracellular accumulation (Z.-M. Song *et al.*, 2015). Moreover, TiO<sub>2</sub>-NPs affect the redox metabolism, induce inflammation and early apoptosis in buccal cells (Tay *et al.*, 2014).

The present study aimed at improving knowledge on toxicity of food-grade TiO<sub>2</sub> (E171). To this purpose, 5 batches of E171 were purchased from commercial websites and characterized. The impact of one of these batches was evaluated on two *in vitro* models representative of ileum, i.e. differentiated Caco-2 enterocytes and a model of mucus-secreting epithelium obtained by coculture of Caco-2 and HT29-MTX mucus secreting cells (Lesuffleur *et al.*, 1990; Natoli *et al.*, 2012; Walter *et al.*, 1996). These cell models were exposed to E171 either acutely for 6 h or 48 h, or repeatedly for 21 days during their differentiation. These exposure regimens mimic either acute exposure when the food bowl reaches the intestine, or the chronic impact that daily consumption of TiO<sub>2</sub>-containing food would cause on the continuously renewing intestine. For comparison purpose, the same exposure regimens were applied with two model TiO<sub>2</sub>-NPs, i) a reference mixed anatase/rutile TiO<sub>2</sub>-NP with 21 nm diameter, i.e. NM105 from the European Commission joint research center (JRC, Ispra) because it is the principal material of the OECD test program "Testing a representative set of manufactured

nanomaterial” and its toxicity is widely documented and ii) a 12 nm purely anatase NP, because the batch of E171 used here was purely anatase. Their accumulation in cells, impact on viability, redox metabolism and DNA integrity was assessed. Moreover endoplasmic reticulum (ER) stress has been shown to be induced by TiO<sub>2</sub>-NPs in human bronchial cells (Yu *et al.*, 2015a) and *in vivo* in the lung of mice exposed via inhalation (Yu *et al.*, 2015b). It is triggered by inflammation and oxidative stress (Deuring *et al.*, 2011) which are hallmarks of TiO<sub>2</sub>-NP impact. Moreover, it is a susceptibility factor for inflammatory bowel disease (Garg *et al.*, 2012; Zhang and Kaufman, 2008). We therefore also explored the impact of E171 on several markers of ER stress.

Together, our data show that E171 is not a massive toxicant, even at high dose, and that its impact is higher in the repeated exposure regimen, as compared to the acute one. Moreover, its impact is higher in the mucus-secreting epithelium model, as compared to the non-secretory enterocyte model.

## Material and Methods

### Chemicals and reagents

Unless otherwise indicated, chemicals were all purchased from Sigma-Aldrich and were >99% pure. Cell culture media and serum were purchased from Thermo Fisher Scientific.

### Particle dispersion and characterization

E171 food additive powder was purchased from internet commercial website, we choose the powder E171-A among the five tested. The TiO<sub>2</sub>-NPs used were encoded P25, referenced as NM105 in the nanomaterial library at the European Joint Research Center (JRC, Ispra, Italy), and A12 which was synthesized in our laboratories (Pignon *et al.*, 2008) and has already been used in our previous studies (Brun *et al.*, 2014; Dorier *et al.*, 2015). Their specific surface area was measured by the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method, their crystalline phase by X-ray diffraction and their diameter was measured on transmission electron microscopy (TEM) images, as described in our previous work (Simon-Deckers *et*

*al.*, 2008). Particle suspensions were prepared to the final concentration of 10 mg/mL in ultrapure sterilized water and dispersed by indirect cup-type sonicator (Cup Horn) as a high intensity ultrasonic water bath that provide sterile conditions (Bioblock Scientific, Vibracell 75041, Huber minichiller, 100-500  $\mu$ L; continuous sonication for 30 min; at 80% amplitude; 4°C). The power of our sonicator was measured using the calorimetric procedure (Taurozzi *et al.*, 2010). Amplitude of 80% corresponds to 52.8 W. After dispersion, their zeta potential was measured and their agglomeration state was followed by dynamic light scattering (DLS) using a NanoZS, (Malvern Instrument). Particle dispersion reproducibility was followed up to 8 times and the stability of particle suspension was checked daily for 4 days.

## Cell culture and exposure

### Cell culture

Caco-2 cells (ATCC HTB-37, passages from 49 to 60) and HT29-MTX mucus-secreting cells (kindly provided by T. Lesuffleur, INSERM U843, Paris, France) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX™ supplemented with 10 % heat inactivated fetal bovine serum, 1 % non-essential amino acids, 50 units/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. They were maintained at 37°C under 5 % CO<sub>2</sub>. For all experiments cells were seeded at a density of 24 000 cells/cm<sup>2</sup> in appropriate support, i.e. 60 cm<sup>2</sup> petri dishes, multi-wells plates or Transwell-Clear® inserts (polyester, 0.4  $\mu$ m pores, Costar). These cells were grown as a monoculture of Caco-2, seeded at 24 000 cells.cm<sup>-2</sup> in appropriate dishes, or as a co-culture composed of 70 % Caco-2 and 30 % HT29-MTX cells, seeded at 24 000 cells/cm<sup>2</sup>. This co-culture is a model of mucus-secreting absorptive epithelium that was further characterized by confirmation of mucus secretion and measurement of alkaline phosphatase secretion, which is a hallmark of microvilli differentiation.

### Cell exposure to particles

For acute exposure experiments, cells were grown to confluence and differentiated by maintaining them 21 days post-confluence, changing cell culture medium three times per week. Cells were exposed either acutely, i.e. for 6 h, 24 h or 48 h after their 21 days complete differentiation, or chronically, i.e. twice a week from seeding

and throughout their differentiation period which lasted 21 days (renewed 8 times in total) (figure S1). Cells were exposed to particles at 1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , in cell culture medium containing 10 % FBS.

#### Evaluation of mucus secretion by staining

Cells were seeded in 60  $\text{cm}^2$  dishes or 6-wells plates. After 21 days of growth, cells were washed with PBS then fixed for 20 min at RT in 90 % ethanol/3 % acetic acid (3V/V). They were then stained with either Alcian blue or Periodic Acid-Schiff (PAS) staining in order to detect mucus in cell models. Alcian blue is a cationic dye, it stains acidic polysaccharides, mucopolysaccharides and sialylated glycocalyx of cells. Fixative solution was replaced by 1 % (w./v.) Alcian blue pH 2.5 dissolved in acetic acid which was incubated for 30 min at RT in the dark and under stirring. The cells were then washed twice. Periodic Acid-Schiff (PAS) protocol consist of oxidized glycols to aldehydes and released of pararosaniline adduct that stains the glycoproteins, glycolipids and mucins in cells. We used the PAS assay kit. After fixation, cells were washed for 1 min with distilled water. They were stained for 15 min at RT with Schiff reagent then washed for 5 min. Then Hematoxylin solution was added and incubated for 90 s, cells were washed with water. After both protocols, cells were observed and imaged using an optical microscope (Axiovert 25 Zeiss).

#### Microvilli differentiation

The Alkaline phosphatase is an enzymatic component of the apical membrane in enterocytes cells i.e. microvilli, and it may be found in cell glycocalyx (Sambuy *et al.*, 2005). Thus, in order to access microvilli differentiation of Caco-2 cells, alkaline phosphatase enzymatic labelling and alkaline phosphatase enzymatic activity were monitored. For enzymatic labelling, cells were seeded in 60  $\text{cm}^2$  dishes and The SIGMA *FAST*<sup>™</sup> labelling assay was used. Briefly, the Fast-Red and tris tablets were dissolved in 10 mL deionized water and mixed. This solution was added to the cell plates and incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped by washing with water. After the staining, cells were observed and imaged using an optical microscope (Axiovert 25 Zeiss). For alkaline phosphatase enzymatic

activity monitoring, cells were seeded in 24-wells plates. The alkaline phosphatase activity fluorometric assay kit (K422-500, Biovision) was used using the protocols given by the furnisher: each well of cells were harvested and counted, then pelleted (250 rcf, 5 min) and washed with PBS. Assay buffer was added and tubes centrifuged for 3 min at 13000 rcf. The supernatant of each condition was then added in a black 96-wells plate, in duplicate. Next steps were similar to the kit's protocol. Results were expressed as fluorescence measured for each condition and normalized by number of cells (fluorescence unit per cell number). Triplicates were performed.

## Toxicity assays

### Cell viability

For the Caco-2 monoculture, cell viability was assessed by Trypan Blue exclusion staining. Cells were counted using the automatic counter cell (Countess automatic cell counter, Invitrogen). Viable and nonviable cells were recorded. Results were expressed as the mean percentage of cell viability normalized to the untreated control. Three measurements were performed for each condition. For the Caco-2/HT29-MTX coculture model, cytotoxicity was assessed by propidium iodide (PI) exclusion. Cells were incubated with PI then counted with a FACS Calibur analyzer (BD Biosciences, Franklin Lanes, NJ) equipped with CXP software (Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA). Mean fluorescence was calculated using Flowing Software 2.5.1 (<http://www.flowingsoftware.com/>). Viable and nonviable cell populations were recorded. Results are expressed as the mean percentage of cell viability normalized to the untreated control. Three measurements were performed for each condition. Cytotoxicity after acute exposure to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs was assessed by using the WST-1 assay (Roche) which is a water-soluble dye for MTT Assays. Cells were grown in 96-wells plates before being exposed to 0-200 µg/mL of particles for 6 h and 48 h. Then, exposure medium was replaced by 10 µL of WST-1 (1/10 ref cell proliferation reagent, wst-1 Roche) solution in 90 µL of culture medium. After 1 h 30 at 37°C, DO is directly read in cell medium. To free from particles interferences with the test, plates were centrifuged for 5 min at 500 rpm to allow particles sedimentation and 50 µL of supernatants were then

transferred into another plate for absorbance measurements at 438 nm with a spectrophotometer (Molecular Devices, SpectraMax M2). Metabolic activity of viable cells was expressed as the mean percentage of cell viability normalized to the untreated control. NPs potential interferences were tested as previously described (Brun *et al.*, 2014).

To ensure epithelia integrity after chronic exposure to particles, Transepithelial electrical Resistance (TEER) were measured using the Electrical Resistance System Millicell® ERS-2 (Millipore) in cells grown onto 12-well transwell inserts for 21 days. Three measurements were performed for each insert. The TEER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) was calculated as follows:  $\text{TEER} = (\text{R}_{\text{cell}} - \text{R}_{\text{blank}}) \times A$ , where  $\text{R}_{\text{cell}}$ , epithelia resistance, and  $\text{R}_{\text{blank}}$ , resistance of the transwell without cells, were in  $\Omega$  and  $A$ , the surface area of the insert, was  $1.12 \text{ cm}^2$ .

#### Reactive Oxygen Species (ROS) measurement

Intracellular ROS formation was assessed using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester ( $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ ) (Invitrogen). After exposure to particles, cells were washed twice with PBS, incubated for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  with  $80 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$  and harvested by scraping. The resulting fluorescence intensity of DCF after esterase cleavage and ROS oxidation was measured with excitation at 480 nm and emission at 530 nm (Molecular Devices, SpectraMax M2) and normalized to the protein concentration. For  $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$  assay, potential  $\text{TiO}_2$  particles interferences were tested, fluorescence was measured, either in exposed-cells without  $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$  or in particles suspensions at 10-50-100  $\mu\text{g/mL}$  with  $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$  (figure S4).

#### Genotoxicity

DNA strand breaks, alkali-labile and oxidative lesions were assessed by the alkaline comet assay and its formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) modified version (Dušinská and Collins, 1996; Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000). After exposure to particles, cells were harvested and stored at  $-80^\circ\text{C}$  in storage buffer (4.28 g sucrose, 588 mg Sodium citrate, 2.5 mL DMSO, pH 7.6) until analysis. Cells were then embedded in 0.5 % low melting point (LMP) agarose and

spread on 6 independent microscope slides covered with 1 % agarose. Cells were then lysed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10 % DMSO and 1 %), overnight at 4°C. After lysis, slides were rinsed with 0.4 M Tris-HCl pH 7.4 in the dark. 3 slides were then incubated with Fpg buffer and the 3 other slides were incubated with Fpg enzyme prepared in its buffer (0.05 u/μL, Interchim) for 45 min at 37°C. The reaction was stopped by depositing slides onto ice. Slides were then immersed in cold migration buffer (NaOH 300 mM, EDTA 1mM) and incubated for 30 min to allow DNA unwinding. Electrophoresis was performed at 300 mA and 25 V for 30 min. Slides were then neutralized by washing 3 times for 5 min in 0.4 M Tris-HCl pH 7.4 before staining with gel red (10000 X ref 41003 VWR) prepared in PBS. At least 50 cells were analyzed under a fluorescence microscope using the Comet IV software (Perceptive instruments, Suffolk, UK). As Fpg positive control we used A549 pulmonary cells exposed to 1 μM riboflavin for 20 min at 37 °C then irradiated to UVA (010.0 J/cm<sup>2</sup>) as described previously (Forestier *et al.*, 2012). Percentage of tail DNA were normalized to number obtained on control cells (unexposed cells) and results are expressed as mean percentage ± standard error. Experiments were repeated 3 times independently. For Comet assay with Fpg, TiO<sub>2</sub>-NPs potential interference question was already answered (Magdolenova, 2012).

### Gene expression

Gene expression in cells exposed to particles was assessed by real-time-quantitative PCR. After exposure to particles, cells were harvested in lysis buffer (from RNA extraction Kit) and frozen to -80°C. RNA was extracted using GenElute™ mammalian total RNA Miniprep kit. Total RNA concentration and purity were determined by measuring absorbance at 260 nm and abs 260/ abs 280, abs 260/ abs 230 nm ratios. 2 μg of total RNA was reverse transcribed to cDNA with 100 ng/μL random primers, 10 mM dNTP and the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Total single strand cDNA concentration and purity were determined by measuring absorbance at 260 nm and abs 260/ abs 280, abs 260/ abs 230 nm ratios. MESA Blue qPCR Mastermix for SYBR Assay (Eurogentec) with ROX reference was used to perform the quantitative PCR in a MX3005P

multiplex quantitative PCR system (Stratagene). The primer sequences are described in table S1; their efficiency was determined before these assays and was always between 1.8 and 2.2. Relative expression values were calculated as  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .  $\Delta Cq$  is the difference between the cycle threshold (Cq) values for target and reference genes for each condition. Then,  $\Delta\Delta Cq$  is the difference between the  $\Delta Cq$  of one condition and of the control condition. *CYCLOA* and *B*, *S18* and *GAPDH* were used as reference genes for normalization. Their variability of expression was assessed by Bestkeeper, an Excel-based pairwise mRNA correlation tool (Pfaffl *et al.*, 2004). Gene expression was obtained using the Relative Expression Software Tool (REST2009) based on Cq comparison (Pfaffl *et al.*, 2002). Data are expressed as percentages of the corresponding control.

#### Statistical analysis

Statistica 8.0 software (Statsoft, Chicago, USA) was used to perform statistical analyses. Unless indicated otherwise, statistical significance was assessed with both non-parametric one-way analysis of variance on ranks approach (Kruskal-Wallis) and paired comparison Mann-Whitney u-test. Results were considered statistically significant with p-value < 0.05.

## Results

### Physico-chemical characterization of the particles and NPs

Five batches of E171 were purchased from commercial websites. P25 TiO<sub>2</sub>-NPs were supplied by the JRC and A12 TiO<sub>2</sub>-NPs were synthesized in our laboratories by laser pyrolysis (Pignon *et al.*, 2008). The physico-chemical characteristics of P25 and A12 NPs have already been described previously and are summarized in table 1 (Jugan *et al.*, 2011; Simon-Deckers *et al.*, 2008). A12 is purely anatase with a diameter of 12±3 nm, and a specific surface area (SSA) of 82 m<sup>2</sup>/g. P25 is a mixed anatase/rutile (86 %/14 %) TiO<sub>2</sub>-NP, its diameter is 24±6 nm and its SSA is 46±1 m<sup>2</sup>/g. We used high energy sonication for their dispersion. After dispersion A12 mean ± standard error hydrodynamic diameter, measured by DLS, was 85±2.9 nm in water and 447.9±0.3 nm in cell culture medium. For P25, mean ± standard error hydrodynamic diameter was 157.6±1.0 nm in water and 439.9±6.7 nm in cell culture medium.

Characterization results for the five batches of E171 are summarized in table 2. Their physico-chemical characteristics were comparable, with two batches being purely anatase and three batches being mainly anatase with traces (<1 %) of rutile. Their SSA ranged from 8.4 to 12.4 m<sup>2</sup>/g. Their average primary diameter ranged between 100 and 136 nm, as measured on TEM images, or between 121 and 180 nm when calculated from the SSA value via the Scherrer equation.

We chose to carry out all the biology experiments with E171A, which was purely anatase with a SSA of 9.36 m<sup>2</sup>/g. Its average primary diameter was 119±65 nm, with 47 % of the particles in the 1-100 nm range.

Its mean ± standard error hydrodynamic diameter was 415.4±69.5 nm when dispersed in water and increased to 739.3±355.3 nm when further diluted in cell culture medium (table 1). Polydispersity was high, with a polydispersity index ranging from 0.48 to 0.64. Turbidimetric measurement showed that the water suspension was stable for 10 min, but settled down 16 h after sonication dispersion (not shown).

	diam. TEM (nm)	SSA (m <sup>2</sup> /g)	crystal. struct.	H. diam. water (nm)	PdI water	H. diam. medium (nm)	PdI medium	ζ medium (mV)
E171	118±53	9.4	>95% anat.	415.4±69.5	0.48±0.071	739.3±355.3	0.64±0.221	-19±0.7
A12	12±3	82	>95% anat.	85±2.9	0.17±0.021	447.9±0.3	0.25±0.015	-10.8±0.6
P25	24±6	46	86% anat.	157.6±1.0	0.16±0.012	439.9±6.7	0.18±0.014	-11.2±0.8

Table 1. Particle characterization. The primary diameter (diam.) was measured on TEM images. The specific surface area (SSA) was measured via the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method. Crystalline structure (cryst. struct.) was identified by X-ray diffraction. The hydrodynamic diameters (H. diam.) are the mean ± standard deviation of the Z-average values given by a Malvern Nanosizer; PdI are the polydispersity indexes. H. diam. measurements were carried out either in ultrapure water (water) or in cell culture medium (medium). The zeta potential (ζ) was measured on particle dispersions prepared in cell culture medium just before cell exposure.

	SSA (m <sup>2</sup> /g)	Theor. Diam. (nm)	Diam. TEM (nm)	%<100 nm	nb	Cryst. struct.
E171 A	9.4	160	119±65	47	192	anatase
E171 B	12.4	121	117±41	40	200	anatase + traces rutile
E171 C	8.4	180	136±53	30	210	anatase + traces rutile
E171 D	10.8	139	100±36	55	200	anatase
E171 E	11.8	128	109±37	45	150	anatase + traces rutile

Table 2. E171 powder characteristics. E171 powders were purchased from commercial websites. Their specific surface area (SSA) was measured by the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method, their theoretical mean diameter (Theor. Diam.) was determined with the Sherrer equation, their primary diameter (Diam.) and the percentage of particles below 100 nm (%<100 nm) were analyzed using transmission electron microscopy (TEM) their crystalline phase (Cryst. structu.) was identified by X-ray diffraction (DRX).

### Impact on cell viability and epithelia integrity

These TiO<sub>2</sub> particles were applied to the two cell models using the exposure regimens described in figure S1. Prior to exposure, mucus secretion by the Caco-2/HT29-MTX model was verified (figure S2A), together with alkaline phosphatase production and activity which probes the presence of microvilli i.e. Caco-2 cell differentiation (figure S2A-B).

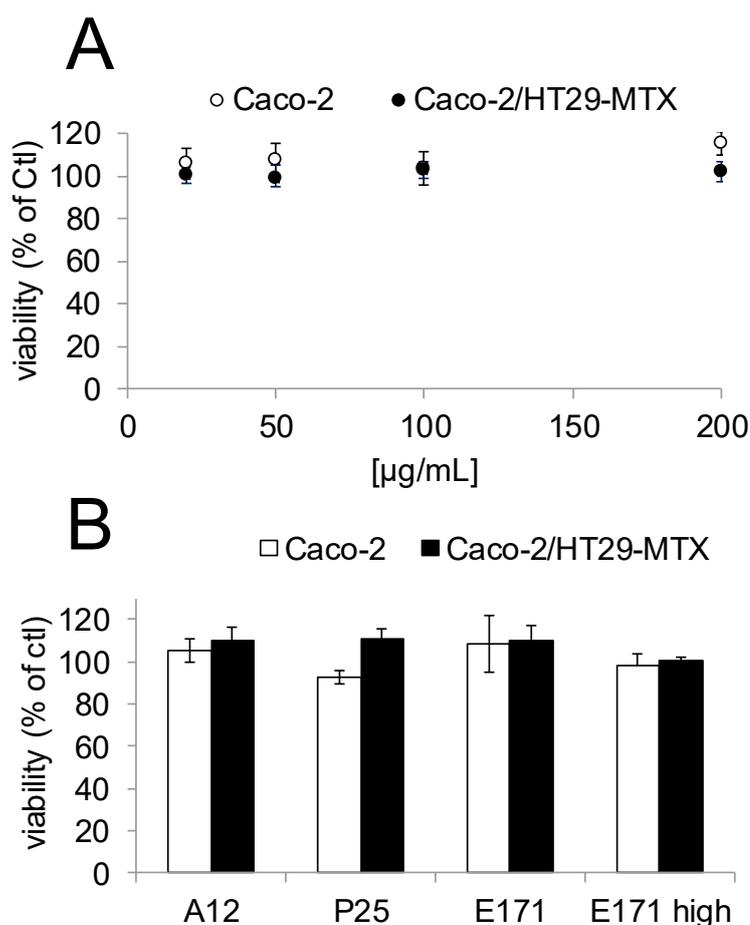


Figure 1. Cell viability and epithelia integrity after chronic exposure. (A) Cell viability was assessed with the MTT assay in Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells after 48 h of exposure to E171 at 20, 50, 100 and 200 µg/mL. (B) Cell viability was probed with trypan blue staining in Caco-2 cells and IP staining in Caco-2/HT29-MTX cells, in cells chronically exposed to 10 µg/mL of A12, P25 or E171 (“A12”, “P25” and “E171” bars) or to 50 µg/mL of E171 (“E171 high” bar). Results are expressed as percentage (%) of fold increase above the control (unexposed cells), presented as average ± standard deviation, n=3.

No overt mortality was observed in the Caco-2 monoculture and Caco-2/HT29-MTX coculture upon acute exposure to 10-200 µg/mL E171 for 48 h (figure 1A). The same

was true after repeated exposure to 10 µg/mL of A12, P25 or E171 or 50 µg/mL E171 (figure 1B).

Moreover, upon repeated exposure, TiO<sub>2</sub> particles did not impact Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX epithelia integrity as showed with TEER values measurement (table S2).

#### Damage to DNA

DNA damage in cells exposed to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs was evaluated using the comet assay. In its alkaline version, this assay quantifies single-strand breaks, double strand breaks and alkali-labile sites, such as abasic sites. In its Fpg-modified version, it quantifies these lesions but also Fpg-sensitive sites, including 8-oxo-dGuo oxidized DNA base (Dušinská and Collins, 1996; Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000). In the acute exposure regimen, no significant DNA damage was observed in both the alkaline and Fpg versions of the comet assay (table S3). In the chronic exposure regimen, no damage was detected in the alkaline version of the comet assay. Conversely, we observed significant increase of the % tail DNA in the Fpg-modified version, in the Caco-2 monoculture repeatedly exposed to E171 for 21 days (table 3). The % tail DNA was 2.0±0.1 and 2.1±0.8 fold higher in cells exposed to E171 at 10 or 50 µg/mL, respectively, as compared to control cells. In the Caco-2/HT29-MTX coculture, statistically significant increase was observed only in cells exposed to E171 at 50 µg/mL. In this condition the % tail DNA was 2.0±0.8 fold higher, as compared to control cells (table 3).

	Caco-2		Caco-2/HT29-MTX	
	Alkaline	+Fpg	Alkaline	+Fpg
A12 10 $\mu\text{g/mL}$	2.1 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1
A12 50 $\mu\text{g/mL}$	0.8 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3
P25 10 $\mu\text{g/mL}$	0.7 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.1
P25 50 $\mu\text{g/mL}$	0.7 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.7
E171 10 $\mu\text{g/mL}$	1.3 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.1*	0.8 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.9
E171 50 $\mu\text{g/mL}$	1.7 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 0.8*	0.7 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.8*

Table 3. DNA damage induced by chronic exposure to TiO<sub>2</sub>. % tail DNA normalized to control obtained in the alkaline version of the comet assay (alkaline) or in its Fpg-modified version (+Fpg), after chronic exposure of Caco-2 cells or Caco-2/HT29-MTX coculture to 10 or 50  $\mu\text{g/mL}$  of A12, P25 or E171. Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and expressed as average  $\pm$  standard deviation of 3 independent experiments, \*p<0.05, exposed vs control, n=3.

### Oxidative stress

Increased number of Fpg-sensitive sites in chronically-exposed cells suggests the onset of oxidative stress. To confirm this hypothesis, we first monitored the intracellular ROS content in cells exposed to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs, using the H<sub>2</sub>-DCF-DA assay. A significant increase in ROS levels was measured in both cell models when chronically exposed to E171 (figure 2A-B). In the Caco-2 monoculture, this increase was concentration-dependent, with 1.20 $\pm$ 0.04; 1.30 $\pm$ 0.02 and 1.70 $\pm$ 0.09 fold-increase of ROS content measured in cells exposed to 10, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  E171, respectively, as compared to control cells (figure 2A). In the Caco-2/HT29-MTX coculture, this increase was less important and only significant in cells exposed to 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  E171, with 1.2 $\pm$ 0.13 and 1.3 $\pm$ 0.13 fold-increase of ROS content in exposed cells as compared to control cells, respectively (figure 2B). Exposure to 50  $\mu\text{g/mL}$  of P25-NPs also increased ROS level in both cell models, whereas A12-NPs increased the ROS level in the Caco-2 monoculture only. In acutely exposed cells, ROS intracellular content was also higher in exposed cells, as compared to control cells (figure 2C-D). In the Caco-2 monoculture (figure 2C), ROS content increased after acute exposure to E171 at 10, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  for 48 h with 1.6 $\pm$ 0.24; 2.5 $\pm$ 0.39 and 2.0 $\pm$ 0.15 fold-changes. Same observations were made with A12 and P25 TiO<sub>2</sub>-NPs at 50  $\mu\text{g/mL}$  for 48 h. In Caco-2/HT29-MTX coculture (figure 2D), a concentration-dependent increase of ROS levels was also observed after exposure to E171, for all exposure times, with 1.20 $\pm$ 0.07, 1.20 $\pm$ 0.14

and  $1.50 \pm 0.16$  fold-change for 48 h of exposure at 10, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Same observations were made with P25  $\text{TiO}_2$ -NPs at 50  $\mu\text{g/mL}$  for all exposure times and A12 NPs for 24h. The possible interaction of  $\text{TiO}_2$  particles with  $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$  was tested, no interference was detected (table S4).

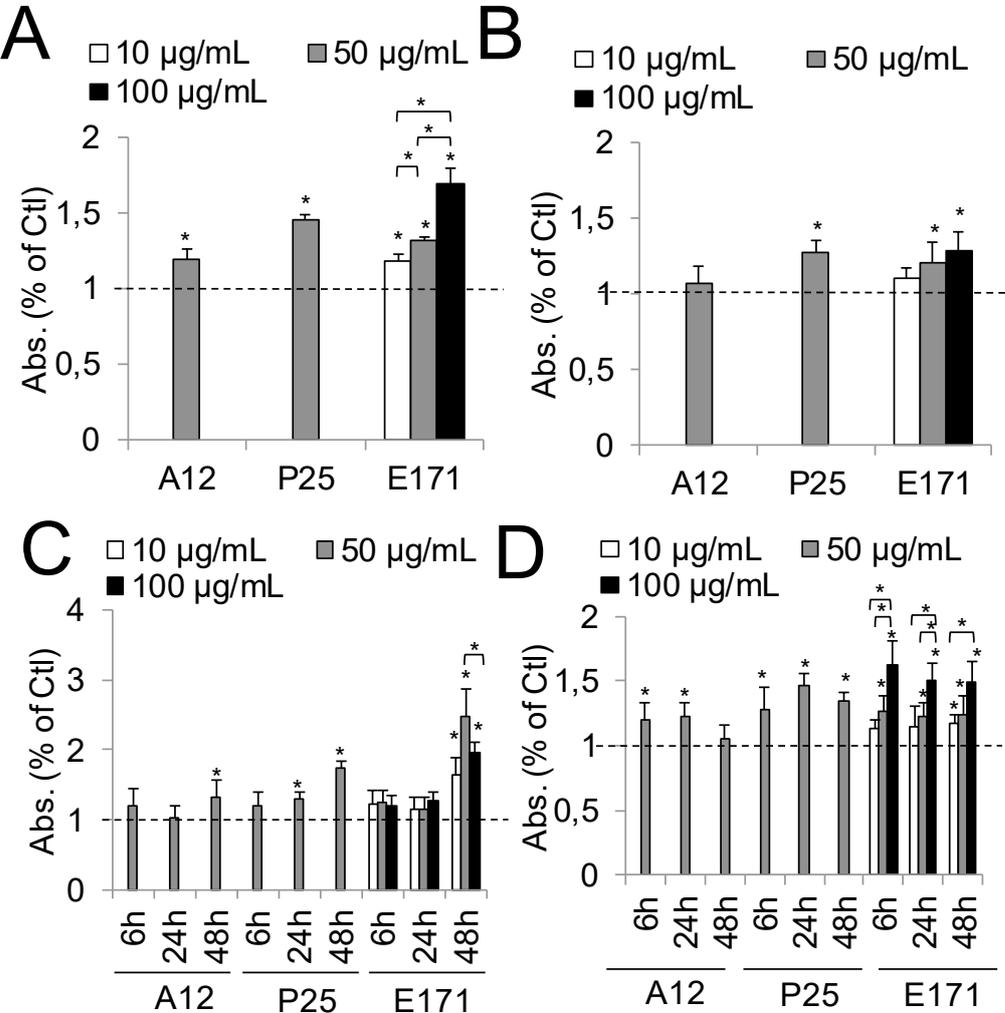


Figure 2. Intracellular ROS content. ROS accumulation was measured using  $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ , in Caco-2 cells (A, C) and Caco-2/HT29-MTX coculture (B, D). In the chronic exposure regimen, they were exposed during 21 days to 50  $\mu\text{g/mL}$  of A12-NPs or P25-NPs, or to 10, 50 or 100  $\mu\text{g/mL}$  of E171 (A, B). These cells were exposed to 50  $\mu\text{g/mL}$  of A12-NPs or P25-NPs, or 10, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  of E171; for 6 h, 24 h or 48 h (C, D). Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and presented as average  $\pm$  standard deviation, \* $p < 0.05$  exposed vs control,  $n = 4$ .

Secondly, the expression of genes encoding proteins implicated in ROS regulation; i.e. catalase (*CAT*), glutathione reductase (*GSR*), superoxide dismutase 1 and 2 (*SOD1*, *SOD2*) was measured by RT-qPCR in cells exposed to 10 or 50  $\mu\text{g/mL}$  E171

or 50  $\mu\text{g/mL}$   $\text{TiO}_2$ -NPs, acutely for 6 h or 48 h, or chronically for 21 days. The complete set of results is given in table S5.

No gene expression modulation was observed in the acutely exposed Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX models, except in Caco-2/HT29-MTX exposed for 48 h to A12. Using the chronic exposure regimen, no gene expression modulation was observed in the Caco-2 monoculture (figure 3A). Conversely in chronically-exposed Caco-2/HT29-MTX, down-regulation of *CAT* and *GSR* was observed after exposure to E171 at 10  $\mu\text{g/mL}$  while *GSR* and *SOD1* were downregulated at 50  $\mu\text{g/mL}$  (figure 3B). Exposure to A12 and P25  $\text{TiO}_2$ -NPs at 10  $\mu\text{g/mL}$  also induced down-regulation of *CAT* and *SOD1* or *SOD1* only, respectively (table S5).

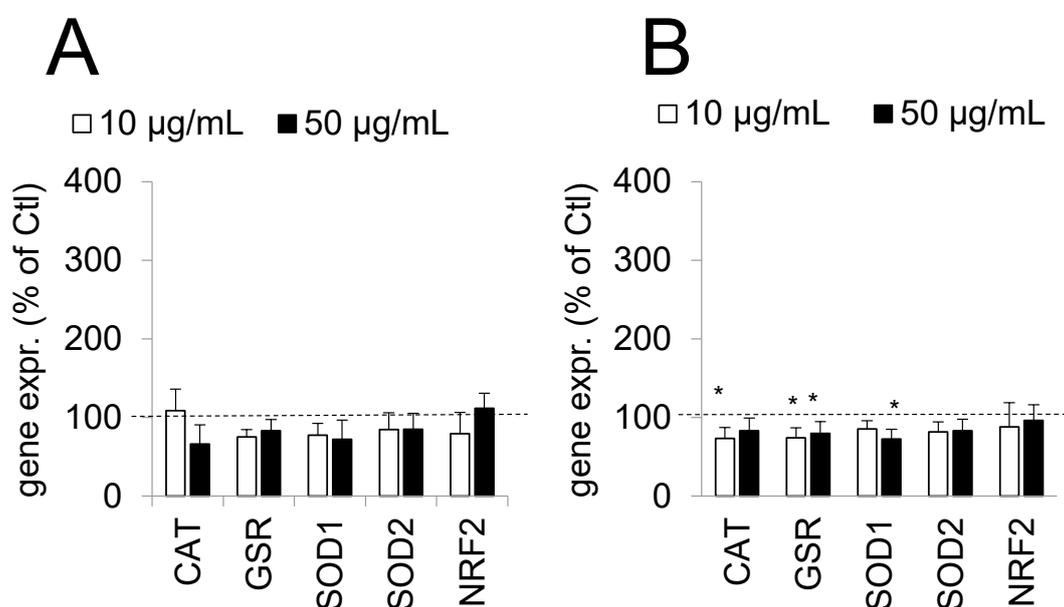


Figure 3. mRNA expression of redox enzymes in cells chronically exposed to E171. mRNA expression was obtained by RT-qPCR in Caco-2 cells (A) and Caco-2/HT29-MTX coculture (B) after chronic exposure to 10 or 50  $\mu\text{g/mL}$  of E171. The probed genes were catalase (CAT), glutathione reductase (GSR), superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1, SOD2) and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2). Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and presented as average  $\pm$  standard deviation, \* $p < 0.05$ , exposed vs control,  $n = 3$ .

Lastly, mRNA expression level of *NRF2*, a transcription factor implicated in oxidative stress regulation was investigated, but no significant change was observed following acute and chronic exposure to  $\text{TiO}_2$  particles in both models (table S5).

## Endoplasmic reticulum stress

Oxidative stress has been shown to cause endoplasmic reticulum (ER) stress, which in the intestine is known to be implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel disease through the UPR response pathway activation (Garg *et al.*, 2012; Zhang and Kaufman, 2008). The UPR signaling cascades are initiated by three ER-localized protein sensors: IRE-1, PERK (transmembrane proteins) and ATF6 (transcription factor). GRP78/BiP is a chaperone protein with a critical role in controlling protein quality and activation of the signaling molecules in the ER. ATF6 and active XBP1 transcription factors mediate UPR mechanism of action. Another transcriptional factor, CHOP, mediates ER-stress-induced apoptosis in cell (Chaudhari *et al.*, 2014; Zhang and Kaufman, 2008).

We evaluated the mRNA expression of these ER stress markers in the two cell models exposed to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs.

Acute exposure to E171 down-regulated *ATF6* in Caco-2 monoculture and *CHOP*, *ATF6*, *GRP78* and *IRE-1* in the Caco-2/HT29-MTX coculture at 48 h (figure 4A-B). *IRE-1* was also down-regulated at 6 h. Conversely, no gene expression modulation was observed in the two cell models when acutely exposed to A12 or P25 (table S6). Upon chronic exposure of Caco-2 cells, 10 and 50 µg/mL E171 induced down-regulation of the expression of *CHOP* and *GRP78*, respectively (figure 4C). Chronic exposure to 50 µg/mL A12 and P25 down-regulated the expression of *CHOP* then *ATF6* and *GRP78* respectively (table S6). In Caco-2/HT29-MTX coculture, chronic exposure to 50 µg/mL E171 down-regulated *sXBP1* (figure 4D). Conversely, up-regulation of *CHOP* was observed after exposure to A12 and P25 at 50 µg/mL, P25 at 10 µg/mL also down-regulated *GRP78* (table S6).

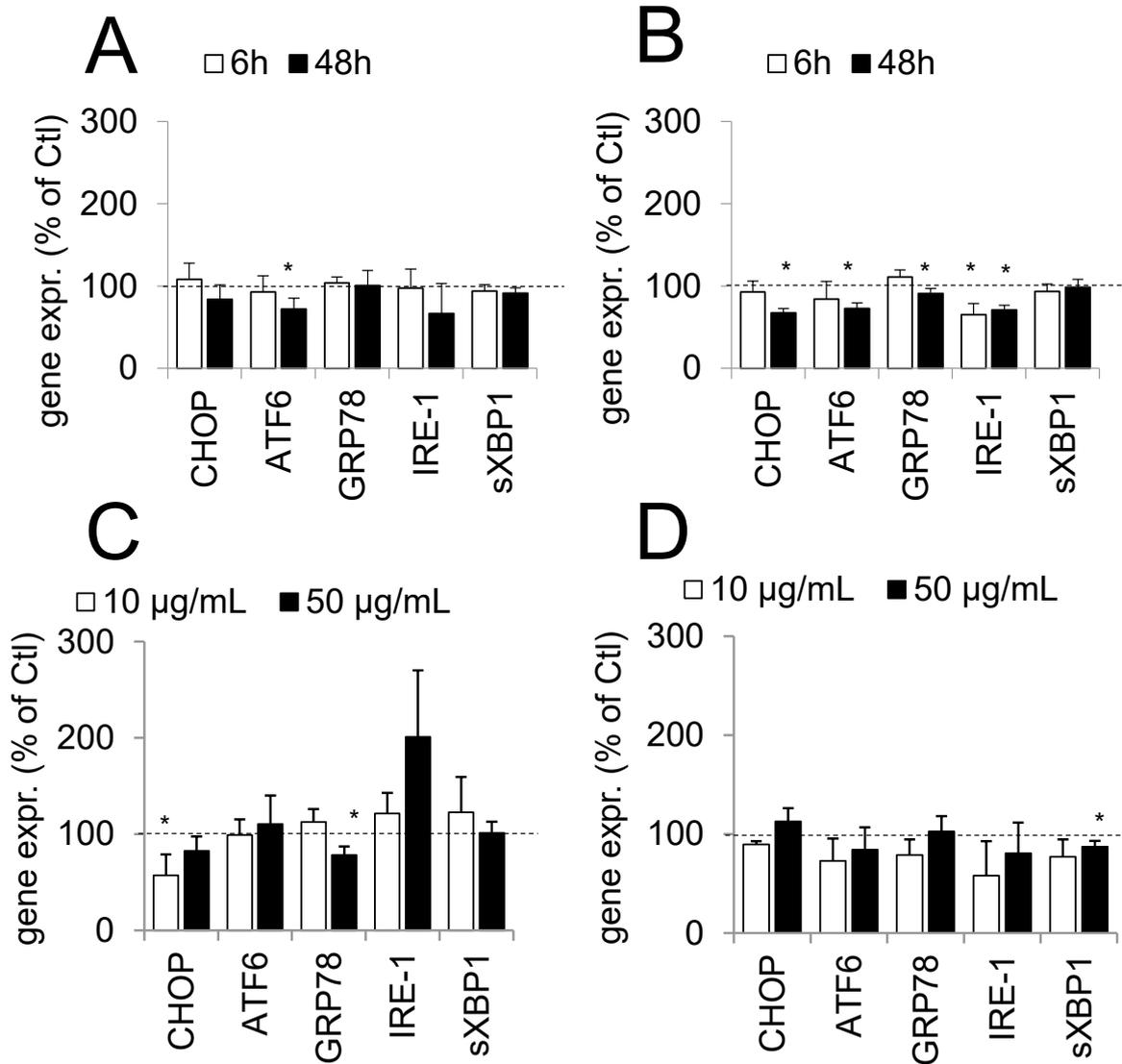


Figure 4. mRNA expression of endoplasmic reticulum stress markers in cells chronically exposed to E171. mRNA expression was obtained using RT-qPCR in Caco-2 cells (A, C) and Caco-2/HT29-MTX coculture (B, D) after acute to 50  $\mu\text{g/mL}$  of E171 for 6 h and 48 h (A, B) or chronic exposure to 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$  of E171 (C, D). The probed genes encoded proteins involved in endoplasmic reticulum stress regulation: CHOP, ATF6, GRP78, IRE-1, sXBP1. Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and presented as average  $\pm$  standard deviation, \* $p < 0.05$ , exposed vs control,  $n = 3$ .

## Discussion

The objective of the present study was to evaluate the impact of E171 food additive on two *in vitro* models of human ileum, Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX and to compare it to the impact of two model TiO<sub>2</sub>-NPs. Two exposure regimens were compared: acute and chronic; and markers of viability, oxidative stress, DNA damage, endoplasmic reticulum stress were analyzed. In all experiments, cells were exposed to 10, 50 and 100 µg/mL of TiO<sub>2</sub> particles which are high concentrations that can be considered as a worst case scenario.

The cellular response observed here following E171 exposure is disturbance of the redox balance, oxidatively damaged DNA and disturbance of the unfolded protein response (UPR). These three responses are closely interconnected (Cornick *et al.*, 2015; McGuckin *et al.*, 2011a). Not surprisingly, we observe increased ROS levels in both cell models and both regimens of exposure to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs. This is a classical effect observed after exposure to nanomaterials, especially TiO<sub>2</sub>-NPs (Shi *et al.*, 2013). If ROS accumulate in cells and are not appropriately scavenged by dedicated enzymes, they may impair biological molecules such as proteins, lipids and DNA (Fernández-Blanco *et al.*, 2014; Matés, 2000; Wijeratne *et al.*, 2005) explaining the DNA oxidation that we observe here and that already been largely discussed elsewhere (Magdolenova *et al.*, 2013; Petersen and Nelson, 2010). Increased ROS levels may also obstruct protein folding, causing unfolded protein accumulation inside the ER and therefore ER stress (Deuring *et al.*, 2011). Loss of ER homeostasis activates the unfolded protein response (UPR), a cascade of signal transduction and transcriptional events that restore correct protein folding and ER homeostasis (McGuckin *et al.*, 2010). The UPR signaling cascade involve several proteins that can be used as biomarkers of ER stress activation. These cascades are initiated by three ER-localized protein sensors that are the transmembrane proteins IRE-1 and PERK and the transcription factor ATF6. The chaperone GRP78/BiP plays a critical role in controlling protein quality and activates signaling molecules in the ER (McGuckin *et al.*, 2010). ATF6 and active XBP1 transcriptions factors mediate UPR mechanism of action. Measurement of the spliced XBP1 mRNA reflects UPR activation and is involved in intestinal epithelial cell inflammation (Kaser *et al.*, 2008; McGuckin *et al.*, 2010). CHOP,

another transcriptional factor, mediates ER-stress-induced apoptosis; it is upregulated in ER stress (Chaudhari *et al.*, 2014; Oyadomari and Mori, 2003; Xu, 2005; Zhang and Kaufman, 2008). In Caco-2/HT29-MTX, chronic exposure to the highest concentration of TiO<sub>2</sub>-NPs increases levels of CHOP expression, suggesting ER stress-induced apoptosis. On this marker, the higher response observed in the Caco-2/HT29-MTX model could be explained by a response to unfolded mucins; indeed *in vivo* accumulation of immature mucins is known to cause ER stress and lead to decreased production of mature mucins (Heazlewood *et al.*, 2008). Conversely E171 rather down-regulates the other ER-stress markers, also mainly in the Caco-2/HT29-MTX model, which may reflect E171-induced inactivation of the unfolded protein response. This decreased expression of all the markers except CHOP, which is involved in the last stage of the ER stress response may suggest that the ER stress peak occurred earlier and that we observe here ER stress resolution. Importantly, *in vivo*, mice with impaired expression of XBP1 or IRE1 spontaneously developed IBD, or increased susceptibility to intestinal inflammation (Bertolotti *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007). Hosomi *et al.*, (2015), highlighted that intestinal epithelial cells, especially Paneth cells, are highly susceptible to ER stress, thus dependent upon the UPR for the maintenance of epithelium homeostasis. The UPR critically interacts with autophagy. When dysfunctional in the Paneth cell, spontaneous inflammation can emerge, as a subset of IBD. In summary exposure to high doses of TiO<sub>2</sub>-NPs and E171 would inhibit the UPR response, leading to subsequent increased susceptibility to intestinal inflammation.

Acute exposure regimen induced only minor cellular response in both cell models exposed to the three particles. This is in accordance with the published literature which shows that TiO<sub>2</sub> is globally not highly toxic, even at high concentration (Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). In this exposure mode, despite ROS production, no oxidative stress or oxidatively damaged DNA is observed. This was already reported in human bronchial epithelial cells exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs (Bhattacharya *et al.*, 2009) and in human intestinal epithelial cells exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs (Zijno *et al.*, 2015) and E171 (Z.-M. Song *et al.*, 2015). This proves that cells still hold their ability to deal with ROS over-production thanks to their endogenous antioxidant

systems. Conversely, after chronic exposure, a significant although moderate response was observed in both cell models. Indeed, increased cellular ROS was observed as well as oxidatively damaged DNA. This occurred concomitantly with down-regulation of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GSR) genes, in the Caco-2/HT29-MTX co-culture. E171 might thus indirectly oxidize DNA through down-regulation of antioxidant systems, especially the superoxide dismutase, leading to accumulation of superoxide in cells. With respect to these cellular responses, it is probable that NRF2, a transcription factor that is activated in response to oxidative stress and regulates the expression of a battery of antioxidant genes is activated (Shelton and Jaiswal, 2013). Moreover, NRF2 has also been shown to positively regulate the expression of ABC transporters involved in intestinal barrier function (Ji *et al.*, 2013; Maher *et al.*, 2007, 2005), that we previously showed to be upregulated in Caco-2 cells exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs (Dorier *et al.*, 2015). Here we observe no change in *NRF2* mRNA expression after exposure to the particles in both cell models.

The higher cellular response of chronically-exposed cells can be explained by the higher quantity of particles to which cells are exposed in this regimen. Indeed, the exposure medium containing particles is renewed three times per week for three weeks, leading to a total exposure dose which is eight times as high as the exposure dose in the acute exposure regimen. Moreover, microvilli in differentiated enterocytes preclude the endocytosis of larger particles or aggregates, as already reported (Brun *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2009; Janer *et al.*, 2014). Secondly, we started the chronic exposure when cells were not totally differentiated i.e. 1 day after seedling, vs. 21 days after seedling in the acute exposure scenario. According to various studies, undifferentiated cells are more sensitive than differentiated one (Gerloff *et al.*, 2013; Z.-M. Song *et al.*, 2015). This higher sensitivity of undifferentiated cells may thus also explain our observation.

We observe that the Caco-2/HT29-MTX co-culture model shows more intense response than the Caco-2 monoculture model. Again, this may be due to higher intracellular accumulation in the co-culture model which contains HT29-MTX cells that are devoid of microvilli and consequently can accumulate higher quantities of particles, as discussed in our previous article (Brun *et al.*, 2014). Moreover, HT29-

MTX secrete mucus, which represents an efficient barrier against xenobiotics and avoids the contact between particles and the cell membrane. However, depending on the physicochemical properties of particles, especially their surface charge (Boland *et al.*, 2014; Fröhlich, 2012) and on the intrinsic properties of the mucus layer (McGuckin *et al.*, 2009; Thim *et al.*, 2002), the particles may interact with mucins and accumulate in the mucus layer. The mucus layer may subsequently serve as a reservoir of NPs that are continuously delivered to underlying cells (McCracken *et al.*, 2016), explaining higher intracellular accumulation in the Caco-2/HT29-MTX model.

The cellular response observed here following E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs i.e. excessive ROS accumulation, oxidative stress and ER stress, may alter the intestinal barrier functions which are already malfunctioning in people suffering from IBD (Antoni *et al.*, 2014). Many components of this barrier, such as commensal bacteria, mucus secretion, nutrient transports, immune system and xenobiotics protection might be impacted and are likely to be involved in some intestinal disease condition (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

## Conclusion

We show here that E171 does not cause overt reduction of cell viability nor DNA strand breaks. We however show that it increases ROS production in exposed cells, concomitantly with induction of oxidized DNA bases. It also perturbs endoplasmic reticulum homeostasis. More intense cellular response is observed in the chronic exposure regimen, as well as in the mucus-secreting ileum epithelium model. This higher response in the mucus-secreting model may be due to particle trapping in the mucus layer, which may serve as a reservoir that extends the duration of intestinal cell exposure to the particles. Finally, these results would necessitate in vivo validation since the exposure regimens used here reflect a worst case scenario, especially because they involve high exposure doses. However, these results suggest to deeper evaluate the impact that E171 on the determinants of the intestinal barrier function, i.e. the composition and thickness of the mucus layer, the microbiota, as well as the regulation of inflammatory processes in the intestine.

## Acknowledgments

This work was supported by Atomic Energy and Alternative Energies Commission through the ‘Toxicology’ research program and by ADEME. 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 thank T. Lesuffleur (INSERM U938, Paris, France) for generous gift of HT29-MTX cells, and V. Collin-Faure (CEA-Grenoble, France) for help with FACS experiment.

## Supplementary data

	Forward primer	Reverse primer
<b>Oxidative stress</b>		
CAT	5'-AGC-TTA-GCG-TTC-ATC-CGT-GT-3'	5'-TCC-AAT-CATC-CGT-CAA-AAC-A-3'
GSR	5'-GAT-CCC-AAG-CCC-ACA-ATA-GA-3'	5'-CTT-AGA-ACC-CAG-GGC-TGA-CA-3'
SOD1	5'-AGG-GCA-TCA-TCA-ATT-TCG-AG-3'	5'-ACA-TTG-CCC-AAG-TCT-CCA-AC-3'
SOD2	5'-TCC-ACT-GCA-AGG-AAC-AAC-AG-3'	5'-TCT-TGC-TGG-GAT-CAT-TAG-GG-3'
NRF2	5'-CAG-TCA-GCG-ACG-GAA-AGA-GT-3'	5'-ACC-TGG-GAG-TAG-TTG-GCA-GA-3'
<b>Endoplasmic reticulum stress</b>		
GRP78	5'-GGT-GAA-AGA-CCC-CTG-ACA-AA-3'	5'-GTC-AGG-CGA-TTC-TGG-TCA-TT-3'
CHOP	5'-TGG-AAG-CCT-GGT-ATG-AGG-AC-3'	5'-TGT-GAC-CTC-TGC-TGG-TTC-TG-3'
IRE1	5'-AGA-GAG-GCG-GGA-GAG-CCG-TG-3'	5'-CGA-GGA-GGT-GGG-GGA-AGC-GA-3'
sXBP1	5'-GCA-GGT-GCA-GGC-CCA-GTT-GT-3'	5'-TGG-GTC-CAA-GTT-GTC-CAG-AAT-GC-3'
ATF-6	5'-CCA-GCA-GCA-CCC-AAG-ACT-CAA-ACA-3'	5'-GTG-TGA-CTC-CCC-CAG-CAA-CAG-C-3'

Table S1. Primers used in RT-qPCR experiments.

	Caco-2	Caco-2/HT29-MTX
Control	3942±147	302±12
E171	4278±293	280±12
A12	3916±140	310±18
P25	3983±197	347±21

Table S2. Measurement of epithelia integrity after exposure to TiO<sub>2</sub> particles. The TEER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) was measured in 12-well transwell® clear inserts where Caco-2 or Caco-2/HT29-MTX cells were continuously grown for 21 days in cell culture medium containing 50  $\mu\text{g/mL}$  E171, A12 or P25. Values are mean  $\pm$  standard deviation; statistics: \* $p < 0.05$ . None of the values was significant different from the control.

	Caco-2		Caco-2/HT-29-MTX	
	Alkali-labile	+Fpg	Alkali-labile	+Fpg
A12 10 µg/mL 6 h	1.2±0.5	1.0±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1
A12 10 µg/mL 48 h	0.7±0.3	1.3±0.05	2±0.9	1.2±0.0
A12 50 µg/mL 6 h	1.1±0.7	1.5 ±0.04	0.9±0.2	0.9±0.02
A12 50 µg/mL 48 h	0.9±0.06	1.1±0.7	2.1±1.5	3.7±1.5
E171 10 µg/mL 6 h	0.5±0.08	1.4±0.3	0.5±0.2	0.9±0.3
E171 10 µg/mL 48 h	0.9±0.1	1.7±0.3	2.6±0.7	1.8±0.9
E171 50 µg/mL 6 h	1.2±0.7	1.2±0.05	0.8±0.07	1.1±0.01
E171 50 µg/mL 48 h	1.5±0.3	1.7±0.02	0.9±0.1	3.5±0.9

Table S3. DNA damage caused by TiO<sub>2</sub> particles, assessed with the comet assay. Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX were exposed to 10 or 50 µg/mL of A12, P25 or E171 for 6 h or 48 h. They were then analyzed using the alkaline version of the comet assay (“alkaline”), or its Fpg-modified version (“+Fpg”). Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells), as average ± standard deviation of 3 independent experiments. \*p<0.05, exposed vs control, n=3.

A

	Caco-2				Caco-2/HT29-MTX			
	acute	Acute + H <sub>2</sub> -DCF-DA	chronic	chronic + H <sub>2</sub> -DCF-DA	acute	acute + H <sub>2</sub> -DCF-DA	chronic	chronic + H <sub>2</sub> -DCF-DA
Control	11.9±2.9	9185.6±915.8	15.4±0.3	3739.2±370.0	17.2±0.3	11643.2±937.7	15.7±0.0	3056.8±145.5
A12 50 µg/mL	9.4±1.1	11758.7±902.1	11.0±1.7	3743.1±195.3	14.6±0.3	11992.4±1213.5	16.5±3.0	3768.0±347.5
P25 50 µg/mL	9.2±0.6	13785.2±131.9	10.5±2.3	5000.0±683.0	14.6±0.9	16646.6±607.0	15.4±0.7	4177.8±613.3
E171 10 µg/mL	10.0±2.1	11662.4±763.2	12.2±0.1	3879.0±194.5	17.1±1.3	14673.4±1454.1	15.7±2.5	3686.1±129.0
E171 50 µg/mL	8.4±1.6	15081.0±1775.0	13.2±0.3	4063.7±102.5	16.5±0.5	14940.1±1697.9	14.7±0.1	4003.4±332.8
E171 100 µg/L	7.9±0.8	14664.9±1770.3	11.2±1.6	4438.9±496.8	14.1±2.3	18843.0±2751.2	14.6±0.5	4208.8±405.5

B

	PBS + H <sub>2</sub> -DCF-DA
Control	2.6±0.1
A12 50 µg/mL	3.3±0.0
P25 50 µg/mL	3.4±0.2
E171 10 µg/mL	2.7±0.2
E171 50 µg/mL	3.2±0.3
E171 100 µg/L	4.1±0.1

Table S4. Interference of TiO<sub>2</sub> particles with the H<sub>2</sub>-DCF-DA assay. Fluorescence was measured with excitation at 480 nm and emission at 530 nm either A) in exposed-cells without H<sub>2</sub>-DCF-DA compared to exposed-cells with H<sub>2</sub>-DCF-DA or B) in particles suspensions with PBS and H<sub>2</sub>-DCF-DA.

	Caco-2				Caco-2/HT29-MTX			
	6h-50µg/mL	48h-50µg/mL	21 days-10 µg/mL	21 days-50 µg/mL	6h-50µg/mL	48h-50µg/mL	21 days-10 µg/mL	21 days-50 µg/mL
<b>A12</b>								
CAT	1.02±0.39	0.94±0.2	0.91±0.230	0.96± 0.28	1.2-±0.19	1.29±0.29	0.7±0.16*	0.76±0.16
GSR	0.97±0.31	0.94±0.14	0.81 ±0.12	0.78 ±0.16	1.12±0.14	1.25±0.13*	0.82±0.16	0.8±0.14
SOD1	1.01±0.25	0.96±0.26	0.95 ±0.19	0.95±0.2	1.09±0.21	1.17±0.26	0.78±0.12*	0.78±0.14
SOD2	0.87±0.46	0.84±0.28	0.89 ±0.31	1±0.24	0.97±0.25	0.96±0.58	0.81±0.21	0.89±0.32
NRF2	0.91±0.53	0.82±0.17	0.74±0.3	0.76±0.18	0.89±0.17	1.33±0.38	0.84±0.28	0.83±0.33
<b>P25</b>								
CAT	0.98±0.41	0.78±0.37	1.09±0.6	1.05±0.24	0.82±0.16	0.97±0.27	0.72±0.13*	0.78±0.16
GSR	0.93±0.31	1±0.15	0.47 ±0.43	0.86±0.12	0.84±0.1	0.96±0.17	0.83±0.14	0.87±0.16
SOD1	1.14±0.17	1.1±0.3	1.05 ±0.04	0.92 ±0.19	0.79±0.15	0.95±0.21	0.74±0.09	0.87±0.23
SOD2	1.12±0.26	1.05±0.35	1.28±0.36	1±0.26	0.78±0.21	0.65±0.41	0.83±0.14	1.02±0.25
NRF2	0.68±0.22	0.93±0.21	0.57±0.56	0.87±0.2	0.74±0.28	0.97±0.18	0.83±0.2	0.81±0.18
<b>E171</b>								
CAT	1.00±0.38	1.15±0.37	1.09±1.27	0.66±0.25	1.01±0.15	1.2±0.28	0.73±0.14*	0.83±0.16
GSR	1.00±0.33	1.08±0.31	0.75±0.09	0.83±0.15	0.98±0.07	1.13±0.12	0.74±0.13*	0.8±0.15*
SOD1	1.18±0.34	1.14±0.47	0.78±0.15	0.72±0.24	0.93±0.18	1.17±0.26	0.85±0.11	0.72±0.12*
SOD2	1.44±0.83	1.07±0.47	0.84±0.22	0.85±0.2	0.87±0.21	0.91±0.67	0.81±0.13	0.83±0.15
NRF2	0.89±0.49	0.87±0.38	0.79±0.27	1.12±0.19	0.85±0.11	1.1±0.37	0.88±0.31	0.96±0.2

Table S5. RT-qPCR analysis of the mRNA expression of redox enzymes. Impact on gene expression of selected oxidative stress regulator genes obtained by RT-qPCR from cells exposed for 6 h, 48 h to 50 µg/mL and 21 days to 10 or 50 µg/mL of A12, P25 and E171. Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and expressed as average ± standard deviation. \*p<0.05 (in red), exposed vs control, n=3.

	Caco-2				Caco-2/HT29-MTX			
	6h-50µg/mL	48h-50µg/mL	21 days-10 µg/mL	21 days-50 µg/mL	6h-50µg/mL	48h-50µg/mL	21 days-10 µg/mL	21 days-50 µg/mL
<b>A12</b>								
CHOP	1.16±0.37	0.78±0.09*	0.74± 0.1*	0.8 ±0.17	0.93±0.13	0.8±0.06	0.96±0.17	1.19±0.17*
ATF6	0.94±0.08	0.64±0.17	1.13± 0.23	0.9 ±0.16	0.83±0.2	0.98±0.28	0.8±0.21	1.16±0.37
GRP78	1.08±0.12	1.11±0.17	1.18 ±0.14	0.89 ±0.12	1.17±0.1	0.99±0.14	0.88±0.23	1.01±0.19
IRE-1	0.9±0.16	0.66±0.18	0.9 ±0.18	0.93 ±0.16	0.74±0. 23	0.99±0.21	0.82±0.34	1.23±0.58
sXBP1	0.92±0.08	0.8±0.05	1.08 ±0.12	0.92 ±0.09	0.98±0.07	1.05±0.14	0.93±0.07	1.09±0.34
<b>P25</b>								
CHOP	1±0.25	0.97±0.48	0.75±0.09	0.71±0.12	0.76±0.13	0.96±0.17	1.41±0.6	1.7±0.67*
ATF6	0.98±0.26	0.71±0.21	0.86±0.17	0.6 ±0.12*	0.97±0.21	0.91±0.26	0.94±0.42	1.23±0.31
GRP78	0.95±0.07	0.94±0.14	0.96±0.12	0.72±0.13*	0.96±0.09	1.02±0.06	0.69±0.14*	1.21±0.5
IRE-1	1.22±0.34	0.9±0.34	0.87±0.15	0.79 ±0.19	0.63±0.13	0.72±0.23	1 ±0.49	1.38±0.55
sXBP1	0.97±0.07	0.83±0.2	0.85± 0.08	0.77 ±0.12	0.89±0.02	0.99±0.14	0.88±0.14	1.27±0.33
<b>E171</b>								
CHOP	1.08±0.2	0.84±0.17	0.57±0.22*	0.83±0.15	0.93±0.13	0.67±0.06*	0.9±0.03	1.13±0.13
ATF6	0.93±0.2	0.72±0.13*	0.99±0.16	1.11±0.3	0.84±0.2	0.73±0.07*	0.73±0.23	0.84±0.23
GRP78	1.04±0.07	1.01±0.18	1.13±0.13	0.78±0.09*	1.11±0.08	0.91±0.06*	0.79±0.16	1.03±0.16
IRE-1	0.97±0.23	0.67±0.36	1.22±0.21	2.01±0.69	0.65±0.17*	0.71±0.06*	0.58±0.35	0.81±0.31
sXBP1	0.94±0.08	0.92±0.06	1.23±0.37	1.01±0.12	0.93±0.07	0.99±0.1	0.77±0.18	0.87±0.06*

Table S6. RT-qPCR analysis of the mRNA expression of endoplasmic reticulum stress markers. Impact on gene expression of selected ER stress regulator genes obtained by RT-qPCR from cells exposed for 6 h, 48 h to 50 µg/mL or 21 days to 10 or 50 µg/mL of A12, P25 and E171. Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and expressed as average ± standard deviation. \*p<0.05 (in red), exposed vs control, n=3.

	cytotoxicity	ROS	Oxidatively damaged DNA	Gene expr. Ox. stress	Gene expr. ER stress
Caco-2 acute A12		X			
Caco-2 acute P25		X			
Caco-2 acute E171		X			X
Caco-2 chronic A12		X			X
Caco-2 chronic P25		X			X
Caco-2 chronic E171		X	X		X
Caco-2/HT29-MTX acute A12		X		X	
Caco-2/ HT29-MTX acute P25		X			
Caco-2/ HT29-MTXacute E171		X			X
Caco-2/HT29-MTX chronic A12				X	X
Caco-2/HT29-MTXchronic P25		X		X	X
Caco-2/ HT29-MTX chronic E171		X		X	X

Table S7. Summary of the results. Results obtained in Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cell models after acute and chronic to A12, P25, and E171. X means a significant impact of the particle in exposed cells.

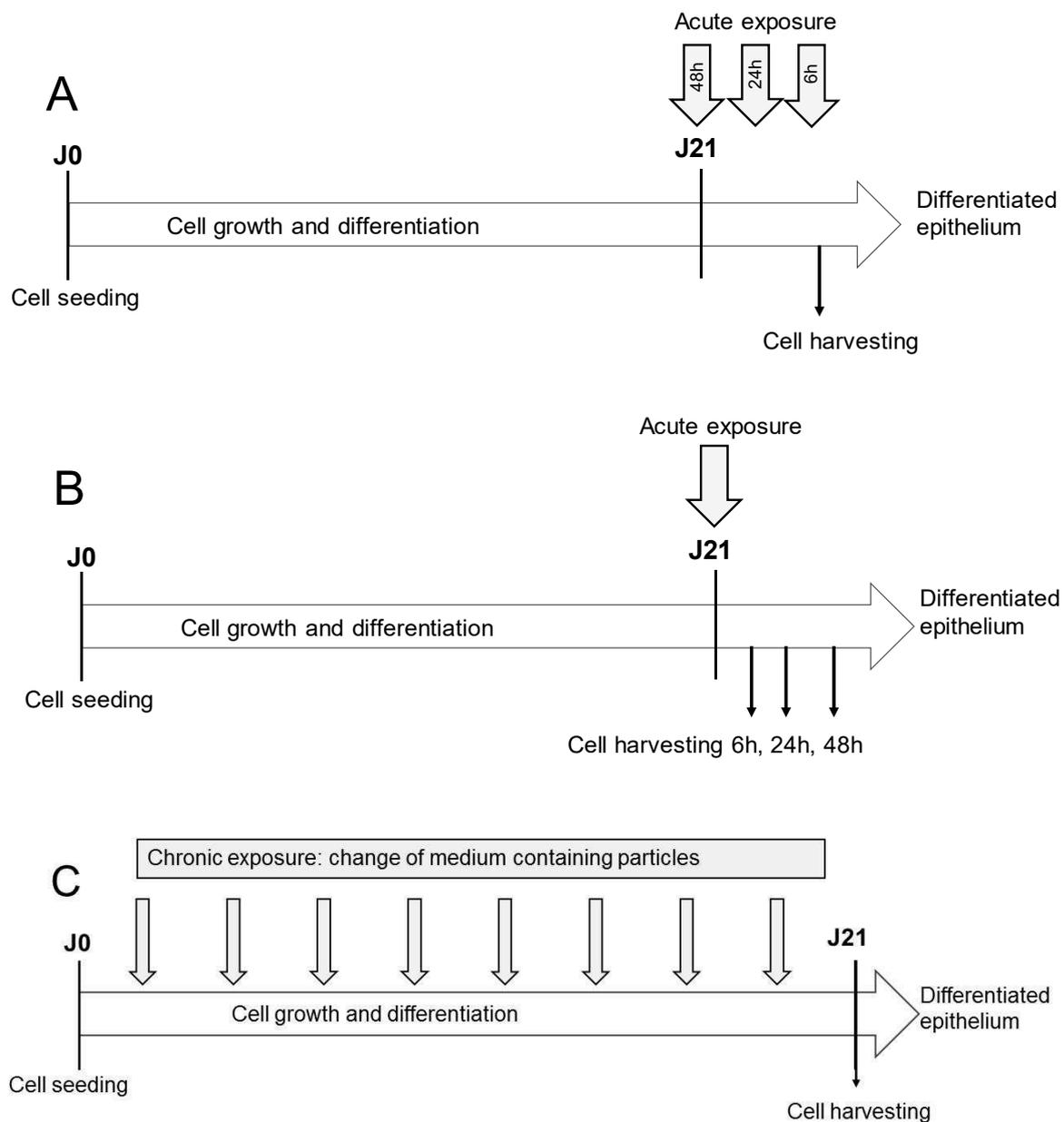


Figure S1. Schematic representation of cell exposure protocol. (A, B) Acute exposure: 21 days after seeding, differentiated cells were exposed to particles for 6 h or 48 h. Cells were either exposed at different time and harvested at the same time (A), or exposed once and harvested at different times (B). (C) Chronic exposure: cells were seeded then from the following day they were exposed to particles during the 21 days of their differentiation, i.e. the culture medium containing TiO<sub>2</sub> particles was renewed eight times from seeding to harvesting.

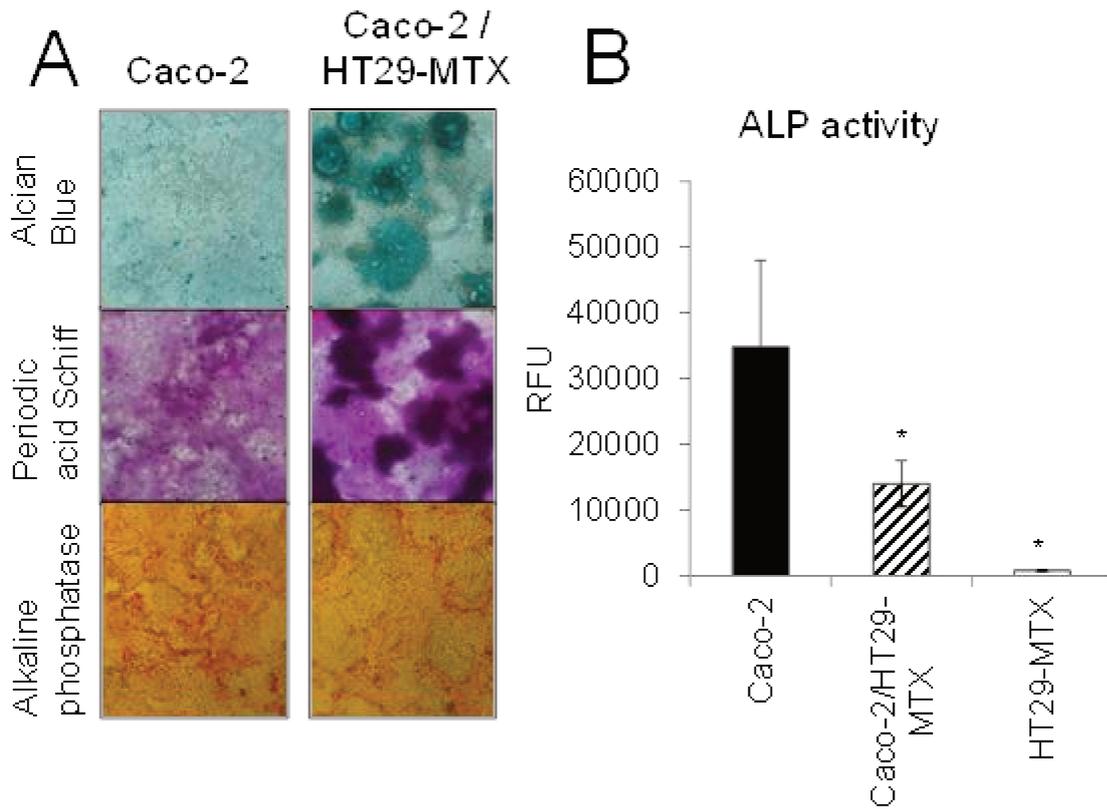


Figure S2. Characterization of the cell models. (A) Alcian Blue and Periodic Acid Schiff (PAS) staining of the mucus and staining of alkaline phosphatase, in Caco-2/HT29-MTX coculture, compared to Caco-2 cells. (B) Alkaline phosphatase (ALP) activity measured in Caco-2 cells, Caco-2/HT29-MTX coculture and HT29-MTX monoculture after 21 days of differentiation. Results represent mean fluorescence  $\pm$  standard deviation, \* $p < 0.05$  Caco-2/HT29-MTX or HT29-MTX vs Caco-2,  $n = 3$ .

### 3. Résultats complémentaires : Accumulation des particules dans les cellules

Nous avons quantifié l'accumulation des particules du colorant E171 et des NPs de TiO<sub>2</sub>, par ICP-MS, dans les modèles Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX exposés de façon chronique et aiguë aux particules. Une seule expérience avec trois puits différents par condition a été réalisée.

Au préalable, nous nous sommes assuré que le E171 se dissolvait bien lorsque l'on appliquait le protocole de minéralisation mis au point par nos collaborateurs, M.Dubosson et C.Desvergne (LBM, CEA-Grenoble). Pour cela, nous avons comparé à l'ICP-MS les minéralisations de E171, A12 et P25 avec celle du titane ionique (Ti), déjà sous forme dissoute. Les résultats (figure 59) nous ont permis de valider le protocole de minéralisation du titane. En considérant que le titane ionique (Ti) est minéralisé à 100 % lors du protocole, P25 et A12 sont minéralisés à 123 % et 111 % respectivement et E171 à 97 %. Des résultats supérieurs à 100 % s'expliquent du fait du manque de précision lors de la préparation des solutions de particules (A12, P25, E171) contrairement à celle du Ti ionique : lors de la pesée des poudres, de la mise en solution et des dilutions. En effet, les courbes de minéralisations sont obtenues par rapport aux concentrations théoriques des solutions que nous avons préparées.

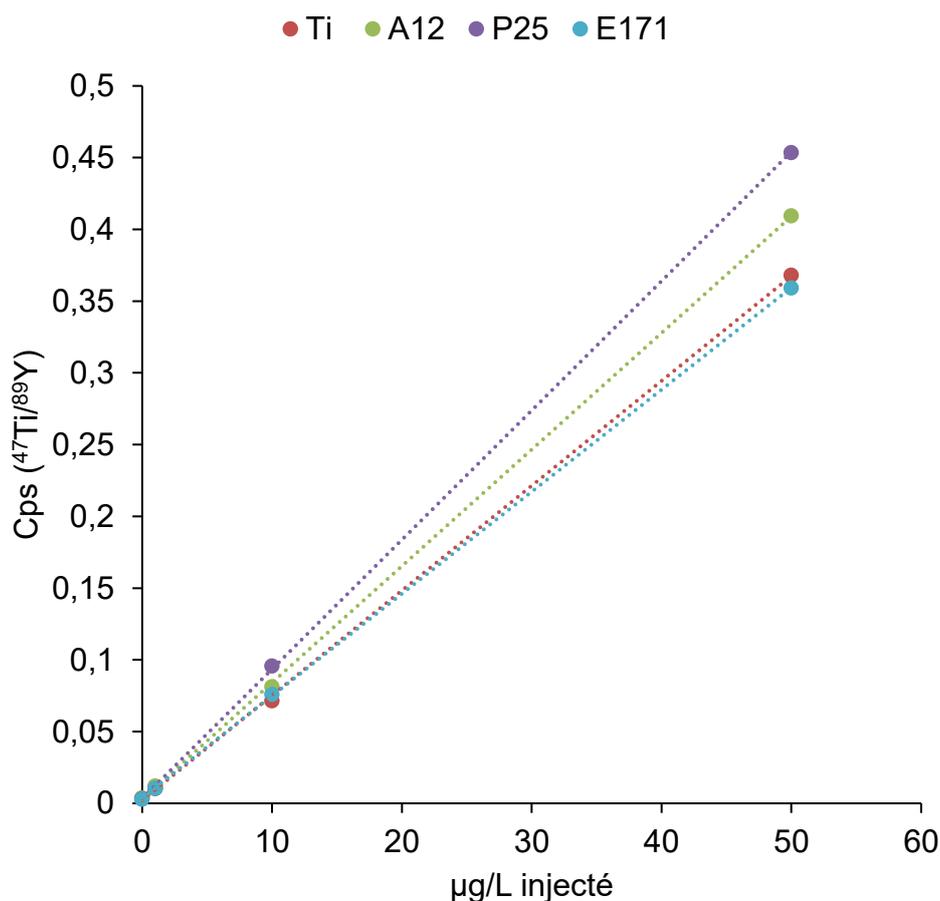


Figure 59 : Calibration de la minéralisation des particules de TiO<sub>2</sub>. Les trois particules de TiO<sub>2</sub> sont minéralisées selon le même protocole que du Ti ionique afin de s'assurer qu'elles sont totalement dissoutes avant leur analyse à l'ICP-MS.

La quantification des particules accumulées dans les modèles cellulaires a donné les résultats présentés dans la figure 60. Les tests statistiques réalisés sur les triplicats ne montrent pas de différence significative d'accumulation des différentes particules, nous observons cependant des tendances, en effet, pour toutes les conditions d'exposition et dans les deux modèles cellulaires, E171 est la particule qui donne les valeurs d'accumulation les plus élevées, suivie de P25 et de A12. L'accumulation dans les cellules semble augmenter lorsque la taille des particules augmente. D'autre part, une deuxième observation est que l'accumulation semble plus importante après 21 jours ( $35,12 \pm 10,97 \mu\text{g}$ ) qu'à 6 h ( $4,43 \pm 2,35 \mu\text{g}$ ) et 48 h, ( $4,03 \pm 2,61 \mu\text{g}$ ). Les explications les plus probables sont que les cellules de l'exposition chronique accumulent plus car elles ne sont pas différenciées lors des premiers ajouts en particules, et que les différents ajouts

successifs déposent plus de particules qui sont alors également davantage accumulées ou adsorbées sur les cellules à cause de la sédimentation des particules en solution.

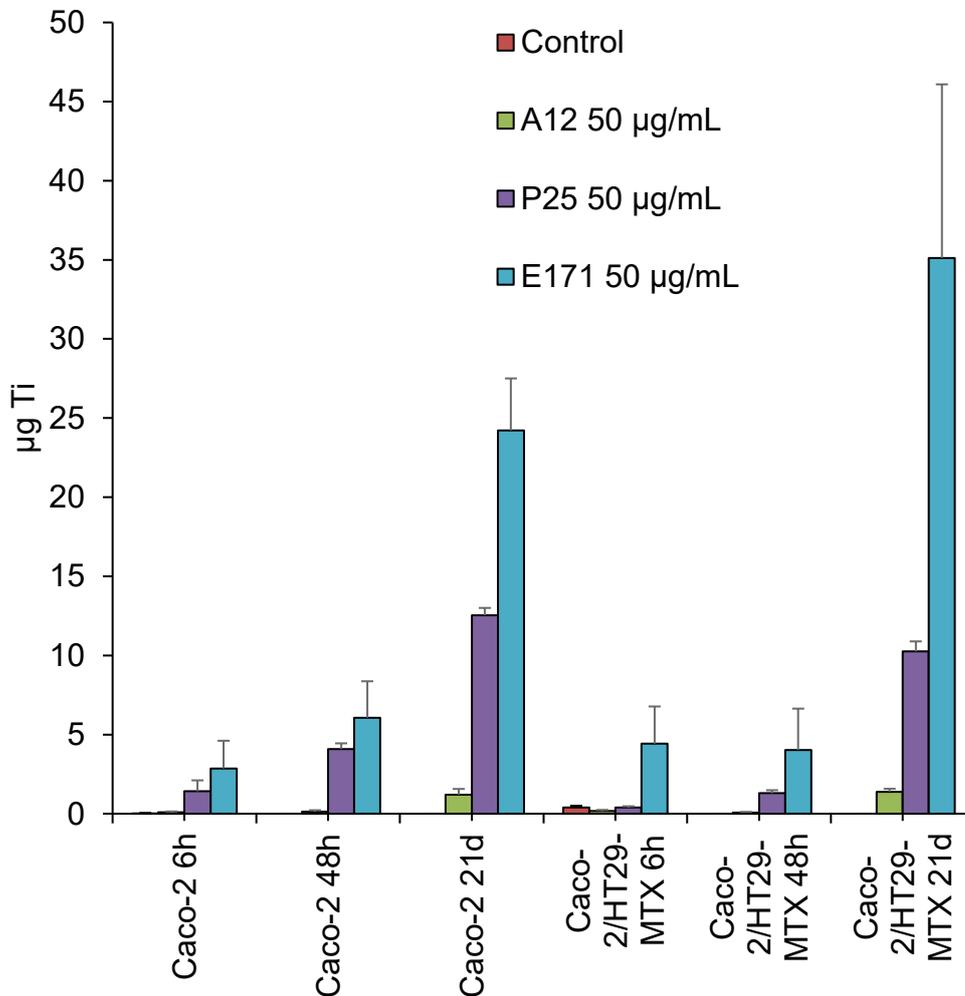


Figure 60 : Accumulation des particules de TiO<sub>2</sub> dans cellules. La quantité de particules de TiO<sub>2</sub> (µg) présente dans les échantillons biologiques est mesurée par ICP-MS.

Il serait intéressant de réaliser ces manipulations avec des cellules non différenciées afin de vérifier si effectivement elles accumulent davantage de particules ou en adsorbent davantage à leur surface.

#### 4. Conclusion

Nous n'observons pas de baisse de la viabilité cellulaire après l'exposition aiguë et chronique au colorant E171 et aux NP<sub>s</sub> de TiO<sub>2</sub> sur les deux modèles cellulaires.

L'exposition aigüe à E171 induit principalement une augmentation des ROS intracellulaires, ainsi qu'une baisse de l'expression des gènes codant les protéines du stress du RE. Elle n'induit pas de modification de l'expression des gènes codant les enzymes responsables de l'équilibre redox de la cellule, ni de cassure à l'ADN ou de dommages de type oxydatifs à l'ADN.

L'exposition chronique induit des effets plus importants. Elle cause également l'augmentation des ROS intracellulaires, cette fois-ci accompagnée de lésions de l'ADN de type base oxydées, et d'une modulation de l'expression des enzymes antioxydantes (dans le modèle de coculture seulement). De plus, l'expression des gènes impliqués dans le stress du RE est diminuée après l'exposition au colorant E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub> pour les acteurs de la voie UPR, excepté CHOP.

Ces résultats montrent ainsi que le colorant E171 n'induit que des effets toxiques modérés sur les cellules intestinales différenciées. Cependant, si la cellule n'est pas en mesure de réguler ce stress, celui-ci pourrait avoir des conséquences dommageables, par exemple induire une inflammation chronique. D'après nos résultats, l'exposition chronique aux particules cause davantage d'effets sur les cellules que l'exposition aigüe. Ces expositions causent également plus d'effets sur le modèle cellulaire Caco-2/HT29-MTX, sécrétant la couche de mucus, que sur le modèle Caco-2.

Ces effets ne sont pas systématiquement observés lorsque les cellules sont exposées aux NPs modèles, ils ne semblent pas uniquement attribuables à la part nanométrique des particules du E171.

Lors des premiers ajouts de particules dans les expositions chroniques, les cellules ne sont pas encore différenciées. C'est l'une des hypothèses qui nous permettent d'expliquer la plus grande sensibilité que nous observons lors des expositions chroniques aux particules. Pour compléter ces observations, nous avons comparé les effets observés sur les cellules différenciées avec ceux observés sur les mêmes modèles, mais non différenciés. Les résultats sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre.

## *Partie II : cellules non différenciées, résultats complémentaires*

### 1. Introduction

Ce second article a pour objet d'étudier la toxicité du colorant E171, *in vitro*, sur deux modèles cellulaires intestinaux de cellules non différenciées. Les cellules non différenciées sont généralement utilisées pour étudier l'impact de composés sur des cellules en prolifération et qui se différencient. Dans l'intestin, les cellules qui forment l'épithélium sont différenciées mais elles sont en perpétuel renouvellement. En effet, au sein des cryptes de Lieberkühn, les cellules souches, en perpétuelle division produisent en permanence des cellules qui se différencient et viennent remplacer les cellules intestinales. Ainsi les cellules se renouvellent tous les 3-5 jours. Dans la littérature, plusieurs études ont montré que les cellules non différenciées étaient plus sensibles que les cellules différenciées (Gerloff *et al.*, 2013; Z.-M. Song *et al.*, 2015). Les personnes présentant un renouvellement plus rapide de leurs cellules intestinales sont donc plus à risque, c'est le cas des personnes souffrant des MICI (Di Sabatino *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2014; Ramachandran *et al.*, 2000). A notre connaissance, il n'y a qu'une seule étude dans laquelle les auteurs se sont intéressés à l'impact du E171 sur des cellules Caco-2 non différenciées. Dans cette étude, les effets du E171 préalablement digéré dans des fluides gastriques reconstitués ont également été étudiés. Ces particules prédigérées sont internalisées dans les cellules et induisent l'accumulation de ROS intracellulaires mais elles ne sont pas cytotoxiques. A plus forte concentration, elles induisent également l'arrêt du cycle cellulaire (Z.-M. Song *et al.*, 2015).

Les deux modèles utilisés dans notre étude sont le modèle de monoculture Caco-2 et le modèle Caco-2/HT29-MTX en coculture (70 % et 30 %), exposés cette fois-ci à sub-confluence. Comme précédemment, les cellules ont été exposées au E171 ainsi qu'à deux NPs de TiO<sub>2</sub> modèles, A12 (anatase, 12 nm) et P25 (anatase/rutile, 25 nm) pendant 6 h, 24 h et 48 h. Les effets sur la viabilité cellulaire ont été évalués grâce au test MTT, les ROS intracellulaires ont été quantifiées grâce au test H2-

DCF-DA, et le stress du RE est évalué par analyse par RT-qPCR de l'expression d'une série de marqueurs.

## 2. Article 2

### **Toxicological impact of acute exposure to E171 food additive and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on Caco-2 and HT29-MTX intestinal cells**

Marie Dorier<sup>1,2</sup>, David Béal<sup>1,2</sup>, Nathalie Herlin-Boime<sup>3</sup>, Marie Carriere<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, INAC, SyMMES, Laboratoire Lesions des Acides Nucleiques, F-38000 Grenoble, France, <sup>2</sup>CEA, INAC, LCIB, Laboratoire Lesions des Acides Nucleiques, F-38054 Grenoble, France, <sup>3</sup>UMR3685, univ. Paris Saclay, IRAMIS, NIMBE, LEDNA, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France.

\*Correspondence:

Dr., Marie Carriere

E-mail: marie.carriere@cea.fr

Phone +33 4 38 78 03 28; Fax: +33 4 38 78 50 90

#### Abstract

The food additive E171 is a white powder made of TiO<sub>2</sub> particles. Because of its low toxicity and intestinal absorption, E171 has been authorized since the 60ies without any established acceptable daily intake. Thus, it is found in food, medicines and hygiene products. A growing interest emerged about this additive since it has been shown that it contains between 10 and 43 % of particles with at least one diameter below 100 nm, i.e., nanoparticles (NPs). Still, E171 is not a nanomaterial regarding the European definition, thus NPs labelling is not mandatory on products. The impact of TiO<sub>2</sub>-NPs on ingestion models is presently well known but studies about E171 toxicological impact after oral exposure is still scarce; its toxicity thus needs to be documented. To this purpose, we aimed here at evaluating the toxicological impact of E171 and two model TiO<sub>2</sub>-NPs, A12 and P25, on two intestinal cell lines, Caco-2 and HT29-MTX. Their impact was evaluated on undifferentiated cells, which represent proliferating epithelial cells of the intestine. These cells were acutely exposed for 6 h or 48 h to particles. Cell viability,

redox metabolism as well as impact of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs on actors of the UPR pathway, which is activated in ER stress condition, were investigated. Our results show that E171 causes ROS accumulation in exposed cells without altering their viability, even at high doses. It also modulates moderately but significantly the expression of some markers of the UPR pathway. Our data suggest that TiO<sub>2</sub>, either micro-sized or nano-sized, is not a massive toxicant to undifferentiated intestinal cells and that P25 and A12 TiO<sub>2</sub>-NPs produce different impact on cells.

## Introduction

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), the first oxide of titanium found in the earth's crust, is used for years as a white pigment. Designated as food additive E171 in food product (Ranjan *et al.*, 2014; Smolkova *et al.*, 2015), it has been authorized since the late 60ies by the US-FDA and JECFA (section 21-73 Code of Federal Regulations Food and Drug Administration (FDA)) on the basis of its poor solubility and lack of intestinal absorption and toxicity (Amenta *et al.*, 2015; Jovanović, 2015). Since this period, E171 is found in a wide range of food products, especially in candies and chewing gums (Weir *et al.*, 2012). Consequently, various studies estimated the human daily exposure to be either 1-2 mg TiO<sub>2</sub>/kg b.w. for US children under 10 and 0.2-0.7 mg TiO<sub>2</sub>/kg b.w. for other US consumers (Chen *et al.*, 2013; Weir *et al.*, 2012), 5 mg/person in UK (Powell *et al.*, 2010) or 0.035 mg/kg b.w. equivalent to 2.5 mg/person (Fröhlich and Roblegg, 2012).

E171 is mainly composed of micro-sized TiO<sub>2</sub> particles but it was shown to contain up to 43 % of nanoparticles (NPs), i.e. particles with one dimension <100 nm (Chen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014; Weir *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). Still, according to the European recommendation of nanomaterials definition<sup>37</sup>, it is not a nanomaterial because it contains less than 50 % of particles, in the number size distribution, with at least one dimension <100 nm (i.e. NPs).

Oral exposure to nano- and micro-sized TiO<sub>2</sub> particles from the diet is currently well documented (Powell *et al.*, 2010) but knowledge of their potential toxicity after ingestion remains scarce and needs to be investigated (McCracken *et al.*, 2016).

---

<sup>37</sup> 2011 Official Journal of the European Union (2011/696/EU) 18/10/2011

Conversely the toxicity of TiO<sub>2</sub> via the inhalation exposure route is now quite well documented, and led the international agency for research on cancer (IARC) to classify TiO<sub>2</sub> as possible carcinogen for human (group 2B) on behalf of the effective toxicity via inhalation (IARC, 2010).

*In vivo*, when ingested by human volunteers, pharmaceutical and food grade TiO<sub>2</sub> are absorbed systemically, in the form of particles and not dissolved ions (Pele *et al.*, 2015). Animal studies show low systemic translocation of TiO<sub>2</sub>-NPs, thus limiting its toxicity on secondary organs (Janer *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2015; MacNicoll, 2015; Warheit *et al.*, 2015). *In vitro*, TiO<sub>2</sub>-NPs accumulate preferentially in M cells and mucin-secreting cells as well as in undifferentiated enterocytes, much less in differentiated enterocytes (Brun *et al.*, 2014; Gerloff *et al.*, 2013; Z.-M. Song *et al.*, 2015).

Regarding their toxicological impact, *in vivo*, after oral administration in mice, fine and ultrafine TiO<sub>2</sub> particles can cause oxidative stress, DNA damage (Trouiller *et al.*, 2009) and inflammation (Sheng *et al.*, 2012) in the liver, kidneys, cardiovascular system and reproductive organs of exposed animals (Jia *et al.*, 2014; H. Liu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007). Toxicity was also demonstrated in rats (Al-Rasheed *et al.*, 2013b; Wang *et al.*, 2013; Warheit *et al.*, 2007). *In vitro*, in intestinal cells, they cause cell mortality, oxidative stress (Brun *et al.*, 2014), DNA damage (Gerloff *et al.*, 2009) and inflammation (De Angelis *et al.*, 2012; Krüger *et al.*, 2014). Regarding E171 or TiO<sub>2</sub> with similar properties, it accumulates more importantly in undifferentiated Caco-2 than in differentiated one. When pretreated with simulated digestive fluids at 200 µg/mL, it also inhibits the growth of undifferentiated Caco-2 (Z.-M. Song *et al.*, 2015). TiO<sub>2</sub> particles extracted from gum increase reactive oxygen species (ROS) levels in exposed cells. However no obvious membrane damage nor decreased cell viability is observed on enterocytes (Chen *et al.*, 2013).

The present study aimed at evaluating the toxicological impact of E171 on two cell lines derived from the human intestine, namely Caco-2 and HT29-MTX. Caco-2 is a model of enterocyte, while HT29-MTX were derived from the enterocyte-like cell line HT29 by treatment with methotrexate, which confers them the ability to permanently produce mucus (Lesuffleur *et al.*, 1990). These cell lines are

commonly used either in their differentiated or undifferentiated state for evaluating the toxicity of xenobiotics (Bazin *et al.*, 2010; Puerto *et al.*, 2010; Z.-M. Song *et al.*, 2015; Tarantini *et al.*, 2015). The phenotype of undifferentiated Caco-2 cells is that of proliferating cells, they closely resemble intestinal crypt epithelial cells, that replace enterocytes in the intestine every 5 days (Goodell *et al.*, 2015). According to various studies, their sensitivity towards NPs is higher than that of differentiated Caco-2 cells (Gerloff *et al.*, 2013; Z.-M. Song *et al.*, 2015). Contrary to differentiated Caco-2 cells, undifferentiated one lack certain biochemical and morphological characteristics of human enterocytes. They do not develop tight junctions and high transepithelial resistance, consequently they cannot be used for translocation studies (Sambuy *et al.*, 2005). Their sensitivity towards E171 food additive and two references of TiO<sub>2</sub>-NPs (P25, anatase/rutile, 25 nm and A12, anatase, 12 nm) was evaluated in this study, by assessing their viability and ROS intracellular level after acute exposure (6 h and 48 h) to these particles. In addition, we used RT-qPCR to assess their impact on the mRNA expression of some enzymes involved in redox homeostasis and the unfolded protein response (UPR), which is a marker of endoplasmic reticulum stress.

## Material and Methods

### Chemicals and reagents

Unless otherwise indicated, chemicals were all purchased from Sigma-Aldrich and were >99 % pure. Cell culture media and serum were purchased from Thermo Fisher Scientific.

### Particle dispersion and characterization

E171 food additive powder was purchased from a commercial website and characterized. Their specific surface area was measured by the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method, their crystalline phase by X-ray diffraction. The mean diameter of particles and the percentage of NPs were measured on transmission electron microscopy (TEM) images, as described in our previous work (Simon-Deckers *et al.*, 2008). The two references of TiO<sub>2</sub>-NPs used here were encoded A12,

which was synthesized in our laboratories (Pignon *et al.*, 2008) and has already been used in our previous studies (Brun *et al.*, 2014; Dorier *et al.*, 2015), and P25, referenced as NM105 in the nanomaterial library at the European Joint Research Center (JRC, Ispra, Italy). Again, their specific surface, their crystalline phase and their diameter were measured (table 1).

Particle suspensions were prepared to the final concentration of 10 mg/mL in ultrapure sterilized water and dispersed by indirect cup-type sonicator (Cup Horn) as a high intensity ultrasonic water bath that provide sterile conditions (Bioblock Scientific, Vibracell 75041, Huber minichiller, 100-500  $\mu$ L; continuous sonication for 30 min; at 80 % amplitude; 4°C). The power of our sonicator was measured using the calorimetric procedure (Taurozzi *et al.*, 2010). Amplitude of 80 % corresponds to 52.8 W. After dispersion, their zeta potential was measured and their agglomeration state was followed by dynamic light scattering (DLS) using a NanoZS, (Malvern Instrument).

## Cell culture and exposure

### Cell culture

Caco-2 cells (ATCC HTB-37, passages from 49 to 60) and HT29-MTX mucus-secreting cells (kindly provided by T. Lesuffleur, INSERM U843, Paris, France) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX™ supplemented with 10 % heat inactivated fetal bovine serum, 1 % non-essential amino acids, 50 units/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. They were maintained at 37°C under 5 % CO<sub>2</sub>. For all experiments cells were seeded at a density of 24 000 cells/cm<sup>2</sup> in appropriate support, i.e. 60 cm<sup>2</sup> petri dishes or multi-wells plates. Cells were grown either as a monoculture of Caco-2, or as a co-culture composed of 70 % Caco-2 and 30 % HT29-MTX cells.

### Cell exposure to particles

Cells were exposed five days after seeding, for 6 h, 24 h and 48 h (figure S1), to particles at 20-100  $\mu$ g/mL for cell viability assay, at 10, 50 and 100  $\mu$ g/mL in H<sub>2</sub>-DCF-DA assay and at 50  $\mu$ g/mL for RT-qPCR, in cell culture medium containing 10% FBS.

## Toxicity assays

### Cell viability

Cytotoxicity after acute exposure to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs was assessed by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay which measures cell metabolic activity. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells reduce MTT to water-insoluble blue formazan crystals. Cells were grown in 96-wells plates before being exposed to 0-200 µg/mL of particles for 6 h and 48 h. Then, exposure medium was replaced by 100 µL of 0.5 mg/mL MTT solution prepared in culture medium. After 2 h at 37°C, medium was replaced by 100 µL of DMSO and mixed to dissolve formazan crystals. To free from particle interferences with the assay, plates were centrifuged for 5 min at 500 rpm to allow particles sedimentation and 50 µL of supernatants were then transferred into a clean plate for absorbance measurements at 550 nm with a spectrophotometer (Molecular Devices, SpectraMax M2). Metabolic activity of viable cells was expressed as mean percentage normalized to the untreated control. NP potential interferences were tested as previously described (Brun *et al.*, 2014).

### Reactive Oxygen Species (ROS) measurement

Intracellular ROS formation was assessed using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (H<sub>2</sub>-DCF-DA) (Invitrogen). After exposure to particles, cells were washed twice with PBS, incubated for 30 min at 37°C with 80 µM H<sub>2</sub>-DCF-DA and harvested by scraping. The resulting fluorescence intensity of DCF after esterase cleavage and ROS oxidation was measured with excitation at 480 nm and emission at 530 nm (Molecular Devices, SpectraMax M2) and normalized to the protein concentration. For H<sub>2</sub>-DCF-DA assay, potential TiO<sub>2</sub> particle interferences were tested, fluorescence was measured, either in exposed-cells without H<sub>2</sub>-DCF-DA or in particles suspensions at 10-50-100 µg/mL with H<sub>2</sub>-DCF-DA (table S1).

### Gene expression

Gene expression in cells exposed to particles was assessed by real-time-quantitative PCR. After exposure to particles, cells were harvested in lysis buffer (from RNA extraction Kit) and frozen to -80°C. RNA was extracted using GenElute™ mammalian total RNA Miniprep kit. Total RNA concentration and

purity were determined by measuring absorbance at 260 nm, abs 260/ abs 280 and abs 260/ abs 230 nm ratios. 2 µg of total RNA was reverse transcribed to cDNA with 100 ng/µL random primers, 10 mM dNTP and the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Total single strand cDNA concentration and purity were determined by measuring absorbance at 260 nm, abs 260/ abs 280 and abs 260/ abs 230 nm ratios. MESA Blue qPCR Mastermix for SYBR Assay (Eurogentec) with ROX reference was used to perform the quantitative PCR in a CFX96 Real time system, C1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad). The primer sequences are described in table S2; their efficiency was determined before these assays and was always between 1.8 and 2.2. Relative expression values were calculated as  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .  $\Delta Cq$  is the difference between the cycle threshold (Cq) values for target and reference genes for each condition. Then,  $\Delta\Delta Cq$  is the difference between the  $\Delta Cq$  of one condition and of the control condition. *CYCLOA* and *GAPDH* were used as references genes for normalization. Their variability of expression was assessed by Bestkeeper, an Excel-based pairwise mRNA correlation tool (Pfaffl *et al.*, 2004). Gene expression was obtained using the Relative Expression Software Tool (REST2009) based on Cq comparison (Pfaffl *et al.*, 2002). Data are expressed as percentages of the corresponding control.

#### Statistical analysis

Statistica 8.0 software (Statsoft, Chicago, USA) was used to perform statistical analyses. Unless indicated otherwise, statistical significance was assessed with both non-parametric one-way analysis of variance on ranks approach (Kruskal-Wallis) and paired comparison Mann-Whitney u-test. Results were considered statistically significant with p-value < 0.05.

## Results

### TiO<sub>2</sub> particles physico-chemical characterization

The physico-chemical characteristics of the E171 used in this study, as well as the ones of the two TiO<sub>2</sub>-NPs, A12 and P25, are given in table 1.

E171 was >95 % anatase, with a mean grain size of 119±65 nm and a SSA of 9.4 m<sup>2</sup>/g. It was thus not a nanomaterial as defined by the EU, but 47 % of the particles were inferior to 100 nm, in diameter, which is among the highest value range of the literature (Chen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014; Weir *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). After high energy sonication with a Cup Horn, its hydrodynamic diameter was 415.4±69.5 nm (PdI: 0.48±0.071) in water. Upon dilution in exposure medium it increased to 739.3±355.3 nm (PdI: 0.64±0.221), showing its agglomeration.

	diam. TEM (nm)	SSA (m <sup>2</sup> /g)	crystal. struct.	H. diam. water (nm)	PdI water	H. diam. medium (nm)	PdI medium	ζ medium (mV)
E171	118±53	9.4	>95% anat.	415.4±69.5	0.48±0.071	739.3±355.3	0.64±0.221	-19±0.7
A12	12±3	82	>95% anat.	85±2.9	0.17±0.021	447.9±0.3	0.25±0.015	-10.8±0.6
P25	24±6	46	86% anat.	157.6±1.0	0.16±0.012	439.9±6.7	0.18±0.014	-11.2±0.8

Table 1. Particle characterization. The primary diameter (diam.) was measured on TEM images. The specific surface area (SSA) was measured via the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method. Crystalline structure (cryst. struct.) was identified by X-ray diffraction. The hydrodynamic diameters (H. diam.) are the mean ± standard deviation of the Z-average values given by a Malvern Nanosizer; PdI are the polydispersity indexes. H. diam. measurements were carried out either in ultrapure water (water) or in cell culture medium (medium). The zeta potential (ζ) was measured on particle dispersions prepared in cell culture medium just before cell exposure.

A12 TiO<sub>2</sub>-NPs were synthesized in our laboratories by laser pyrolysis (Pignon *et al.*, 2008). They were purely anatase with a diameter of 12±3 nm, and a SSA of 82 m<sup>2</sup>/g. P25 TiO<sub>2</sub>-NPs were supplied by the JRC and were mixed anatase/rutile (86%/14%) TiO<sub>2</sub>-NPs with a diameter of 24±6 nm and a SSA of 46±1 m<sup>2</sup>/g. After dispersion A12 hydrodynamic diameter, measured by DLS, was 85±2.9 nm in water and 447.9±0.3 nm in cell culture medium. For P25, hydrodynamic diameter was 157.6±1.0 nm in water and 439.9±6.7 nm in cell culture medium.

#### Impact on cell viability

E171 and P25 TiO<sub>2</sub>-NPs were applied to the two cell models using the exposure regimens described in figure S1. No overt mortality was observed in Caco-2 monoculture and Caco-2/HT29-MTX coculture exposed for 6 h and 48 h to P25 TiO<sub>2</sub>-NPs (figure 1A-B) and E171 (figure 1C-D), even at the highest dose, i.e., 200 µg/mL. Impact of A12 TiO<sub>2</sub>-NPs on cell viability, already assessed in a previous study, also demonstrated no overt mortality (Dorier *et al.*, 2015).

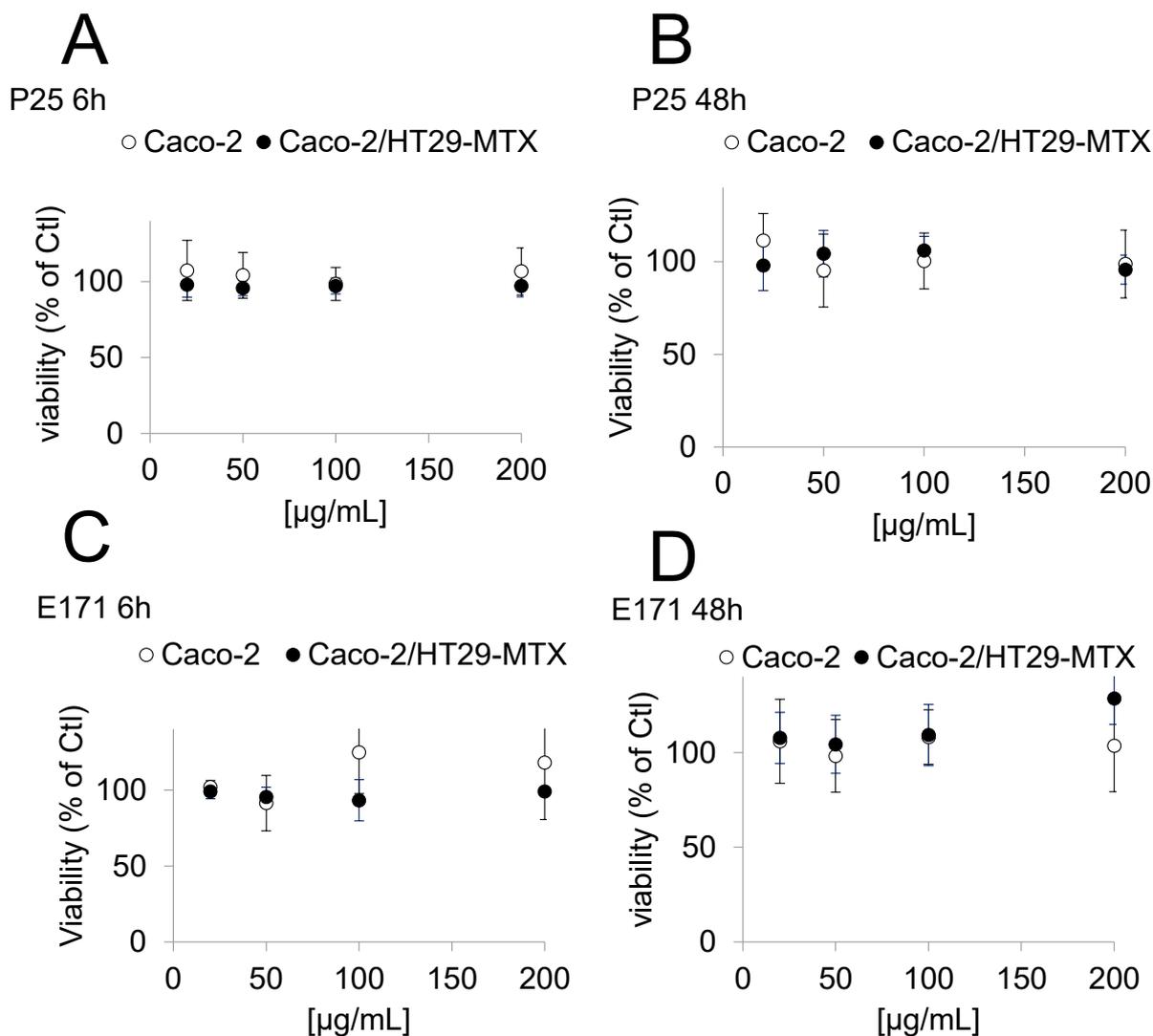


Figure 1. Impact on cell viability. Cell viability was probed with the MTT assay in Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells after 6h (A, C) and 48h (B, D) exposure to P25-NPs (A, B) and E171 food additive (C, D) at 20, 50, 100 and 200 µg/mL. Results are expressed as percentage (%) of the value obtained in control cells (unexposed cells), presented as average  $\pm$  standard deviation, n=3.

### Oxidative stress

Induction of oxidative stress in cells is a well described impact of TiO<sub>2</sub> particles. Thus, we first to monitor the intracellular ROS content in cells exposed to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs, using the H<sub>2</sub>-DCF-DA assay.

A significant increase of ROS levels was measured in both cell models when acutely exposed to 10, 50 and 100 µg/mL E171 (figure 2A-B). In the Caco-2 monoculture, this increase was concentration-dependent, with  $1.3 \pm 0.1$ ;  $2.6 \pm 0.1$  and  $3.5 \pm 0.1$  at 6

h;  $1.3 \pm 0.1$ ;  $1.8 \pm 0.2$  and  $2.2 \pm 0.1$  at 24 h;  $1.4 \pm 0.1$  and  $1.6 \pm 0.2$  at 48 h, fold-increase of ROS content in cells exposed to 10, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  E171, respectively, as compared to control cells (figure 2A). Noteworthy, in this model, fold-increase of ROS content was higher after 6 h, then 24 h and 48 h of exposure time, which was not the case in the coculture Caco-2/HT29-MTX. Nevertheless, in the coculture model, the increase was also concentration-dependent, with  $1.4 \pm 0.1$ ;  $1.9 \pm 0.1$  and  $2.3 \pm 0.1$  at 6 h;  $1.2 \pm 0.1$ ;  $1.6 \pm 0.1$  and  $1.8 \pm 0.1$  at 24 h;  $1.8 \pm 0.2$  and  $2.2 \pm 0.3$  at 48 h fold-increase of ROS content in cells exposed to 10, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  E171, respectively, as compared to control cells (figure 2B)

In both cell models, increase of ROS content was also observed after exposure to 50  $\mu\text{g/mL}$  A12  $\text{TiO}_2$ -NPs for all exposure times with  $1.4 \pm 0.1$  (6h);  $1.4 \pm 0.2$  (24h) and  $1.3 \pm 0.1$  (48h) fold-increase ROS content in Caco-2 monoculture and with  $1.3 \pm 0.1$  (6h);  $1.4 \pm 0.1$  (24h) and  $1.4 \pm 0.1$  (48h) fold-increase of ROS content in the Caco-2/HT29-MTX coculture (figure 2A-B). Lastly, exposure to 50  $\mu\text{g/mL}$  P25  $\text{TiO}_2$ -NPs also increased ROS content with  $1.6 \pm 0.1$  (6h);  $1.7 \pm 0.2$  (24h) and  $1.5 \pm 0.1$  (48h) fold-increase in Caco-2 monoculture and  $1.4 \pm 0.1$  (6h);  $1.6 \pm 0.1$  (24h) and  $1.7 \pm 0.2$  (48h) in Caco-2/HT29-MTX coculture (figure 2A-B). The possible interaction of  $\text{TiO}_2$  particles with  $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$  was tested, no interference was detected (table S2).

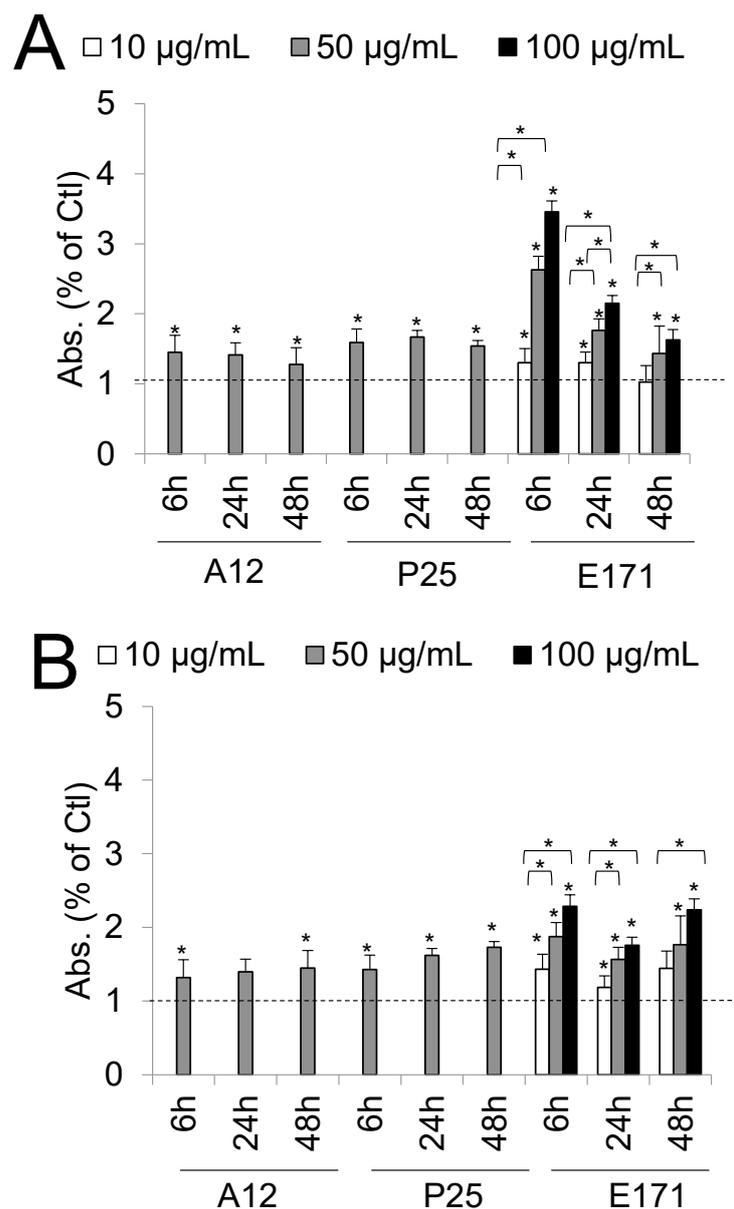


Figure 2. Intracellular ROS content. ROS accumulation was measured using H<sub>2</sub>-DCF-DA, in Caco-2 cells (A) and Caco-2/HT29-MTX coculture (B). These cells were exposed to 50 µg/mL of A12-NPs or P25-NPs, or 10, 50 and 100 µg/mL of E171; for 6 h, 24 h or 48 h. Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and presented as average ± standard deviation, \*p<0.05 exposed vs control, n=4.

Secondly, the expression of genes encoding proteins implicated in ROS regulation; i.e. catalase (*CAT*), glutathione reductase (*GSR*), superoxide dismutase 1 and 2 (*SOD1*, *SOD2*) was measured by RT-qPCR in cells exposed to 50 µg/mL E171 or 50 µg/mL TiO<sub>2</sub>-NPs, acutely for 6 h or 48 h. The complete set of results is given in table 2.

No gene expression modulation was observed in both cell models exposed to E171, except increased expression of catalase (*CAT*) in Caco-2 exposed to E171 for 48 h, with  $1.44\pm 0.15$  fold-increase. In the Caco-2 monoculture, decreased expression of *CAT*, *GSR*, *SOD1* and *SOD2* mRNA levels was observed after exposure to 50  $\mu\text{g/mL}$  P25 for 6 h, with  $0.70\pm 0.07$ ;  $0.61\pm 0.11$ ;  $0.52\pm 0.06$  and  $0.47\pm 0.09$  fold-increase respectively. They were back to initial levels after exposure to 50  $\mu\text{g/mL}$  P25 for 48 h. Conversely, in the Caco-2/HT29-MTX coculture, no gene expression modulation was observed after exposure to P25  $\text{TiO}_2$ -NPs. The same was observed in both cell models with A12  $\text{TiO}_2$ -NPs, except a decrease for *CAT* and *GSR* in Caco-2/HT29-MTX exposed to 50  $\mu\text{g/mL}$  A12 for 6 h and 48 h respectively.

Lastly, mRNA expression level of *NRF2*, a transcription factor implicated in oxidative stress regulation was investigated, but no significant change was observed following exposure to E171 and  $\text{TiO}_2$ -NPs particles in both cell models (table 2).

	Caco-2		Caco-2/HT29-MTX	
	6h-50µg/mL	48h-50µg/mL	6h-50µg/mL	48h-50µg/mL
<b>A12</b>				
CAT	0.82±0.20	1.39±0.38	0.71±0.14*	0.88±0.11
GSR	0.84±0.14	0.89±0.08	1.07±0.25	0.86±0.06*
SOD1	0.84±0.22	0.91±0.10	1.02±0.19	0.80±0.08
SOD2	0.82±0.18	1.00±0.40	1.35±0.98	1.09±0.44
NRF2	0.77±0.14	1.06±0.17	0.85±0.18	0.84±0.14
<b>P25</b>				
CAT	0.70±0.07*	1.06±0.21	0.83±0.12	0.97±0.14
GSR	0.61±0.11*	0.84±0.18	1.04±0.35	1.11±0.17
SOD1	0.52±0.06*	0.94±0.18	1.09±0.28	0.89±0.03
SOD2	0.47±0.09*	1.40±0.55	1.39±0.68	0.90±0.37
NRF2	0.81±0.14	0.83±0.32	0.82±0.19	1.00±0.17
<b>E171</b>				
CAT	0.72±0.06	1.44±0.15*	0.72±0.20	1.45±0.43
GSR	0.88±0.16	0.70±0.23	0.71±0.32	0.96±0.17
SOD1	0.76±0.10	1.00±0.11	0.87±0.20	0.90±0.26
SOD2	0.69±0.14	0.93±0.44	1.91±0.97	1.21±0.83
NRF2	0.84±0.15	1.19±0.18	0.93±0.17	1.26±0.23

Table 2. RT-qPCR analysis of the mRNA expression of redox enzymes. Impact on gene expression of selected oxidative stress regulator genes obtained by RT-qPCR from undifferentiated cells exposed for 6 h, 48 h to 50 µg/mL. Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and expressed as average ± standard deviation. \*p<0.05 (in red), exposed vs control, n=3, except for A12 and P25 48h-50 µg/mL Caco-2/HT29-MTX where n=2.

## Endoplasmic reticulum stress

Some studies reported NP induced toxicity through ER stress signaling pathway (Christen *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2012). Oxidative stress has been shown to cause ER stress, which is thought, in the intestine, to be fundamental in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (Garg *et al.*, 2012; Zhang and Kaufman, 2008). Loss of ER homeostasis in the cell activates the unfolded protein response (UPR), a cascade of signal transduction and transcriptional events that restore correct protein folding and ER homeostasis (McGuckin *et al.*, 2010). Three ER-localized protein sensors: IRE-1, PERK (transmembrane proteins) and ATF6 (transcription factor) initiate this response. Then, GRP78/BiP, which is a chaperone protein, plays a critical role in controlling protein quality and activation of the signaling molecules in the ER. ATF6 and active XBP1 transcription factors mediate UPR mechanism of action. Another transcriptional factor, CHOP, mediates ER-stress-induced apoptosis (Chaudhari *et al.*, 2014; Zhang and Kaufman, 2008).

As a hallmark of ER stress in cells, we evaluated the mRNA expression of these markers in the two cell models exposed to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs. The complete set of results is given in table 3.

Acute exposure to E171 up-regulated *CHOP* (fold-increase 1.75±0.29) and *GRP78* (fold-increase 1.49±0.13) in Caco-2 monoculture after exposure for 6 h and 48 h, respectively. Conversely, it down-regulated *sXBP1* (fold-decrease 0.79±0.12) and *IRE-1* (fold-decrease 1.49±0.13) after exposure for 6 h. No gene expression modulation was observed in the Caco-2/HT29-MTX coculture after exposure to E171. Exposure to A12 TiO<sub>2</sub>-NPs decreased the expression of *CHOP* (fold-decrease 0.39±0.21) and *GRP78* (fold decrease 0.86±0.10) in Caco-2/HT29-MTX after exposure for 6 h and 48 h respectively. Lastly, exposure to P25 TiO<sub>2</sub>-NPs decreased *ATF6* (fold decrease 0.60±0.16), *GRP78* (fold decrease 0.71±0.09) and *sXBP1* (fold-decrease 0.74±0.09) in Caco-2 exposed for 6 h and increased *GRP78* (fold-increase 1.23±0.04) and *sXBP1* (fold-increase 1.09±0.05) in Caco-2/HT29-MTX after exposure for 48 h (table 3).

	Caco-2		Caco-2/HT29-MTX	
	6h-50µg/mL	48h-50µg/mL	6h-50µg/mL	48h-50µg/mL
<b>A12</b>				
CHOP	0.94±0.33	1.10±0.69	<b>0.39±0.21*</b>	1.01±0.40
ATF6	0.75±0.18	0.90±0.29	1.00±0.36	0.88±0.07
GRP78	0.50±0.36	1.15±0.24	1.91±3.63	<b>0.86±0.10*</b>
IRE-1	0.83±0.22	0.91±0.25	0.88±0.44	0.96±0.11
sXBP1	0.89±0.13	0.82±0.27	0.90±0.24	0.75±0.03
<b>P25</b>				
CHOP	3.90±1.61	0.96±0.56	0.87±1.03	1.01±0.39
ATF6	<b>0.60±0.16*</b>	1.04±0.38	0.98±0.41	0.94±0.08
GRP78	<b>0.71±0.09*</b>	1.17±0.34	0.96±0.25	<b>1.23±0.04*</b>
IRE-1	0.95±0.21	0.94±0.27	1.17±0.43	1.07±0.07
sXBP1	<b>0.74±0.09*</b>	0.97±0.18	0.93±0.25	<b>1.09±0.05*</b>
<b>E171</b>				
CHOP	<b>1.75±0.29*</b>	2.17±1.11	1.61±2.50	3.29±4.50
ATF6	0.76±0.20	0.94±0.32	1.02±0.39	1.74±1.06
GRP78	0.80±0.10	<b>1.49±0.13*</b>	1.10±0.33	1.27±0.20
IRE-1	<b>0.79±0.12*</b>	0.77±0.22	1.39±0.50	1.66±0.91
sXBP1	<b>0.77±0.10*</b>	1.06±0.15	1.18±0.33	1.50±0.45

Table 3. RT-qPCR analysis of the mRNA expression of endoplasmic reticulum stress markers. Impact on gene expression of selected ER stress regulator genes obtained by RT-qPCR from cells exposed for 6 h, 48 h to 50 µg/mL. Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells) and expressed as average ± standard deviation. \*p<0.05 (in red), exposed vs control, n=3. Except for A12 and P25 48h-50 µg/mL Caco-2/HT29-MTX where n=2.

## Discussion

The objective of the present study was to evaluate the toxicity of E171 food additive by comparison with two TiO<sub>2</sub>-NPs (A12 and P25) in human intestinal cell models, Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX. To this purpose cell viability, intracellular ROS content and gene expression of redox enzyme and ER stress markers were analyzed. In all experiments, cells were undifferentiated, thus with a proliferating phenotype. They were exposed to TiO<sub>2</sub> particles at 10, 50 and 100 µg/mL which are high concentrations, that can be considered as a worst case scenario as compared to the estimated human daily intake (Chen *et al.*, 2013; Fröhlich and Roblegg, 2012; Powell *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012). Our results are in accordance with the published literature which shows that TiO<sub>2</sub> is globally not highly toxic, even at high concentration (McCracken *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011).

We show that acute exposure of undifferentiated cells does not induce any loss of cell viability, both in the Caco-2 monoculture and the Caco-2/HT29-MTX coculture model when exposed to E171 food additive, purely anatase and P25 TiO<sub>2</sub>-NPs, mixed anatase/rutile. Our results are in accordance with a previous study by (Z.-M. Song *et al.*, 2015) which showed that two food-grade TiO<sub>2</sub> particles, purely anatase (>99%), purchased from internet were not toxic to undifferentiated cells, with limited membrane damage and no change in cell proliferation. In a previous study, pure anatase TiO<sub>2</sub>-NPs, i.e., A12 or pure rutile TiO<sub>2</sub>-NPs, i.e. R20, were already proven relatively safe in undifferentiated Caco-2 cells because they did not cause cytotoxicity or genotoxicity, measured by MTT assay and comet-Fpg assay respectively (Dorier *et al.*, 2015). Conversely, in Caco-2 cells, mixed anatase/rutile TiO<sub>2</sub>-NPs, i.e. P25, were proven to induce cell mortality and DNA damage measured by LDH release, WST-1 assay and the comet-Fpg assay (Gerloff *et al.*, 2012, 2009). A hypothesis to explain discrepancies between this last study and our results obtained with P25-NPs is the surface coating of TiO<sub>2</sub>-NPs. Indeed, in their study, cells were exposed to particles prepared in serum-free medium whereas our cells were exposed to particles in serum-containing medium. According to the literature, the different protein coronas that form on NPs determine particle biological signature, which influences its accumulation in cells and its impact on

biological membranes (Lesniak *et al.*, 2012; Monopoli *et al.*, 2012; Mortensen *et al.*, 2013). This protein corona is thought to decrease TiO<sub>2</sub>-NPs toxicological impact in cells (Gerloff *et al.*, 2013; Lesniak *et al.*, 2012) but it is not always the case like observed by (Z.-M. Song *et al.*, 2015), which noticed changes in cell viability and cell proliferation when particles are pretreated either with BSA or digestive fluids. Not surprisingly, we observe increased ROS levels in both cell models after acute exposure to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs. This is a classical effect observed after exposure to nanomaterials, especially TiO<sub>2</sub>-NPs (Shi *et al.*, 2013). These results are in accordance with the study by (Z.-M. Song *et al.*, 2015) which monitored dose-dependent increase of ROS after acute exposure for 24h to 50 and 200 µg/mL of pure anatase particles, with similar fold-change, i.e. between 1.3 -2, at 50 µg/mL. Interestingly, in Caco-2 cells we also observe a decrease of this ROS level when exposure time increases (6 h, 24 h, 48 h), which may reflect the capacity of cells to scavenge these ROS. Here, we observe unchanged mRNA levels of redox enzymes after exposure to E171 in both cell models, as for *NRF2* mRNA expression. Consequently the cells would scavenge these ROS thanks to already existing enzymes or antioxidant molecules such as glutathione. Conversely, in Caco-2 cells exposed to P25 TiO<sub>2</sub>-NPs, ROS increase occurred concomitantly with down-regulation of catalase (CAT), superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1, 2) and glutathione reductase (GSR) genes. P25 might thus indirectly oxidize DNA through down-regulation of antioxidant systems, especially the superoxide dismutase, leading to accumulation of superoxide in cells, like already discussed elsewhere (Magdolenova *et al.*, 2013; Petersen *et al.*, 2014).

If ROS accumulate in cells and are not appropriately scavenged by dedicated enzymes, they may impair biological molecules, i.e., proteins, lipids, DNA (Fernández-Blanco *et al.*, 2014; Matés, 2000; Wijeratne *et al.*, 2005) and obstruct protein folding, causing unfolded protein accumulation inside the ER, resulting in ER stress (Deuring *et al.*, 2011). In this case, the cascade of signal transduction and transcriptional events that restore ER homeostasis and correct protein folding, namely the UPR pathway, is activated (McGuckin *et al.*, 2010).

The increase of *GRP78* and *CHOP* expression in Caco-2 cells after exposure to E171, as well as the increase of *GRP78* and *sXBP1* expression in the Caco-2/HT29-MTX coculture after exposure to P25 may reflect particle-induced activation of the UPR. However, E171 and TiO<sub>2</sub>-NPS also down-regulate some ER-stress markers. This decreased and increased expression may suggest that the ER stress peak occurred earlier and that we observe here ER stress resolution. Dysfunctional ER homeostasis, associated with dysfunctional autophagy in intestinal cells is involved in intestinal inflammatory response (Hosomi *et al.*, 2015). *In vivo*, mice with impaired expression of XBP1 or IRE1 spontaneously develop IBD, or increased susceptibility to intestinal inflammation (Bertolotti *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007). In summary exposure of undifferentiated intestinal cells to high doses of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs would modulate the UPR response, potentially leading to increased susceptibility to intestinal inflammation.

The observations of different impact caused by E171 and both TiO<sub>2</sub>-NPs may be explained by particle primary diameter, agglomeration state, sedimentation state and particle proteins-coronas, resulting in different accumulation in cells.

## Conclusion

We show here that E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs do not cause overt cell mortality in undifferentiated intestinal cell models, Caco-2 enterocytes and Caco-2/HT29-MTX coculture, composed of enterocytes and mucus-secreting cells. Nevertheless, it increases ROS accumulation in both cell models and perturbs redox and endoplasmic reticulum homeostasis. Our data suggest that E171 is not a massive toxicant. However, if particles accumulate in cells, they may induce other toxicological impact, not tested here, on biomolecules such as DNA, lipids and proteins, they may thus impact other cellular processes. These results would necessitate *in vitro* and *in vivo* validation since acute exposure with high doses reflect a worst case scenario, different from low daily chronic exposure to food-grade TiO<sub>2</sub> additive.

## Acknowledgments

This work was supported by Atomic Energy and Alternative Energies Commission through the ‘Toxicology’ research program and by ADEME. 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 thank T. Lesuffleur (INSERM U938, Paris, France) for generous gift of HT29-MTX cells and F. Barreau and E. Houdeau for helpful discussion.

## Supplementary data

	Caco-2				Caco-2/HT29-MTX			
	acute	Acute	chronic	chronic	acute	acute	chronic	chronic
		+ H <sub>2</sub> -DCF-DA		+ H <sub>2</sub> -DCF-DA		+ H <sub>2</sub> -DCF-DA		+ H <sub>2</sub> -DCF-DA
Control	11.9±2.9	9185.6±915.8	15.4±0.3	3739.2±370.0	17.2±0.3	11643.2±937.7	15.7±0.0	3056.8±145.5
A12 50 µg/mL	9.4±1.1	11758.7±902.1	11.0±1.7	3743.1±195.3	14.6±0.3	11992.4±1213.5	16.5±3.0	3768.0±347.5
P25 50 µg/mL	9.2±0.6	13785.2±131.9	10.5±2.3	5000.0±683.0	14.6±0.9	16646.6±607.0	15.4±0.7	4177.8±613.3
E171 10 µg/mL	10.0±2.1	11662.4±763.2	12.2±0.1	3879.0±194.5	17.1±1.3	14673.4±1454.1	15.7±2.5	3686.1±129.0
E171 50 µg/mL	8.4±1.6	15081.0±1775.0	13.2±0.3	4063.7±102.5	16.5±0.5	14940.1±1697.9	14.7±0.1	4003.4±332.8
E171 100 µg/L	7.9±0.8	14664.9±1770.3	11.2±1.6	4438.9±496.8	14.1±2.3	18843.0±2751.2	14.6±0.5	4208.8±405.5
<hr/> <b>PBS + H<sub>2</sub>-DCF-DA</b> <hr/>								
Control	2.6±0.1							
A12 50 µg/mL	3.3±0.0							
P25 50 µg/mL	3.4±0.2							
E171 10 µg/mL	2.7±0.2							
E171 50 µg/mL	3.2±0.3							
E171 100 µg/L	4.1±0.1							

Table S1. Interference of TiO<sub>2</sub> particles with the H<sub>2</sub>-DCF-DA assay. Fluorescence was measured with excitation at 480 nm and emission at 530 nm either A) in exposed-cells without H<sub>2</sub>-DCF-DA compared to exposed-cells with H<sub>2</sub>-DCF-DA or B) in particles suspensions with PBS and H<sub>2</sub>-DCF-DA.

Forward primer	Reverse primer
<b>Oxidative stress</b>	
<b>CAT</b> 5'-AGC-TTA-GCG-TTC-ATC-CGT-GT-3'	5'-TCC-AAT-CATC-CGT-CAA-AAC-A-3'
<b>GSR</b> 5'-GAT-CCC-AAG-CCC-ACA-ATA-GA-3'	5'-CTT-AGA-ACC-CAG-GGC-TGA-CA-3'
<b>SOD1</b> 5'-AGG-GCA-TCA-TCA-ATT-TCG-AG-3'	5'-ACA-TTG-CCC-AAG-TCT-CCA-AC-3'
<b>SOD2</b> 5'-TCC-ACT-GCA-AGG-AAC-AAC-AG-3'	5'-TCT-TGC-TGG-GAT-CAT-TAG-GG-3'
<b>NRF2</b> 5'-CAG-TCA-GCG-ACG-GAA-AGA-GT-3'	5'-ACC-TGG-GAG-TAG-TTG-GCA-GA-3'
<b>Endoplasmic reticulum stress</b>	
<b>GRP78</b> 5'-GGT-GAA-AGA-CCC-CTG-ACA-AA-3'	5'-GTC-AGG-CGA-TTC-TGG-TCA-TT-3'
<b>CHOP</b> 5'-TGG-AAG-CCT-GGT-ATG-AGG-AC-3'	5'-TGT-GAC-CTC-TGC-TGG-TTC-TG-3'
<b>IRE1</b> 5'-AGA-GAG-GCG-GGA-GAG-CCG-TG-3'	5'-CGA-GGA-GGT-GGG-GGA-AGC-GA-3'
<b>sXBP1</b> 5'-GCA-GGT-GCA-GGC-CCA-GTT-GT-3'	5'-TGG-GTC-CAA-GTT-GTC-CAG-AAT-GC-3'
<b>ATF-6</b> 5'-CCA-GCA-GCA-CCC-AAG-ACT-CAA-ACA-3'	5'-GTG-TGA-CTC-CCC-CAG-CAA-CAG-C-3'

Table S2. Primers used in RT-qPCR experiments.

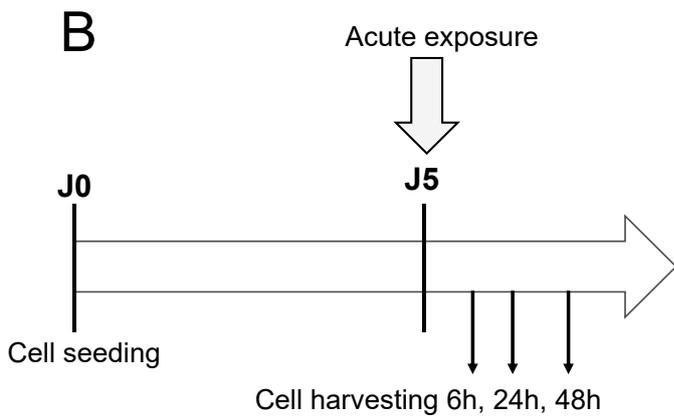
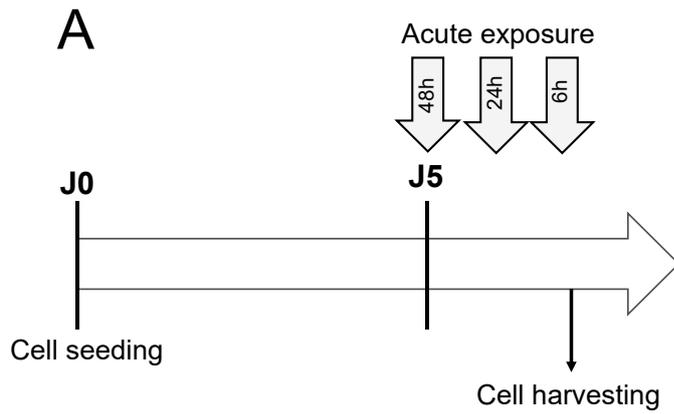


Figure S1. Schematic representation of cell exposure protocol. (A, B) Acute exposure: 21 days after seeding, differentiated cells were exposed to particles for 6 h or 48 h. Cells were either exposed at different time and harvested at the same time (A), or exposed once and harvested at different times (B).

### 3. Conclusion

D'après la littérature, les cellules Caco-2 non différenciées sont généralement plus sensibles aux xénobiotiques et aux NPs, notamment car l'accumulation des particules dans les cellules est plus importante (Gerloff *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015). Avec cette étude sur les cellules Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX non différenciées, nous voulions vérifier si effectivement elles étaient plus sensibles que les épithélia différenciés à l'exposition au colorant E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub>, une hypothèse émise pour expliquer l'impact plus important obtenu après l'exposition chronique aux particules. Cependant, d'après les premiers résultats obtenus sur la viabilité des cellules, l'accumulation des ROS intracellulaires et l'expression des enzymes du stress oxydant et du stress du RE, ces dernières sont aussi sensibles que les épithélia différenciés. En effet, nous n'observons pas de baisse de la viabilité cellulaire après exposition au E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub>, même pour les plus fortes concentrations en particules et après 48 h d'exposition. Cependant, nous observons une accumulation des ROS intracellulaires dès 6 h ainsi qu'à 24 h et 48 h d'exposition, ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes codant des enzymes responsables de l'équilibre redox de la cellule lorsqu'elles sont exposées à P25. D'autre part, l'exposition au E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub> induit à la fois une up et down-régulation d'acteurs de la voie URP, impliquée dans l'homéostasie du RE.

Les résultats de cette seconde étude confirment que le colorant E171 n'induit que des effets toxiques modérés sur les cellules intestinales. Cependant, si la cellule n'est pas en mesure de réguler ce stress, celui-ci pourrait impacter d'autres processus cellulaires.

## *Conclusion sur la toxicité du E171*

Ces deux premières études ont montré que les particules contenues dans le colorant alimentaire étaient modérément toxiques, leurs effets sur les modèles intestinaux utilisés ici, i.e. Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX, sont parfois similaires à ceux des NPs de TiO<sub>2</sub> A12 ou P25, mais pas systématiquement. La fraction nanométrique des particules du colorant E171 ne semble pas expliquer tous les effets qui sont observés. Dans les études s'intéressant à l'impact du colorant alimentaire sur l'épithélium intestinal, en parallèle de NPs de TiO<sub>2</sub>, il est donc primordial d'utiliser le colorant E171, réellement présent dans les produits alimentaires.

Le colorant alimentaire est peu toxique sur les modèles d'entérocytes seuls ou d'entérocytes associés à des cellules sécrétant du mucus. En effet, il n'induit pas de mortalité cellulaire, que ce soit sur les cellules non différenciées (partie II) ou sur les cellules différenciées (partie I), après des expositions aiguës ou chroniques aux particules, même pour les plus fortes doses. Ce résultat est aussi observé avec les NPs de TiO<sub>2</sub>. Cependant, le colorant E171 n'est pas non plus inoffensif car il induit l'accumulation de ROS intracellulaires et la modulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du stress oxydant et du stress du RE. Ces réponses cellulaires peuvent avoir un impact sur la fonction de barrière de l'intestin, en particulier la sécrétion de mucus, l'activité de transporteurs ; ils peuvent également être à l'origine d'une inflammation intestinale. En effet, des effets de NPs de TiO<sub>2</sub> ont déjà été rapportés sur différents paramètres de cette barrière.

Cette problématique est abordée plus longuement dans le chapitre 5, dans laquelle nous exposons les résultats obtenus dans les études d'impact du colorant E171 et des NPs de TiO<sub>2</sub> sur la fonction de barrière de l'intestin.

# IMPACT SUR LA FONCTION DE BARRIERE INTESTINALE

---

D'après les résultats rapportés dans la littérature et dans le chapitre 4, les particules de  $\text{TiO}_2$  sont peu toxiques mais les effets qu'elles engendrent sont susceptibles d'impacter la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. Les résultats concernant l'impact des particules sur la fonction de barrière et en particulier sur la sécrétion de mucus, l'expression de pompes d'efflux des xénobiotiques et l'inflammation sont présentés dans ce chapitre. Dans la première partie, sont présentés des résultats antérieurs décrivant l'impact de NPs de  $\text{TiO}_2$  sur l'expression des pompes d'efflux de xénobiotiques (transporteurs ABC) et sur les transporteurs de nutriments (SLC) dans le modèle cellulaire Caco-2. Ces résultats ont donné lieu à un article ; ma contribution a consisté à mesurer l'effet des NPs sur les pompes d'efflux des xénobiotiques. Dans le cadre de mon sujet de thèse à proprement parler, nous avons cette fois évalué l'impact du colorant E171 et deux NPs de  $\text{TiO}_2$  sur différents éléments de la barrière intestinale d'épithélia différenciés, exposés de façon aiguë ou chronique. Ces résultats sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre sous forme d'un article scientifique.

# *Partie I : Effets de deux NP-TiO<sub>2</sub> sur des cellules Caco-2 non différenciées*

## 1. Introduction

L'article présenté ici regroupe des travaux préliminaires à ces travaux de thèse et réalisés en partie durant le post-doctorat d'Emilie Brun. Dans cet article, j'ai notamment travaillé à l'optimisation du protocole permettant la quantification des transporteurs ABC, et ensuite réalisé ces quantifications. L'article a pour objectif d'étudier l'impact de deux NPs de TiO<sub>2</sub>, sur deux fonctions principales de l'intestin qui sont l'absorption des nutriments via les transporteurs SLC d'une part, et la protection contre les xénobiotiques via l'expression des transporteurs ABC d'autre part. Pour cela, deux NPs de TiO<sub>2</sub> ont été mises en œuvre : A12, de structure cristalline anatase avec un diamètre primaire de 12 nm et R20, de structure cristalline rutile avec un diamètre primaire de 20 nm. Cette étude ne s'intéresse qu'au modèle cellulaire le plus simple, c'est à dire le modèle d'entérocytes Caco-2 en monoculture, non différencié et exposé à sub-confluence.

Pour commencer, Emilie BRUN et Marie CARRIERE ont étudié la cytotoxicité, la génotoxicité ainsi que le niveau de stress oxydant dans les cellules Caco-2, non différenciées, après exposition aigüe à A12 et R20 par le test MTT, le test des comètes et le test H<sub>2</sub>-DCF-DA respectivement. Les résultats ont montré que les NPs n'induisent pas de modification de la viabilité cellulaire mais qu'elles semblent perturber l'équilibre redox des cellules. Cela a été observé par l'augmentation des ROS intracellulaires après 4 h et 48 h d'exposition ainsi qu'une augmentation de la quantité de glutathion intracellulaire et une diminution de l'activité de l'enzyme superoxide dismutase. D'autre part, des résultats précédents avaient déjà mis en évidence l'accumulation et l'absorption des NPs de TiO<sub>2</sub> au niveau des membranes cellulaires intestinales, *in vivo* et *in vitro*, par XAS, PIXE et TEM. Ainsi, des NPs ont été observées par MET et  $\mu$ XRF au niveau du pôle apical des cellules, enclavées dans de larges compartiments cytoplasmiques (Brun *et al.*, 2014). Il a aussi été montré par ICP-MS que la quantité de titane accumulée était plus importante dans les cellules exposées à R20 que celles exposées à A12.

Les NPs qui s'accumulent dans les entérocytes sont susceptibles d'impacter certaines fonctions de l'épithélium intestinal, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'impact d'A12 et R20 sur les transporteurs membranaires des familles SLC et ABC dans les cellules Caco-2 après une exposition aiguë aux NPs. Nous avons notamment analysé l'expression des gènes codant ces transporteurs par RT-qPCR ainsi que l'expression des protéines par Western Blot. A12 et R20 induisent l'augmentation de l'expression des gènes codant l'ensemble des transporteurs testés dans cette étude, dès 6 h d'exposition pour les transporteurs ABC et plus tardivement pour les transporteurs SLC (48 h). Concernant l'expression des protéines, les NPs induisent une diminution de l'expression de deux des transporteurs ABC après 6 h d'exposition et l'augmentation de l'expression de trois des transporteurs après 48 h d'exposition.

Dans la littérature, différentes études ont montré que la phase cristalline des NPs est l'une des caractéristiques pouvant gouverner leur impact biologique, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Gerloff *et al.*, 2012; Grassian *et al.*, 2007; Gurr *et al.*, 2005). Les NPs de structure anatase sont généralement considérées comme étant plus toxiques que les NPs de forme rutile, notamment en présence de lumière. Via l'utilisation de deux NPs aux structures cristallines différentes, le but de cette étude est aussi d'évaluer l'impact de la structure cristalline des particules de TiO<sub>2</sub> sur les deux fonctions de l'intestin étudiées. Cependant, la principale différence observée entre les NPs est une différence d'accumulation dans les cellules. Il semble que cette différence d'accumulation soit due à l'état d'agglomération des particules, R20 est plus agglomérée, plutôt qu'à la structure cristalline des NPs ou à la couronne protéique.

## 2. Résultats

L'article dans sa totalité est présenté en annexe de la thèse (annexe 1).

Pour ma part, j'ai mis au point les protocoles pour les expériences de Western Blot avec les anticorps spécifiques des transporteurs ABC : MDR1, BCRP, MRP2 et MRP1, sur les cellules Caco-2 non différenciées exposées pendant 6 h et 48 h aux NPs-TiO<sub>2</sub> A12 et R20. Ces protocoles ont ensuite été utilisés pour mes travaux de

thèse sur les modèles Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX différenciés exposés au colorant E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub> A12 et P25. Les résultats sont présentés dans la figure 61.

Dans les cellules Caco-2 non différenciées, les résultats montrent que le contenu protéique en transporteurs MDR1 et BCRP diminue après 6 h d'exposition aiguë à A12 et R20 alors que le contenu protéique en transporteurs MDR1, MRP1, MRP2 et BCRP augmente après 48 h d'exposition aiguë aux deux NPs de TiO<sub>2</sub> (figure 61).

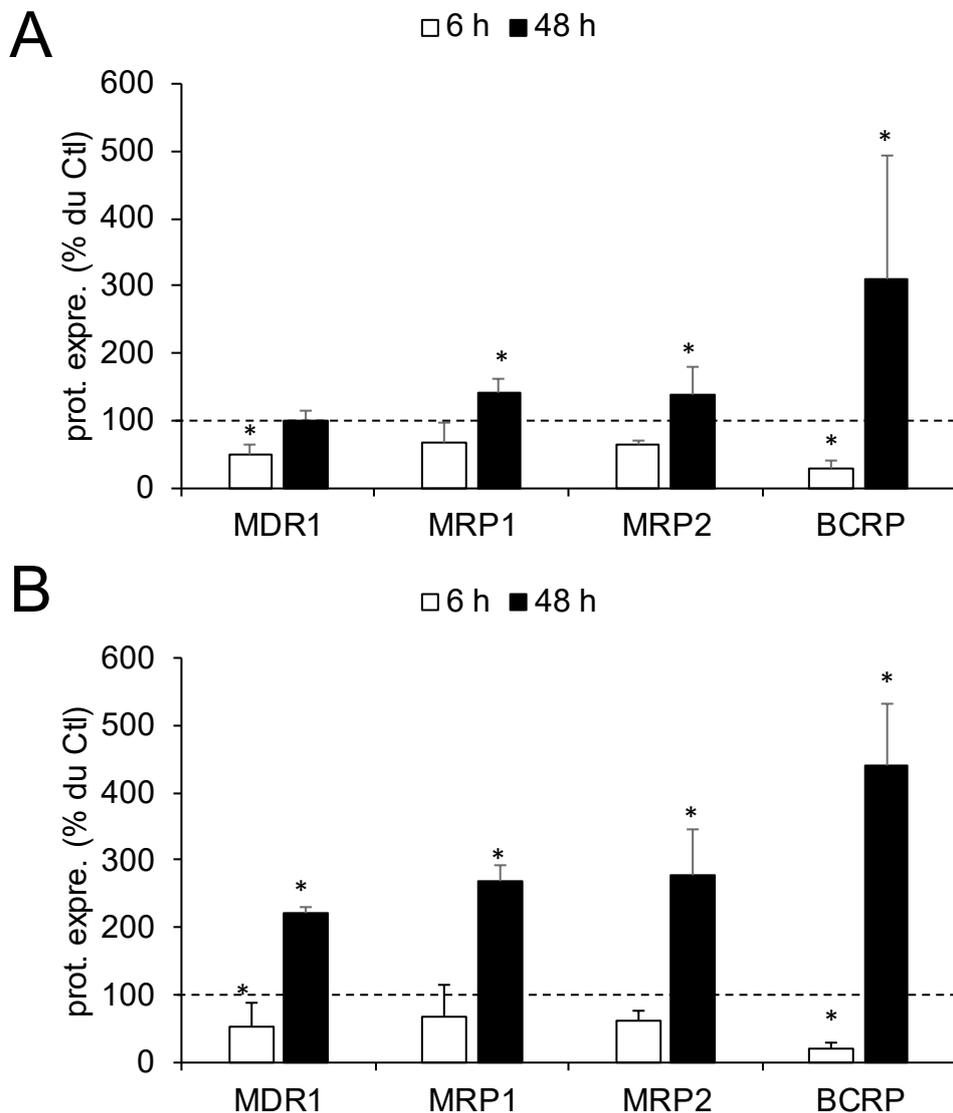


Figure 61 : Contenu protéique des transporteurs ABC dans les cellules Caco-2 exposées à A12 et R20. Le contenu protéique des transporteurs ABC, MDR1, MRP1, MRP2, BCRP, est obtenu par Western-Blot dans les cellules Caco-2 non différenciées exposées pendant 6 h et 48 h à A12 (A) ou R20 (B). Les résultats sont exprimés comme % par rapport au contrôle (cellules non exposées) ; moyenne  $\pm$  écart type, statistiquement significatif \* $p < 0.05$   $n = 3$ .

### 3. Conclusion

Ces résultats ont montré que les NPs de TiO<sub>2</sub>, de structure rutile ou anatase, étaient peu toxiques sur les cellules Caco-2. Elles n'induisent pas de mortalité cellulaire ni de dommages à l'ADN mais impactent l'équilibre redox des cellules. D'autre part, concernant les fonctions principales de l'intestin, i.e., absorption des nutriments et défense de l'organisme, elles entraînent une augmentation de la production d'ARNm codant des transporteurs de nutriments au niveau des entérocytes intestinaux (*CAV1*, *CAV2*, *LRP1*, *SLC2A1*, *SLC15A1 et 15A2*, *SLC7A7 et 7A8*, *SLCO1A2*). Une hypothèse pour expliquer cette augmentation est qu'elle serait une réponse à une carence qu'entraînerait l'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub>, peut-être causée par la rétention de nutriments et d'autres molécules importantes à la surface des NPs. En effet l'interaction entre NPs et sucres, lipides, protéines a été prouvée (Monopoli *et al.*, 2012).

Elles induisent également la modulation de la production d'ARNm codant une série de pompes d'efflux, associée à l'augmentation du contenu protéique après 48 h d'exposition, ce qui est susceptible d'entraîner une résistance accrue aux xénobiotiques (Dorier *et al.*, 2015).

Dans la suite de mon travail, nous nous sommes intéressés à l'impact du colorant E171 sur les transporteurs ABC ainsi que sur d'autres composants de la fonction de barrière de l'intestin, qui sont la couche de mucus et la réponse inflammatoire.

## *Partie II : Effets du E171 sur la fonction de barrière, sur des modèles de cellules intestinales différenciées*

### 1. Introduction

Au sein de l'épithélium intestinal, la majorité des cellules sont bien différenciées et forment un épithélium jointif. Avec le microbiote, la couche de mucus et les tissus lymphoïdes sous-jacents, elles participent à la protection de l'organisme contre les agressions extérieures. Si la présence de micro et nano particules dans l'alimentation, comme celles du colorant E171, s'avère impacter certains éléments de cette barrière intestinale, l'effet pourra être d'autant plus important chez les personnes souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et dont cette barrière est déjà altérée (Antoni *et al.*, 2014; McGuckin *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2013). Au jour d'aujourd'hui, l'étiquetage [nano] des produits n'est pas obligatoire et la recommandation de définition européenne<sup>38</sup> concernant les nanomatériaux est critiquée car elle implique qu'au moins 50 % (en nombre) des particules soient sous forme nanoparticulaire, ce qui n'est pas le cas du E171, qui contient entre 10 et 43 % de NPs de TiO<sub>2</sub> en fonction des études (Chen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014; Weir *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). Le principal objectif de cet article est d'évaluer l'impact du colorant E171 sur la fonction de barrière protectrice de l'intestin.

Pour cette étude, nous avons à nouveau utilisé deux modèles cellulaires, le modèle Caco-2 en monoculture et le modèle Caco-2/HT29-MTX en coculture (70 % et 30 %), cultivés pendant 21 jours de manière à obtenir des épithélia différenciés. Les cellules sont exposées au colorant commercial E171 ainsi qu'à deux NPs de TiO<sub>2</sub>, A12 (anatase, 12 nm) et P25 (anatase/rutile, 25 nm) de façon aiguë pendant 6h et 48h ou de façon chronique, c'est-à-dire qu'elles sont exposées 8 fois pendant les 21 jours que dure leur différenciation (chapitre 2). Dans cet article, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'impact des particules de TiO<sub>2</sub> sur la sécrétion du mucus par les cellules HT29-MTX, en mesurant la quantité de mucus sécrétée, par

---

<sup>38</sup> Consultée sur [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-11-1202\\_fr.htm?locale=en](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_fr.htm?locale=en) (15/06/16)

coloration puis dosage à l'acide périodique de Schiff ainsi que l'expression de gènes codant des protéines entrant dans la composition du mucus, par RT-qPCR. Ensuite, nous avons évalué l'impact des particules sur l'intégrité des épithélia par des mesures TEER. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'impact des particules sur la protection des cellules contre les xénobiotiques, via l'expression des transporteurs ABC, en analysant l'expression des gènes codant ces transporteurs par RT-qPCR ainsi que le contenu cellulaire en transporteurs par Western Blot. Comme l'induction de l'inflammation est un des effets des particules de TiO<sub>2</sub> bien décrit dans la littérature, l'impact du colorant E171 et des NPs de TiO<sub>2</sub> sur l'induction d'effets inflammatoires a été étudié, toujours par RT-qPCR pour l'expression des gènes codant des cytokines et par ELISA classique et multiplexe pour le dosage de ces cytokines.

L'exposition des épithélia aux particules de TiO<sub>2</sub> n'impacte pas leur intégrité, cependant, après l'exposition chronique, nous observons une augmentation de la quantité de mucus dans l'épithélium Caco-2/HT29-MTX ainsi que dans la monoculture HT29-MTX. Cette augmentation est confirmée pour l'exposition à la plus forte concentration de particules, i.e., 200 µg/mL. De plus, l'expression des gènes codant des mucines, protéines entrant dans la composition du mucus, est aussi impactée. Concernant les transporteurs membranaires, leurs expressions génique et protéique sont modifiées dans les cellules exposées. En effet, l'exposition au colorant E171 diminue le contenu cellulaire en transporteurs dans le modèle Caco-2/HT29-MTX, de même que les NPs A12 dans le modèle Caco-2, alors que les NPs P25 augmentent le contenu cellulaire en transporteurs. Les activités de ces transporteurs ne sont cependant pas modifiées. Enfin, concernant l'inflammation, nous observons une modification de la sécrétion des cytokines par la méthode ELISA multiplexe sur le modèle de coculture principalement, et avec la technique ELISA classique, nous observons une augmentation de la sécrétion d'IL-8 dans la monoculture Caco-2. Après l'exposition aiguë, nous observons également dans cet article qu'il y a moins d'effets des particules qu'après une exposition chronique. Les résultats montrent que le colorant E171 impacte la sécrétion du mucus par les cellules HT29-MTX et qu'il modifie l'expression des transporteurs ABC, sans impacter l'intégrité des épithélia. De plus, il module l'expression de cytokines au

sein des épithélia. Ces résultats confirment ce qui avait déjà été observé dans l'article s'intéressant à la toxicité des particules (partie I, chapitre 4), l'exposition chronique aux particules a plus d'effets sur les cellules que l'exposition aigüe. Ces expositions ont aussi plus d'effets sur le deuxième modèle cellulaire, sécrétant la couche de mucus, que sur le modèle Caco-2 seul.

## 2. Article 3

### **Impairment of the intestinal barrier function by E171 food additive and titanium dioxide nanoparticles, *in vitro*.**

Marie Dorier<sup>1,2</sup>, David Béal<sup>1,2</sup>, Caroline Desvergne<sup>3</sup>, Karin Pernet-Galley<sup>4,5</sup>, Frédérick Barreau<sup>6</sup>, Eric Houdeau<sup>7,8</sup>, Nathalie Herlin-Boime<sup>9</sup>, Thierry Rabilloud<sup>10</sup>, Marie Carriere<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, INAC, SyMMES, Laboratoire Lesions des Acides Nucleiques, F-38000 Grenoble, France, <sup>2</sup>CEA, INAC, LCIB, Laboratoire Lesions des Acides Nucleiques, F-38054 Grenoble, France, <sup>3</sup>Université Grenoble-Alpes, CEA, Nanosafety Platform, Medical Biology Laboratory (LBM), 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France, <sup>4</sup>Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble F-38000, France, <sup>5</sup>INSERM U 836, F-38000 Grenoble, France, <sup>6</sup>INSERM, UMR 1220, Institut de Recherche en Santé Digestive, Toulouse, France, <sup>7</sup>INRA, UMR1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France, <sup>8</sup>Université de Toulouse, UPS, UMR1331, Toxalim, F-31062 Toulouse, France, <sup>9</sup>UMR3685, univ. Paris Saclay, IRAMIS, NIMBE, LEDNA, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France, <sup>10</sup>ProMD, UMR CNRS 5249, CEA Grenoble, DRF/BIG/CBM, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, Grenoble, France.

\*Correspondence:

Dr., Marie Carriere, Ph.D

E-mail: marie.carriere@cea.fr

Phone +33 4 38 78 03 28 ; Fax: +33 4 38 78 5090

### **Abstract**

E171 is used in the food industry as a white coloring agent, authorized from the late 60ies in most countries. It is composed of TiO<sub>2</sub> particles and contains a significant proportion of nanoscale TiO<sub>2</sub> particles (NPs), which have been reported to reduce the viability, induce DNA damage, oxidative stress and inflammatory conditions on several cell models. The aim of the present study was to evaluate the impact of E171 on the determinants that confer to the intestinal barrier its protective function. To achieve this goal, we exposed two advanced models of

intestinal epithelium, a monoculture of differentiated Caco-2 enterocytes and a co-culture of Caco-2 with HT29-MTX mucus-secreting cells, to E171 and two references of TiO<sub>2</sub>-NPs. Exposure regimen was either acute, for 6 h or 48 h, or repeated for 21 days. We evaluated their impact on mucus secretion and composition, epithelial integrity, expression of efflux pumps from the ATP-binding cassette (ABC) family and inflammatory response. Our results show that E171 increases the glycoprotein content of mucus without drastically affecting the expression of mucins. It modulates the expression of some ABC transporters and reduces the secretion of a variety of cytokines and chemokines. All these effects are statistically significant, although moderate. Together, these data suggest that TiO<sub>2</sub> particles, either micro-sized or nano-sized, may moderately affect the protective function of the intestinal barrier.

## Introduction

In western countries, the prevalence of food intolerance and inflammatory bowel disease (IBD), consisting of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), is increasing from the late 50's (Lomer *et al.*, 2002). Worldwide, the prevalence of IBD presently reaches 505 UC and 322 CD per 100 000 persons in Europe and 249 UC and 319 CD per 100 000 persons in North America. In parallel these pathologies are emerging in developing countries (Molodecky *et al.*, 2012; Ponder and Long, 2013). Their causes are unclear but they have been shown to result from the combination of genetic, psychological and environmental factors (Ananthkrishnan, 2015; Thia *et al.*, 2008). Among environmental factors, cigarette smoke, diet, microorganisms and food contaminants, as well as chronic ingestion of particulate food additives has been suggested as causative factors (Chapman-Kiddell *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2011; Koutroubakis *et al.*, 1995; Lomer *et al.*, 2002). Additives and mineral particles are added to food products in order to improve their texture, color and flavor (Ranjan *et al.*, 2014; Smolkova *et al.*, 2015). In packaging, they enhance their properties i.e. mechanical, antimicrobial, preservative property, etc. (Chaudhry and Castle, 2011; Peters *et al.*, 2016).

One of the most used particulate food additive is the food-grade TiO<sub>2</sub>, namely E171, which was authorized in the late 60's in US and Europe without any established acceptable daily intake due to its insignificant absorption and lack of toxicity after ingestion (Jovanović, 2015). Particularly, it is used as a white coloring agent in food and personal care products (Powell *et al.*, 2010). The highest quantity of TiO<sub>2</sub> is found in candies and chewing gums (Chen *et al.*, 2013). Detectable amounts of titanium, ranging from 0.02 to 9.0 mg TiO<sub>2</sub>/g, were detected in food products (Peters *et al.*, 2014) while some high-consumption pharmaceuticals contained 0.014 µg Ti/mg (Weir *et al.*, 2012). Daily ingestion of these products led to estimate human exposure at 1-2 mg/kg bw/day of TiO<sub>2</sub> for US children under 10 and 0.2-0.7 mg TiO<sub>2</sub>/kg bw/day for other US consumers (Chen *et al.*, 2013; Weir *et al.*, 2012). This additive is not a nanomaterial with respect to the European recommendation of definition<sup>39</sup> because it contains less than 50% of particles, in the number size

---

<sup>39</sup> 2011 Official Journal of the European Union (2011/696/EU) 18/10/2011

distribution, with at least one dimension <100 nm, i.e. nanoparticles (NPs). However recent studies show that it can contain various amounts of NPs (Peters *et al.*, 2014; Weir *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014) with up to 43 % of NPs in some sugar coated chewing-gum (Chen *et al.*, 2013). They were also detected in several other food products (Peters *et al.*, 2014; Weir *et al.*, 2012).

Impairment of the so-called intestinal barrier function (IBF) is reported in food intolerance and IBD (Antoni *et al.*, 2014). IBF relies on four different lines of defense. First, the intestine is populated by commensal bacteria, collectively named microbiota, which stimulate intestinal immunity and produce anti-microbial substances (AMPs) to eliminate pathogenic bacteria (Sommer and Bäckhed, 2013). Then, the mucus layer secreted by goblet cells which are secretive cells among the epithelium, forms a protective blanket on the surface of the underlying epithelium (Johansson *et al.*, 2011a; MacAdam, 1993), its thickness is 50 µm in the colon of mice and 200-300 µm in men's (Pelaseyed *et al.*, 2014). The third line of defense is the epithelial layer itself, which is composed of tightly bound cells of four main different types i.e. enterocyte, goblet cell, Paneth cell, enteroendocrine cell (Antoni *et al.*, 2014). The presence of tight junctions between these cells provides a physical barrier to prevents contaminants from passing from the gut lumen to internal tissues (Antoni *et al.*, 2014; Peterson and Artis, 2014). Moreover, enterocytes, which are absorptive cells, express efflux pumps on their apical surface. These proteins, which are members of the ATP binding cassette (ABC) family of transporters, contribute to the efflux of toxins from enterocytes (Leslie *et al.*, 2005). Finally, the gut-associated lymphoid tissue (GALT) constitutes the last line of defense. GALT is composed of Peyer patches and immune cells stored in underlying lymphoid tissue which are inductive and effective sites of the intestinal immune response (Brandtzaeg, 2009; Mowat, 2003).

The toxicity of TiO<sub>2</sub>-NPs has been largely studied and reviewed, especially in the context of inhalation (Johnston *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011; Warheit *et al.*, 2015). In this context, TiO<sub>2</sub> was classified as human carcinogen group 2B by the international agency for research on cancer (IARC)(IARC, 2010). The toxicity of TiO<sub>2</sub>-NPs is also documented, although to a lesser extent, in the context of ingestion (McCracken *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011).

In most studies, TiO<sub>2</sub> particles were proven relatively safe for intestinal cells, no cytotoxicity or genotoxicity were reported (Brun *et al.*, 2014; Dorier *et al.*, 2015; Z.-M. Song *et al.*, 2015; Susewind *et al.*, 2016). Interestingly, their reported impact on intestinal cells suggests alteration of almost all the components of the IBF. First, *in vivo*, TiO<sub>2</sub>-NPs affect the permeability of the ileum and colon, and alter the tight junctions that maintain intestinal epithelium integrity (Brun *et al.*, 2014). *In vitro*, they modulate the expression of efflux pumps from the ABC transporters family, in enterocytes (Dorier *et al.*, 2015). Second, these NPs accumulate in mucus-secreting cells, both *in vivo* and *in vitro* (Brun *et al.*, 2014; Urrutia-Ortega *et al.*, 2016). They increase intracellular concentration of free Ca<sup>2+</sup> (Brown *et al.*, 2004; Gitrowski *et al.*, 2014; Koeneman *et al.*, 2009) which is linked to mucus exocytosis from cell (Berridge *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 1998). Moreover, exposure to E171 causes reduction of the number of goblet cells and therefore would reduce intestinal mucus production (Urrutia-Ortega *et al.*, 2016). Then TiO<sub>2</sub>-NPs also induce a pro-inflammatory response in immune cells, i.e. elevate the levels of the IL-6, IL-8; IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells (Schanen *et al.*, 2009), as well as activate NF- $\kappa$ B and upregulate the expression of genes encoding pro-inflammatory mediators in macrophages (Giovanni *et al.*, 2015). This pro-inflammatory response is also reported in buccal cells, concomitant with elevated reactive oxygen species (ROS) contents (Tay *et al.*, 2014). Lastly, TiO<sub>2</sub>-NPs alter the autophagic processes in several cell models, including lung cells (Yu *et al.*, 2015a), skin cells (Lopes *et al.*, 2016) and brain-derived endothelial cells (Halamoda Kenzaoui *et al.*, 2012) and autophagy is known to be an important contributing factor in IBD (El-Khider and McDonald, 2016; Henderson and Stevens, 2012).

The impact of E171 food additive on the IBF has never been evaluated; therefore, the aim of this article was to fill in this gap of knowledge. We evaluated its impact, *in vitro*, on the secretion of mucus by goblet cells and on the protective function of the intestinal epithelium. Moreover, we evaluated its pro-inflammatory potential. To achieve this goal, we used two cell models from intestinal origin. First, an enterocyte-like model, composed of differentiated Caco-2 cells, was used to mimic

a non-secreting intestinal epithelium. Second, we used a coculture of enterocyte-like cells and Goblet cells (Caco-2/HT29-MTX), seeded at 70 % of Caco-2 and 30 % of HT29-MTX to mimic the mucus-secreting ileum epithelium (Lesuffleur *et al.*, 1990; Natoli *et al.*, 2012; Walter *et al.*, 1996). Both models were exposed to E171 from commercial origin, either continuously for 21 days, which is the time needed for cell differentiation, or acutely for 6 h or 48 h on already differentiated epithelia. Two references of TiO<sub>2</sub>-NPs, P25 (mixed anatase/rutile, 25 nm, NM105) and A12 (pure anatase, 12 nm) were used for comparison purposes. On these models, we previously showed that chronic exposure to E171, A12 and P25 does not alter cell viability and does not induce DNA strand breaks or endothelial reticulum stress but induces significant intracellular ROS accumulation, concomitant with the onset of DNA base oxidation and down-regulation of gene involved in the maintenance of endoplasmic reticulum homeostasis (Dorier *et al.*, submitted). The results presented here suggest that E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs may alter the IBF. Their implication in the onset and/or aggravation of IBD symptoms would thus deserve further attention.

## Material and Methods

Unless otherwise indicated, chemicals were all purchased from Sigma-Aldrich and were >99% pure. Cell culture media and serum were purchased from ThermoFisher Scientific.

### Particle dispersion and characterization

E171 food additive powder used in this study was from a French commercial source, TiO<sub>2</sub>-NPs A12 was produced in our laboratories (Pignon *et al.*, 2008) and TiO<sub>2</sub>-NPs P25, referenced as NM105 in the nanomaterial library at the European Joint Research Center (JRC, Ispra, Italy), were obtained from the JRC. These TiO<sub>2</sub> particles have already been used in our previous studies (Dorier 2015, Brun, 2014). Their specific surface area was measured by the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method, their crystalline phase by X-ray diffraction (DRX) and their diameter was measured on transmission electron microscopy (TEM) images, as

previously described (Jugan *et al.*, 2011; Simon-Deckers *et al.*, 2008). Particle suspensions (10 mg/mL) were prepared in ultrapure sterile water and dispersed by indirect cup-type sonicator (Cup Horn) which is a high intensity ultrasonic water bath that provide sterile conditions (Bioblock Scientific, Vibracell 75041, Huber minichiller, 100-500  $\mu$ L; continuous sonication for 30 min; at 80% amplitude; 4°C). The power of our sonicator was measured using the calorimetric procedure (Taurozzi *et al.*, 2010). Amplitude of 80 % corresponds to 52.8 W. After dispersion, their zeta potential and their agglomeration state were measured by dynamic light scattering on a ZetaSizer nano ZS (Malvern Instrument). Particle suspension was checked daily for 4 days and reproducibility was followed up to 8 times.

## Cell culture and cell models characterization

### Cell culture

Caco-2 cells (ATCC HTB-37, passages from 49 to 60) and HT29-MTX mucus-secreting cells (kindly provided by T. Lesuffleur, INSERM U843, Paris, France) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX™ (10569010) supplemented with 10 % heat inactivated fetal bovine serum, 1 % non-essential amino acids, 50 units/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. They were maintained at 37°C under 5 % CO<sub>2</sub>. For all experiments, cells were seeded at a density of 24 000 cells.cm<sup>-2</sup> in appropriate support, i.e. 60 cm<sup>2</sup> petri dishes, multi-wells plates or Transwell-Clear® inserts (polyester, 0.4  $\mu$ m pores, Costar). They were grown as a monoculture of Caco-2, or as a coculture composed of Caco-2 (70 % in number) and HT29-MTX cells (30 % in number). This coculture is a model of mucus-secreting absorptive ileum that was further characterized by confirmation of mucus secretion and measurement of alkaline phosphatase activity, which is a hallmark of microvilli differentiation (figure S1).

### Cell exposure to particles

For acute exposure experiments, cells were grown to confluence and differentiated by maintaining them 21 days post-confluence, changing cell culture medium three times per week. Cells were then exposed for 6 h, 24 h or 48 h. In the chronic (repeated) exposure scenario, they were exposed twice a week from seeding up to

their complete differentiated state, 21 days after seeding, i.e. exposure medium was thus renewed 8 times (figure S2). Cells were exposed to particles at 1-200 µg/mL, prepared in the cell culture medium presented above.

#### Impact assessment

##### Epithelium integrity evaluation by Transepithelial electrical Resistance measurement

Transepithelial electrical Resistance (TEER) was followed using the Electrical Resistance System Millicell® ERS-2 (Millipore). Electrodes were first sterilized in 70 % ethanol, rinsed in sterile water then equilibrated in the culture medium. The resistance was measured on cells grown onto 12-well transwell inserts (R cell). A blank insert (without cells) immersed in cell culture medium was used to measure the resistance of the transwell (R blank). Three measurements were performed for each insert. The TEER was then calculated as follows:  $TEER = (R_{cell} - R_{blank}) \times A$ . TEER is expressed in  $\Omega \cdot cm^2$ ,  $R_{cell}$  and  $R_{blank}$  are in  $\Omega$  and A, the surface area of the insert, was 1.12 cm<sup>2</sup>.

##### Gene expression

Gene expression in cells exposed to particles was assessed by real-time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). After exposure to particles, RNA was extracted using GenElute™ mammalian total RNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich). Cells were harvested in the lysis buffer supplied in the RNA extraction Kit and stored at -80°C. Total RNA concentration and purity were determined by measuring absorbance (abs) at 260 nm, abs 260/abs 280 nm and abs 260/abs 230 nm ratios. 2 µg of total RNA was reverse transcribed to cDNA with 100 ng/µL random primers, 10 mM dNTP and the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Total cDNA concentration and purity were determined by measuring abs 260 nm and ratios abs 260/abs 280 nm, abs 260/abs 230 nm ratios. MESA Blue qPCR Mastermix for SYBR Assay (Eurogentec) with ROX reference was used to perform the quantitative PCR in a MX3005P multiplex quantitative PCR system (Stratagene). The primer sequences are described in table S1. Primers for mucus proteins and ABC transporters were designed by us, MUC2 primer was from Bio-

Rad (ref 10025636) and primers for inflammation were kindly provided by our collaborator S.Candeias (LCBM, CEA-Grenoble). Their efficiency was determined, and only primers have efficiency between 1.8 and 2.2 were used. Relative expression values were calculated as  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .  $\Delta Cq$  is the difference between the cycle threshold (Cq) values for target and reference genes for each condition. Then,  $\Delta\Delta Cq$  is the difference between the  $\Delta Cq$  of one exposure condition and of the control condition. *CYCLOA* and *B*, *S18* and *GAPDH* were used as references genes for normalization. Their variability of expression was assessed using Bestkeeper, an excel-based pairwise mRNA correlation tool (Pfaffl *et al.*, 2004). Gene expression and statistics were obtained using the Relative Expression Software Tool (REST2009) based on Cq comparison (Pfaffl *et al.*, 2002). Data are expressed as percentages of the corresponding control.

#### Analysis of ABC transporters

Quantification of ABC transporters was assessed by Western Blot. Total proteins were extracted from control and exposed cells (CellLytic M Cell Lysis Reagent) and quantified. 20  $\mu$ g of denatured proteins was deposited on 3 independent stain-free 7.5 % polyacrylamide gels (TGX Stain Free FastCast Acrylamide Kit, 7.5 %, ref Bio-Rad 1610181) which were migrated at 200 V for 40 min. After transfer on nitrocellulose membranes (Trans-Blot Turbo Transfer Pack 0.2  $\mu$ m Nitrocellulose Midi, Bio-Rad) ABC transporter proteins were blotted using specific antibodies (Abcam, MDR1: ab170904 1/2500; MRP1: ab24102 1/500; MRP2: ab3373 1/200; BCRP: ab108312 1/2500) prepared in TBS containing 0.5 % tween-20 and 5 % milk. 4 replicates of each condition and controls were deposited on each gel. Proteins were revealed with the Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) and quantified with chemiluminescence (Bio-Rad, ChemiDoc™ XRS+). The intensity of each band was normalized according to total protein content of the lane then divided by the normalized intensity of unexposed cells.

ABC transporter activity was assessed using the eFluxx-ID® Green Multidrug Resistance Assay Kit (Enzo life sciences). Emission peaks of e-Fluxx-ID Green dye was detected using a FACS Calibur analyzer (BD Biosciences) equipped with CXP software (Beckman Coulter Inc.). In IP-negative cells, mean fluorescence intensity

was obtained using Flowing Software 2.5.1 (<http://www.flowingsoftware.com/>) then multidrug resistance activity factors were calculated for each transporter as recommended by the supplier. Three measurements were performed for each condition.

#### Analysis of mucus secretion

First mucus secretion was imaged after Alcian Blue staining. Cells were seeded in 6-wells plates, after 21 days of growth, they were washed with PBS then fixed for 20 min at RT in 90 % ethanol / 3 % acetic acid (3V/V). They were then stained with Alcian blue, a cationic dye which stains acidic polysaccharides, mucopolysaccharides and sialylated glycocalyx. Fixative solution was replaced by Alcian blue, pH 2.5, dissolved in acetic acid (Dorier *et al.*, submitted). After incubation for 30 min at RT in the dark and under stirring, the cells were washed twice, then observed and imaged using an optical microscope (Axiovert 25 Zeiss). Then, mucus secretion was quantified using Periodic Acid Schiff (PAS) staining and quantification by spectrophotometry. Cells were seeded in 12-wells plates. After 21 days, cells were harvested with PBS + Triton 1 X. 25  $\mu$ L of each condition (3 replicates) was deposited in a 96-wells plate in duplicates. Periodic acid and acetic acid were prepared at 50 % and 7 % in deionized water respectively. Then 120  $\mu$ L of 0.6% periodic acid prepared in acetic acid was added in each well and incubated for 90 min at 37 °C. Then 100  $\mu$ L of Schiff reagent was added and incubated in the dark for 5 min at RT under stirring, then another 40 min at RT without stirring. Absorbance was measured at 550 nm (Molecular Devices, SpectraMax M2). A calibration curve was prepared from porcine stomach mucin (100-5000  $\mu$ g/mL) as a positive control for the assay.

Potential interferences of NPs with the assay were tested by adding 10, 50 or 100  $\mu$ g/mL of particles to empty wells.

#### Inflammation

First, secretion of IL-8 was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the supplier's protocol. Capture and detection antibodies, enzymes and 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate were from the Human IL-8

ELISA set and TMB Substrate Reagent Set BD OptEIA BD™ ELISA Set (BD Biosciences). Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was used as positive control (Life technologies), cells were incubated 24 h with 10 ng/mL of IL-1 $\beta$ , then supernatants were collected and frozen at -20°C until analysis. After 21 days, cell supernatants were collected and frozen at -20°C until analysis. 96 wells microplates (Nunc maxisorp) were coated with human recombinant IL-8 primary antibodies and incubated overnight at 4°C. Between each step, wells were washed with PBS-Tween 20 (0.05 %). After saturation with assay diluent (PBS + 10 % DFBS) for 1 h at RT, samples and standards were added into the wells and incubated for 2 h at RT. Cell supernatants from the Caco-2/HT29-MTX coculture were diluted (1/100) before being deposited in the wells. Detector antibody was then added and incubated for 1 h at RT. Enzyme was added and incubated for 30 min at RT. Plates were then washed 7 times for 30 s under stirring. Finally, TMB substrate was added and incubated for 30 min in the dark. The reaction was stopped by adding sulfuric acid (1 M). Absorbance was measured at 405 nm and corrected by subtracting the absorbance at 570 nm. Concentrations of IL-8, expressed in pg/ml, were calculated against a standard curve prepared in duplicate. 3 independent experiments with 3 replicates per experiment were performed.

Potential interferences of NPs with the assay were tested by adding 10, 50 or 100  $\mu$ g/mL of particles to empty wells.

To have a broader view of inflammatory cytokine induction, we used the Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay multiplex immunoassay (BioPlex MagPix™ Bio-Rad) that screens 26 cytokine levels in the supernatant of exposed cells.

#### Statistical analysis

Statistica 8.0 software (Statsoft, Chicago, USA) was used for statistical analyses. Unless indicated otherwise, statistical significance was assessed with non-parametric one-way analysis of variance on ranks approach (Kruskal-Wallis) followed by paired comparison using Mann-Whitney u-test. Results were considered statistically significant when the p-value was < 0.05.

## Results

### Models and particles characterizations

The impact of TiO<sub>2</sub>-NPs and E171 food additive was assessed on two cell models: a monoculture of differentiated Caco-2 cells and a coculture of Caco-2 and HT29-MTX cells (Caco-2/HT29MTX), seeded at 30 % HT29-MTX and 70 % Caco-2 so that they represent the epithelium lining the ileum. The Caco-2 monoculture formed a tight epithelium with a high TEER value that expressed alkaline phosphatase (figure S1), which is a marker of cell differentiation because it is expressed in microvilli. Alcian blue and Periodic Acid Schiff staining showed that this cell model does not produce mucus (figure 1). Conversely the Caco-2/HT29-MTX coculture formed an epithelium with a lower TEER value, a lower level of alkaline phosphatase expression (figure S1), but it secreted mucus (figure 1).

The physico-chemical characteristics of E171 food additive, as well as A12 and P25 TiO<sub>2</sub>-NPs used in this study are given in table 1. E171 was >95 % anatase, with a mean grain size of 119 nm. It was not a nanomaterial as defined by the EU, but 47% of the particles were inferior to 100 nm, in diameter, which is among the highest values range of the literature (Chen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014; Weir *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). Its specific surface area was 9.4 m<sup>2</sup>/g. After sonication in water its mean  $\pm$  standard error hydrodynamic diameter was 415.4 $\pm$ 69.5 nm (0.48 $\pm$ 0.071 PdI). Upon dilution in exposure medium it increased to 739.3 $\pm$ 355.3 nm (0.64 $\pm$ 0.221 PdI), i.e. it agglomerated.

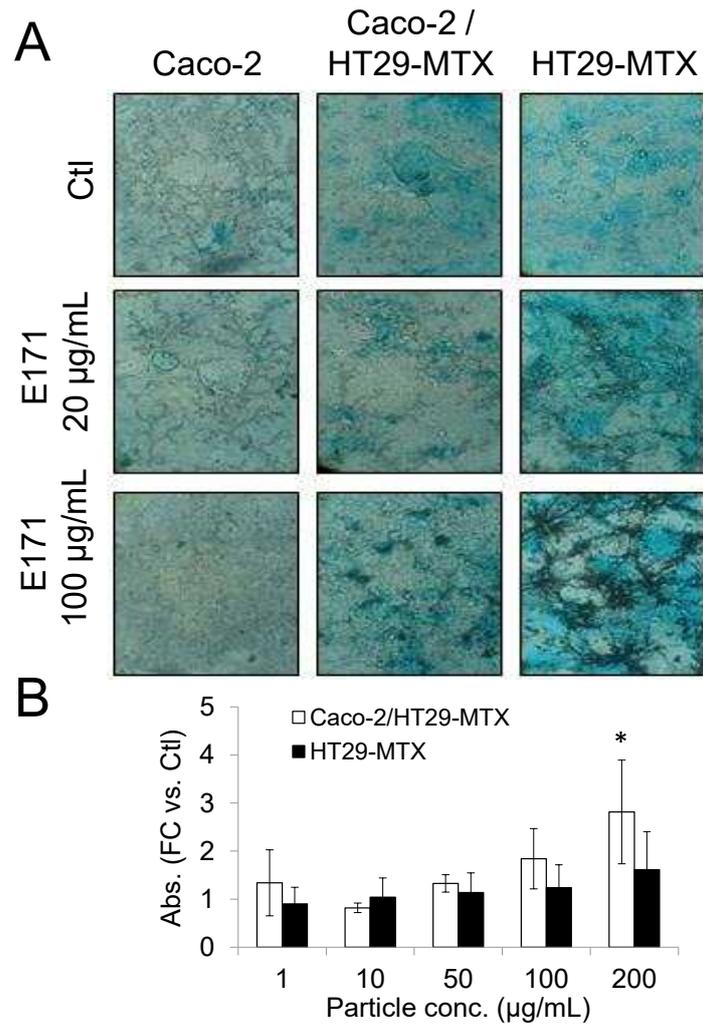


Figure 1. Characterization of the impact of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs on intestinal mucus. Mucus was either imaged after Alcian blue staining (A) or quantified after periodic acid-Schiff staining (B) in Caco-2 monoculture or Caco-2/HT29-MTX coculture chronically exposed to 1-200 µg/mL of E171, A12 or P25 for 21 days. In B, results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells); mean ± standard deviation, statistical significance \*p<0.05 exposed vs control, n=3.

	diam. TEM (nm)	SSA (m <sup>2</sup> /g)	crystal. struct.	H. diam. water (nm)	PdI water	H. diam. medium (nm)	PdI medium	ζ medium (mV)
E171	118±53	9.4	>95% anat.	415.4±69.5	0.48±0.071	739.3±355.3	0.64±0.221	-19±0.7
A12	12±3	82	>95% anat.	85±2.9	0.17±0.021	447.9±0.3	0.25±0.015	-10.8±0.6
P25	24±6	46	86% anat.	157.6±1.0	0.16±0.012	439.9±6.7	0.18±0.014	-11.2±0.8

Table 1. Physico-chemical characteristics of the TiO<sub>2</sub> particles. The primary diameter (diam.) of E171 was measured on TEM images (~200 particles were measured). The specific surface area (SSA) was measured via the BET method. Crystalline structure (cryst. struct.) was identified by X-ray diffraction. The hydrodynamic diameters (H. diam.) are the mean ± standard deviation of the Z-average values given by a Malvern Nanosizer; PdI are the polydispersity indexed; measurements were carried out either in ultrapure water (water) or in cell culture medium (medium). The zeta potential (ζ) was measured on particle dispersions prepared in cell culture medium just before cell exposure.

### Impact of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs on mucus secretion

The mucus is predominantly composed of water (95 %) and contains mucins which are large glycoproteins of two types: i) the transmembrane mucins, including MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16, and MUC17, which are located on the apical surface of epithelial cells, and ii) the gel-forming mucins, in the intestine predominantly MUC2 (Johansson *et al.*, 2011a), but also MUC5AC, MUC5B, and MUC6, which are secreted and form the mucus layer. The intestinal mucus layer also contains Trefoil factor 3, a structural component of the mucus gel which interacts with mucins, modulates rheological gel properties and has proliferative and anti-apoptotic properties (McGuckin *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 1997). Lastly, the transcription factor, Kruppel-like factor 4 (KLF4), expressed in differentiated intestinal epithelial cells, is involved in the regulation of proliferation, differentiation and tumorigenesis of goblets cells (Wei *et al.*, 2005). E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs were applied on monocultures of Caco-2 or HT29-MTX cells or the Caco-2/HT29-MTX coculture, either acutely at 50 µg/mL, for 6 h or 48 h, or chronically at 10 or 50 µg/mL during the 21 days that are necessary for cell differentiation. Qualitatively, mucus staining with Alcian Blue in the Caco-2/HT29-MTX coculture and HT29-MTX monoculture, chronically exposed to E171 at 20 or 100 µg/mL (figure 1A), showed higher color intensity in exposed cells, as compared to control cells (figure 1A). Alcian Blue is a basic dye, which stains polysaccharides including glyco-polysaccharides and muco-polysaccharides. Therefore, our observation suggests that E171 induced increased polysaccharide secretion, i.e. increased the secretion of mucus, or secretion of a more concentrated mucus, i.e. with higher mucin content.

This increase was confirmed and further quantified by PAS staining, which is specific to glycolipids and glycoproteins. A 2.8-fold increase of color intensity was observed in the Caco-2/HT29-MTX coculture exposed to E171 at 200 µg/mL (figure 1B), as compared to control. No difference was observed in the HT29-MTX monoculture exposed to E171 or TiO<sub>2</sub>-NPs (figure 1B).

To analyze the impact of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs on mucus quality, the mRNA expression of genes encoding proteins implicated in mucus secretion and

composition were then investigated by RT-qPCR. We analyzed the expression of the transmembrane mucins *MUC1*, *MUC12*, *MUC17* and of the secreted mucin *MUC2*. Moreover, we measured the mRNA expression of trefoil factor 3 (*TFF3*) and of the Kruppel-like factor 4 (*KLF4*). In the Caco-2/HT29-MTX coculture chronically exposed to E171 or TiO<sub>2</sub>-NPs, only *MUC1* and *KLF4* showed modulated expression, which was downregulation. *MUC1* was downregulated in cells exposed to P25 at 10 µg/mL or to E171, A12 and P25 at 50 µg/mL (figure 2A). Down-regulation of *KLF4* was observed after chronic exposure to E171 and A12 at 10 µg/mL and to P25 at 50 µg/mL (figure 2A). When Caco-2/HT29-MTX were acutely exposed, the only genes and conditions showing significant expression modulation were 6 h of exposure to A12 and 48 h of exposure to P25, where upregulation of *MUC1* and downregulation of *TFF3*, were observed respectively (Figure 2B).

For comparison purpose, we also measured mRNA expression of these genes in Caco-2 cells (figure 2C-D), which are not supposed to secrete mucus. According to Klinken *et al.*, 1996, in Caco-2 cells, a small population of cells probably express mucins mRNAs i.e. *MUC1*, *MUC3*, *MUC4* and *MUC5A/C*, but not *MUC2* and *MUC6*. Up-regulation of *TFF3* was observed after chronic exposure to E171 at 10 µg/mL and up-regulation of *MUC12* was observed at 50 µg/mL (figure 2C). No other significant change was observed.

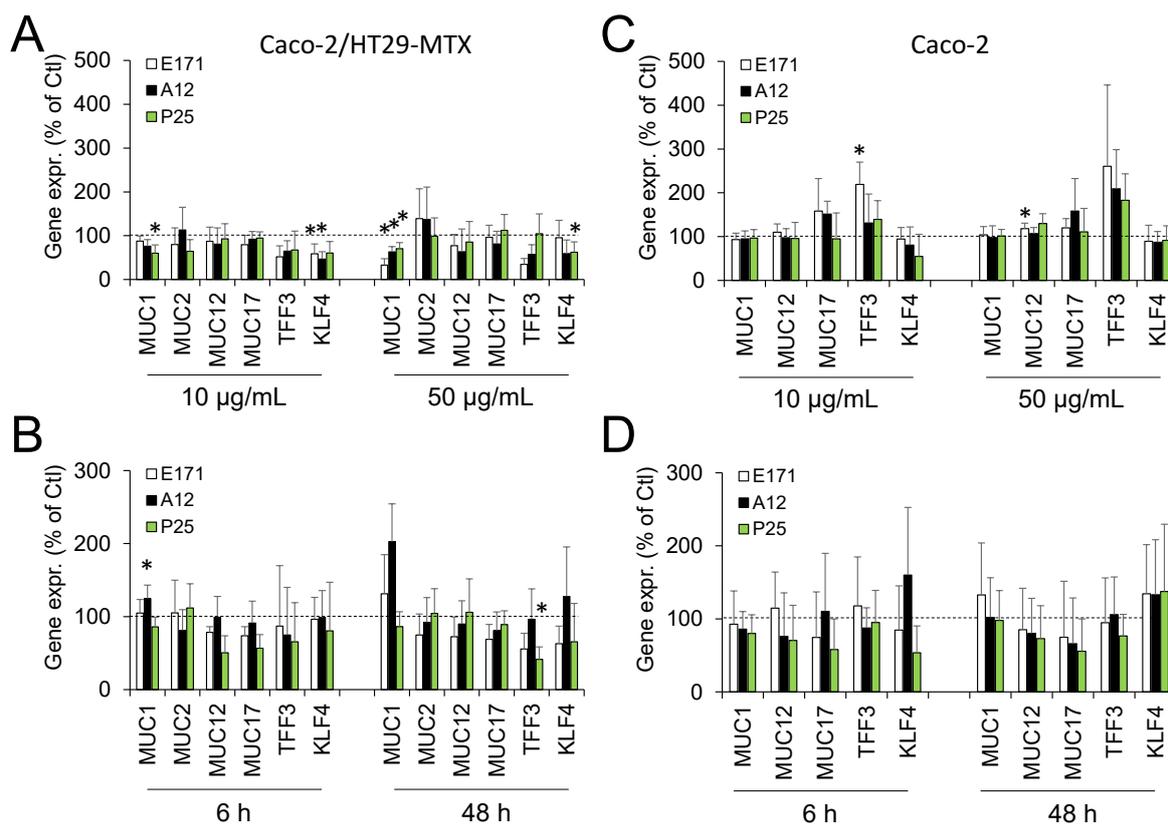


Figure 2. Impact of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs on the mRNA expression of mucus protein. The mRNA expression of 6 proteins and transcription factors involved in mucus composition and secretion were measured by RT-qPCR: Mucin 1 (MUC1), Mucin 2 (MUC2), Mucin 12 (MUC12), Mucin 17 (MUC17), Trefoil factor 3 (TFF3), Kruppel-like-factor 4 (KLF4). Caco-2/HT29-MTX coculture (A-B) and Caco-2 monoculture (C-D), were either chronically exposed to E171, A12 and P25 NPs at 10 and 50  $\mu$ g/mL (A-C), or acutely exposed to E171, A12 and P25 NPs at 50  $\mu$ g/mL for 6 h and 48 h (B-D). Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells); mean  $\pm$  standard deviation, statistical significance \* $p$ <0.05 exposed vs control,  $n$ =3.

### Impact of the TiO<sub>2</sub> particles on the epithelial integrity

To evaluate the impact of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs exposure on the barrier function of the intestinal epithelium itself, we evaluated the epithelial integrity and the expression of efflux pumps from the ABC transporter family, which was previously shown to be altered by exposure to TiO<sub>2</sub>-NPs (Brun *et al.*, 2014; Dorier *et al.*, 2015). The epithelium integrity was maintained, as proved by transepithelial resistance (TEER) measurement (table 2), which was 3942 $\pm$ 147  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> in unexposed Caco-2 cells. The TEER remained stable at 4278 $\pm$ 140; 3916 $\pm$ 197; 3983 $\pm$ 293  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> in Caco-2 monocultures exposed to E171, A12 or P25 at 50  $\mu$ g/mL respectively. In the Caco-2/HT29-MTX coculture, the TEER was lower as already described in the literature,

owing to the presence of HT29-MTX cells that do not form an epithelium with tight junctions (Schimpel *et al.*, 2014). The TEER value was  $302 \pm 12 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in unexposed control cells and  $280 \pm 12 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $310 \pm 9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $347 \pm 10 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in cells respectively exposed to E171, A12 or P25 at  $50 \mu\text{g/mL}$  (table 2).

	Caco-2	Caco-2/HT29-MTX
Control	$3942 \pm 147$	$302 \pm 12$
E171	$4278 \pm 293$	$280 \pm 12$
A12	$3916 \pm 140$	$310 \pm 18$
P25	$3983 \pm 197$	$347 \pm 21$

Table 2. TEER values after exposure to TiO<sub>2</sub> particles. The TEER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) was measured in 12-well transwell<sup>®</sup> clear inserts where Caco-2 or Caco-2/HT29-MTX cells were continuously grown for 21 days in cell culture medium containing  $50 \mu\text{g/mL}$  E171, A12 or P25. Values are mean  $\pm$  standard deviation; statistics: \* $p < 0.05$ . None of the values was significant different from the control.

We then assessed the expression and activity of efflux pumps from the ABC family, which are membrane transporters responsible for the efflux of xenobiotics from intestinal epithelial cells. In humans, the major ABC transporters include the MDR1/P-glycoprotein (ABCB1), several members of the MRP (ABCC) family and the BCRP (ABCG2) transporter (Szakács *et al.*, 2008). Enterocytes express MRP1 on their basolateral membrane whereas MDR1, MRP2 and BCRP are located in the apical membrane of the cell (Leslie *et al.*, 2005). This reverse uptake decrease bioavailability of xenobiotic (Brand *et al.*, 2006). We previously reported that the expression of these transporters was up-regulated in undifferentiated Caco-2 cells exposed to anatase and rutile TiO<sub>2</sub>-NPs (Dorier *et al.*, 2015).

After acute or chronic exposure to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs, the content of some of these transporter, measured by Western Blot, was significantly modified in differentiated Caco-2 cells and in the Caco-2/HT29-MTX coculture. In the acutely-exposed (48 h) Caco-2 monoculture, E171, A12 and P25 reduced the MRP1 content (figure 3A). This reduction could be observed after 6 h of exposure to A12, together with reduced content of BCRP and increased content of MDR1. Increased content of MDR1 was also observed in cells exposed for 6 h to P25 (figure 3A). Conversely, in the acutely-exposed (6 h) Caco-2/HT29-MTX coculture model, E171 and P25

increased the content of BCRP, MRP1, MDR1 and MRP1 respectively (figure 3C). In the chronically-exposed Caco-2 monoculture, E171 had no significant impact whereas A12 decreased MRP2 and MDR1 protein contents at 10 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and P25 increased BCRP, MRP2 and MDR1 protein content at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  only (figure 3B). Conversely, E171 decreased the content of BCRP, MRP2 and MDR1 both at 10 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and P25 increased MRP2, MDR1 content at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Caco-2/HT29-MTX coculture when exposed chronically (figure 3D).

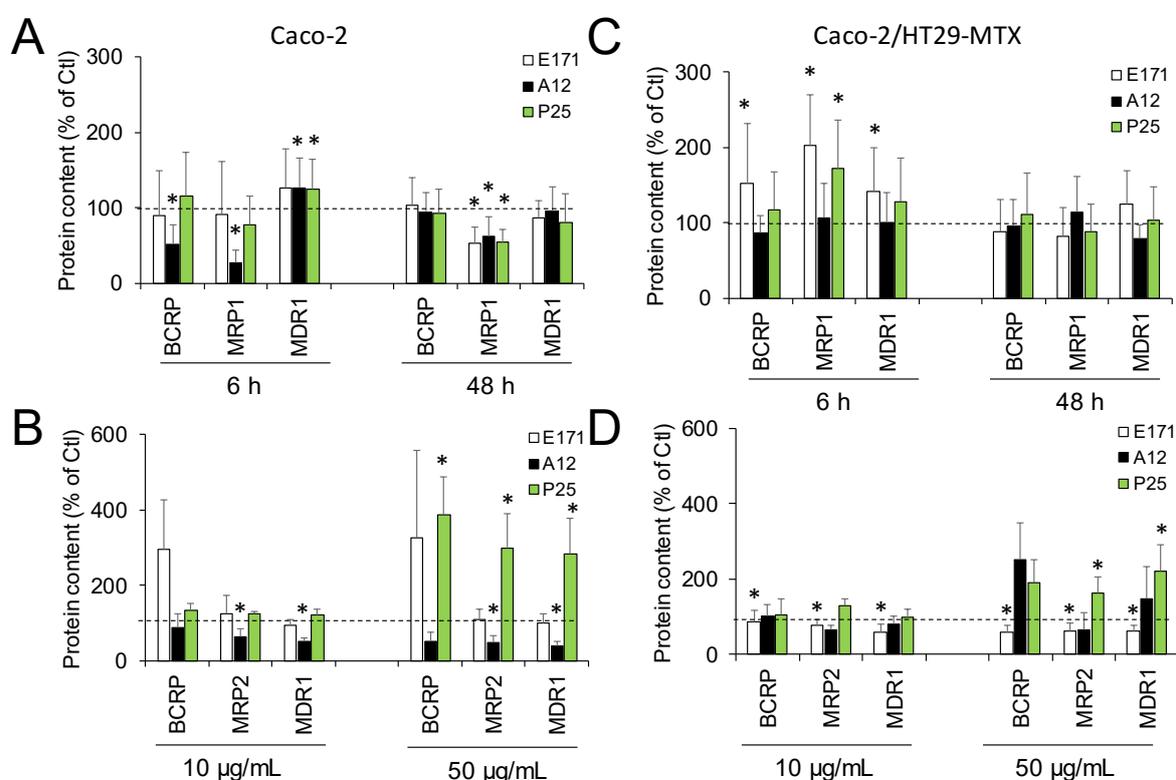


Figure 3. Impact of E171 and  $\text{TiO}_2$ -NPs on ABC transporter protein content. Proteins contents were quantified by Western Blot. Caco-2 monoculture (A-B) and Caco-2/HT29-MTX coculture (C-D), were either acutely exposed to E171, A12 and P25 at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 6 h and 48 h (A-C) or chronically exposed to E171, A12 and P25 at 10 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B-D), Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells); mean  $\pm$  standard deviation; statistical significance \* $p < 0.05$  exposed vs control,  $n = 4$ .

At the gene expression level, only very moderate modulations were observed with RT-qPCR. Acute exposure of Caco-2 cells to E171, for 48 h, induced downregulation of *MRP1* and *MDR1* (figure 4A). Downregulation of *MDR1* was still observed after chronic exposure of these cells to E171 (figure 4B). Conversely acute exposure of

this monoculture to A12 induced downregulation of *MRP2* (figure 4A); chronic exposure to this NP induced downregulation of *MRP1* (at 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$ ), *MDR1* and *MRP2* (at 50  $\mu\text{g/mL}$  only) and a slight upregulation of *MDR1* (at 10  $\mu\text{g/mL}$ ) (figure 4B). In the Caco-2/HT29-MTX coculture, acute exposure to E171 induced up- then down-regulation of *MDR1* at 6 h and 48 h, respectively (figure 4C). At 48 h, P25 induced downregulation of *MRP2* and *MDR1* (figure 4C). No gene expression modulation was observed on the Caco-2/HT29-MTX coculture when chronically exposed to E171 and  $\text{TiO}_2$ -NPs (figure 4D).

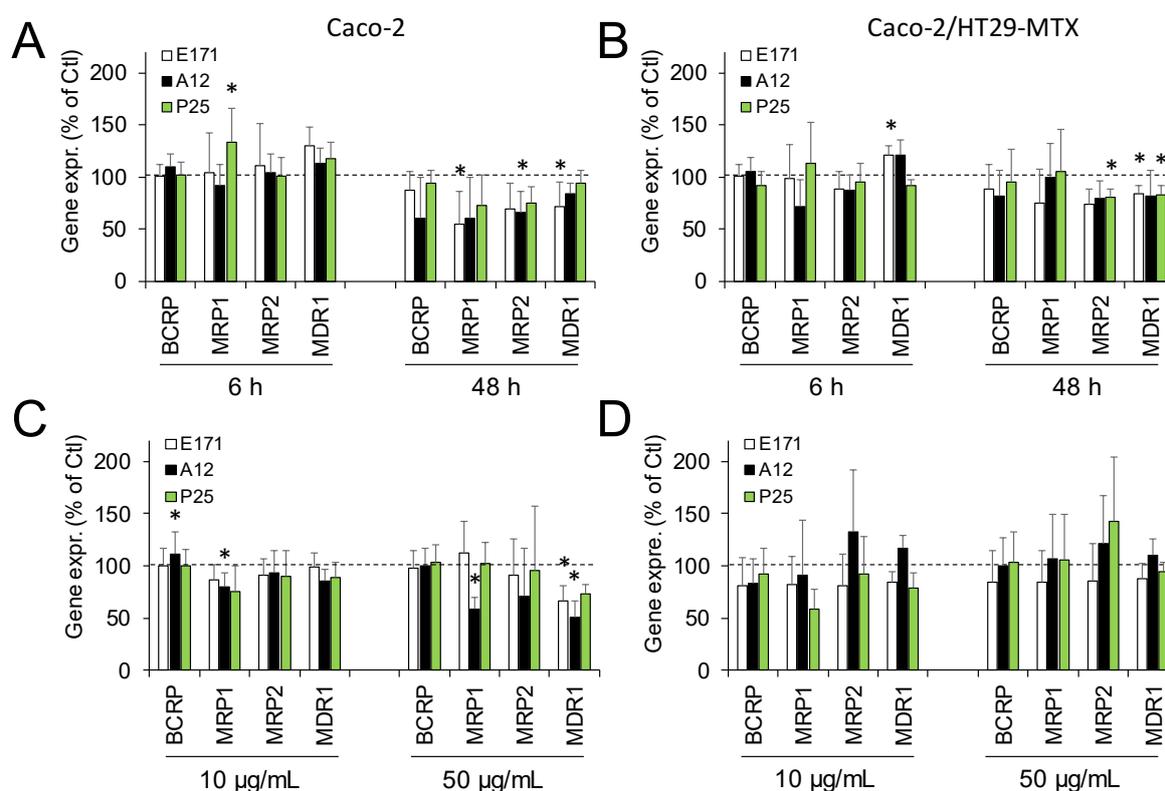


Figure 4. Impact of E171 and  $\text{TiO}_2$ -NPs on the mRNA expression of ABC transporters. The mRNA expression of 4 ABC transporters involved in xenobiotic efflux from the cell were measured by RT-qPCR: breast cancer resistance protein (BCRP), multidrug resistance-associated proteins 1 and 2 (MRP1, MRP2), multidrug resistance 1 (MDR1). Caco-2 monoculture (A-B) and Caco-2/HT29-MTX coculture (C-D), were either acutely exposed to E171, A12 and P25 at 50  $\mu\text{g/mL}$  for 6 h and 48 h (A-C) or chronically exposed to E171, A12 and P25 at 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$  (B-D). Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells); mean  $\pm$  standard deviation, statistical significance \* $p < 0.05$  exposed vs control,  $n = 3$ .

### Induction of inflammation by E171 and TiO<sub>2</sub> particles

In order to obtain a broad view of the release of cytokines and chemokines that would be impacted by exposure to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs, we used the the BioPlex MagPix™ technology to screen the content of 26 cytokines. The release of these markers was measured in Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cells, exposed to E171 and A12-NPs at 50 µg/mL, either acutely for 48 h or chronically for 21 days (figure 5A). These cytokines were classified with respect to their function, i.e. interleukins (IL-1β, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 17A), chemokines (IL-8, eotaxin, RANTES, IP-10, MCP-1, MIP-1β), tumor necrosis factor family (TNF-α), interferons (IFN-γ), colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF) and growth factors (PDGF-BB, bFGF and VEGF). The most important changes were observed in the Caco-2/HT29-MTX cell model, with 21 cytokines or chemokines with significantly modulated release in at least one exposure condition. The fold-changes ranged from 0.23 to 10.90 in exposed cells as compared to control cells.

Conversely the Caco-2 monoculture was less impacted, suggesting that the presence of mucus-secreting cells increased the sensitivity of the model. In the Caco-2 monoculture, only 12 cytokines showed significantly modulated release in at least one exposure condition, with lower fold-changes, which ranged from 0.30 to 0.90 (Figure 5A). A12 was the most impacting particle; it significantly reduced the release of 21 cytokines. The only cytokine with increased release was IL1-β, in the chronically exposed Caco-2/HT29-MTX coculture. The fold-change was 2.02. E171 modulated the release of 17 cytokines, the release of 8 of them being increased: IL-1β (fold-change 10.91), IL-9 (fold-change 1.37), IL-15 (fold-change 1.64), IL-17A (fold-change 3.77), eotaxin (fold-change 3.02), RANTES (fold-change 2.13), TNF-α ((fold-change 1.38) and bFGF (fold-change 3.07) while the release of the 9 other ones was decreased (IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, PDGF-bb, IP-10) (figure 5A).

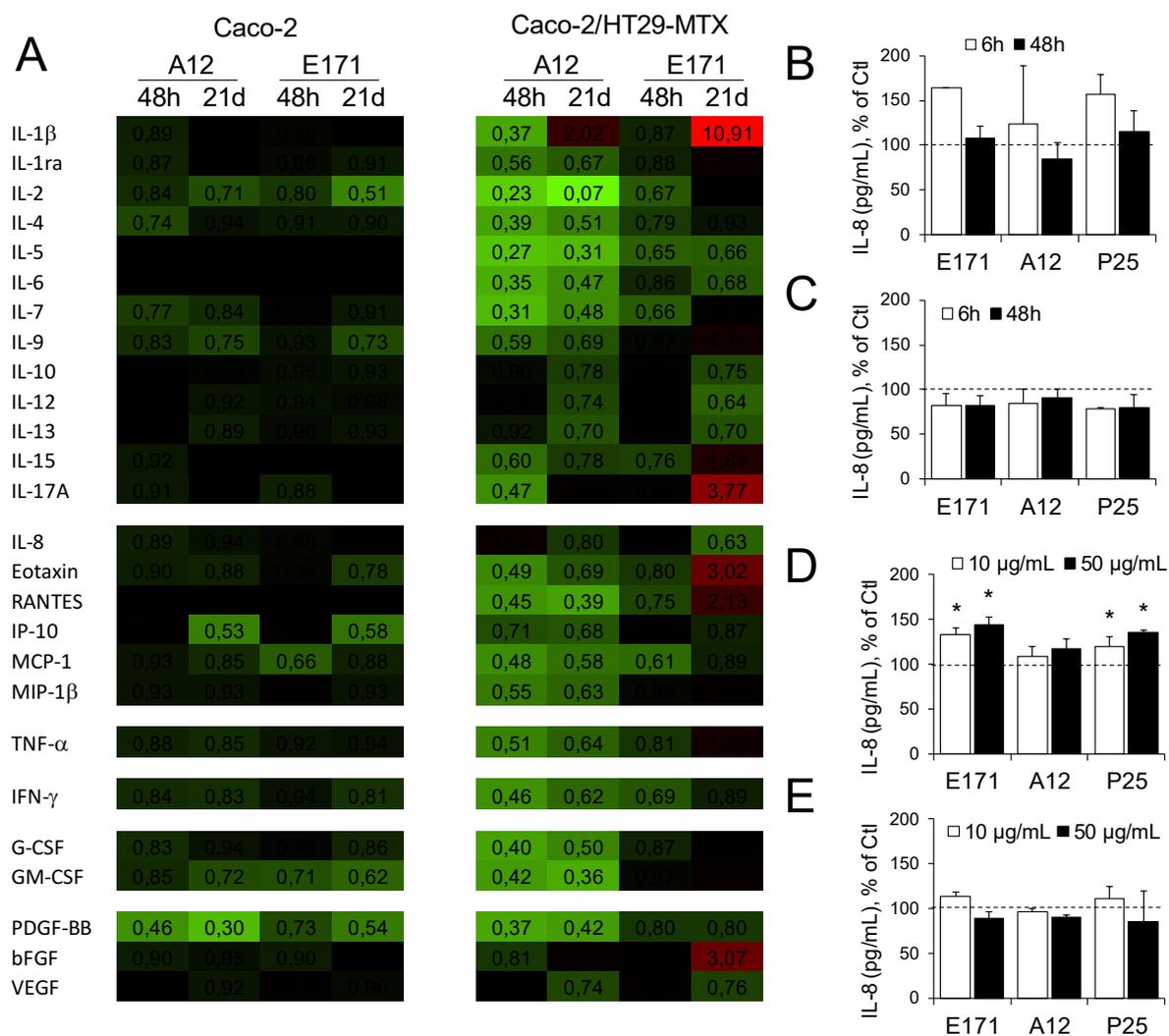


Figure 5. Inflammatory response to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs. (A) The BioPlex MagPix<sup>TM</sup> technology was used to screen the cells content of 26 cytokines, i.e. interleukins (IL-1 $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 17A), chemokines (IL-8, eotaxin, RANTES, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor family (TNF- $\alpha$ ), interferons (IFN- $\gamma$ ), colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF) and growth factors (PDGF-BB, bFGF and VEGF). Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX were exposed to E171 and A12 at 50  $\mu$ g/mL, either acutely for 48 h or chronically for 21 days. Results represent fold-change vs unexposed cells; color scale from light green to black (0 to 1) and from black to light red (1 to 11). (B-E) IL-8 secretion measured by ELISA in acutely-exposed (B-C) or chronically-exposed (D-E) Caco-2 (B, D) or Caco-2/HT29-MTX (C, E) cells. Fold-change vs control; mean  $\pm$  standard deviation; statistical significance \* $p$ <0.05 exposed vs control,  $n$ =3.

To validate these results, the release of the pro-inflammatory cytokine IL-8 was monitored by ELISA following acute (figure 5B-C) and chronic (figure 5D-E) exposure to E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs at 10 and 50  $\mu$ g/mL. In the Caco-2 monoculture, the level of IL-8 in control cells was 7.9 $\pm$ 0.6 pg/mL. It slightly increased to 10.4 $\pm$ 0.8 pg/mL and 11.3 $\pm$ 0.2 pg/mL following chronic exposure to E171 at 10 and 50  $\mu$ g/mL,

respectively, and to  $9.4 \pm 1.3$  pg/mL and  $10.6 \pm 1$  pg/mL following chronic exposure to P25 at 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. No significant change was observed in cells exposed to A12. In the Caco-2/HT29-MTX coculture, the level of IL-8 in control cells was much higher, with values reaching  $4483.1 \pm 850$  pg/mL. No significant change was observed when acutely and chronically exposed to E171 and  $\text{TiO}_2$ -NPs.

At the gene expression level, moderate regulations were observed with RT-qPCR. In the chronically-exposed Caco-2 monoculture, A12 and P25 down-regulated *IL-8* at 50  $\mu\text{g/mL}$  and 10  $\mu\text{g/mL}$  respectively (figure 6A). No significant changes were observed following exposure to E171 food additive. Conversely, in the Caco-2/HT29-MTX coculture, some genes were up-regulated: E171 up-regulated the expression of *TNF- $\alpha$* , both at 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$ , A12 up-regulated the expression of *IL-8* and *IL-1 $\beta$*  at 10  $\mu\text{g/mL}$ , *IL-1 $\beta$*  and *TNF- $\alpha$*  at 50  $\mu\text{g/mL}$ , and P25 up-regulated the expression of *IL-8* and *IL-1 $\beta$*  both at 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$  (figure 6C). In acutely-exposed Caco-2 monoculture, P25 up-regulated the expression of *TNF- $\alpha$*  (6 h and 48 h) (figure 6B). In the Caco-2/HT29-MTX coculture, A12 up-regulated the expression of *IL-1 $\beta$*  (6 h) (figure 6D).

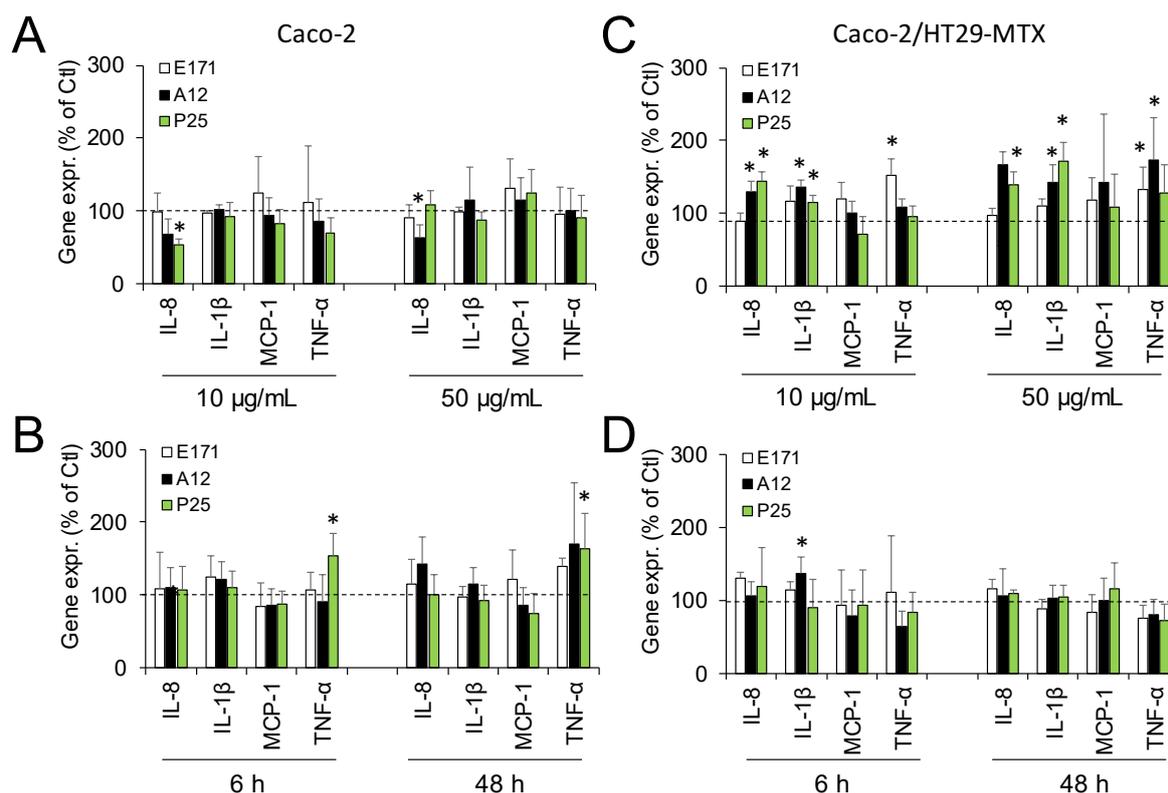


Figure 6. Impact of E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs on the mRNA expression of cytokines. The mRNA expression of 4 cytokines involved in pro-inflammatory response were measured by RT-qPCR: Interleukin 8 (IL-8), Interleukin 1β (IL-1β), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1/CCL2), Tumor necrotic factor α (TNF-α). Caco-2 monoculture (A-B) and Caco-2/HT29-MTX coculture (C-D), were either chronically exposed to E171, A12 and P25 at 10 and 50 μg/mL (A-C) or acutely exposed to E171, A12 and P25 at 50 μg/mL for 6 h and 48 h (B-D). Results are expressed as fold increase above the control (unexposed cells); mean ± standard deviation, statistical significance \*p<0.05 exposed vs control, n=3.

## Discussion

We aimed here at evaluating the impact of E171 on the barrier function of the intestine. More specifically we addressed its impact on mucus secretion, epithelial integrity, ABC transporter expression and inflammatory response. To this purpose, two *in vitro* cell models, representative of the human intestine, were exposed to 10-100 μg/mL of E171 or TiO<sub>2</sub>-NPs using either an acute or a chronic exposure regimen.

We observe an increased glycoprotein and/or glycolipid content in TiO<sub>2</sub>-exposed Caco-2/HT29-MTX coculture, which reflects increased mucus secretion and/or increased glycoprotein content in the mucus. Conversely, at the mRNA level, chronic exposure to 50 μg/mL of E171 do not cause mucin overexpression, and even

led to decreased mRNA expression of *MUC1*. Noteworthy, mucin genes are expressed well before proteins are secreted and detectable in the cell culture medium. This latency period is devoted to the different stages of mucin biosynthesis: dimerization, glycosylation, multimerization, and intracellular storage in mucus vacuoles before their secretion (Gouyer *et al.*, 2001). Our observation suggests that TiO<sub>2</sub> particles rather alter mucus protein folding or post-translational modification during this stage than overall mucus secretion. According to Heazlewood *et al.*, (2008), aberrant assembly and folding of secreted mucins lead to their malfunction or accumulation and degradation within the ER. This may cause substantial ER stress, morphological goblet cell pathology, premature goblet cell apoptosis, and potential development of chronic intestinal inflammation (Heazlewood *et al.*, 2008). Interestingly we previously reported alteration of ER homeostasis in TiO<sub>2</sub>-exposed intestinal cells using the same cell models, particles and exposure regimen (Dorier *et al.*, submitted), which may rely on the impaired mucin folding that we suspect here. Change in the number of acidic groups, acid-rich glycoproteins and sulphated glycoprotein were described in various intestinal disease conditions (Lev and Spicer, 1965; MacAdam, 1993). Moreover, *TFF3*, which is implicated in mucus rheological properties, is downregulated in Caco-2/HT29-MTX exposed to P25 TiO<sub>2</sub>-NPs. This would lead to porous mucus, as previously reported (Mashimo *et al.*, 1996; McGuckin *et al.*, 2009; Taupin *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1997). Conversely its upregulation in the Caco-2 monoculture chronically exposed to E171 may suggest potentiation to gastric ulceration and inflammatory disease (Thim *et al.*, 2002). Finally, in Caco-2/HT29-MTX, chronic exposure to E171 and TiO<sub>2</sub>-NP downregulate KLF4, which regulates intestinal cell proliferation and goblet cell differentiation (Clevers, 2006). Interestingly, reduction of the number of goblet cells have been observed in mice exposed to E171 by intragastric administration (Urrutia-Ortega *et al.*, 2016). This may be via altered expression of KLF4. Increased mucus formation is characteristic of Crohn's disease, whereas ulcerative colitis is usually characterized by a reduction of goblet cell number and a diminished mucus barrier (Dvorak *et al.*, 1980; McGuckin *et al.*, 2009; Trabucchi *et al.*, 1986).

Regarding MUC1 more specifically, its overexpression was reported to decrease oxidative stress by decreasing intracellular ROS and up-regulating anti-oxidant enzymes (Yin *et al.*, 2003). Downregulation of MUC1 would thus be implicated in the accumulation of ROS that we previously reported (Dorier *et al.*, submitted). MUC1 also leads to increased resistance to chemotherapeutic drugs by upregulating ABC transporters via the Akt pathway or as a direct transcriptional regulator of MRP1 gene (Nath *et al.*, 2013). Increased expression of these transporters would occur secondary to mucin depletion and mucus layer alteration (Meijer *et al.*, 1999). We observe here significant, although moderate, modulation of the expression of some ABC transporters that may be linked to modulation of MUC1 expression. While these transporters confer chemotherapeutic drug resistance when overexpressed in human tumors, decreased mRNAs levels of these transporters were described in mucosal biopsies of patients with active IBD (Englund *et al.*, 2007; Nath and Mukherjee, 2014). Modulation of their expression in TiO<sub>2</sub>-exposed cells would lead to modified susceptibility to IBD and/or modified sensitivity to xenobiotics and chemotherapeutic drugs. Lastly, MUC1 is reported to show either an anti-inflammatory function during infectious or an inflammatory role in cancer cells disease (Guang *et al.*, 2010; Nath and Mukherjee, 2014). In TiO<sub>2</sub>-exposed cells, we do not observe a massive inflammatory response, but rather slight regulation of several inflammatory markers. We mostly observe decreased cytokine secretion, except for IL-1 $\beta$ , IL-17A, Eotaxin, RANTES, bFGF which are upregulated in the Caco-2/HT29-MTX model. This modulation of cytokines secretion, both at the gene and protein levels, may in turn be linked with mucus alteration. Indeed, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  regulate mucin synthesis and exocytosis (D. Ahn *et al.*, 2005; M.-H. Ahn *et al.*, 2005; Cornick *et al.*, 2015; Enss *et al.*, 2000). IL-4 and IL-13 are important inducers of MUC2, MUC5A and TFFs gene expression both *in vitro* and *in vivo*, through activation of NF- $\kappa$ B via the MAPK and STAT6 pathways (Blanchard *et al.*, 2004; Iwashita *et al.*, 2003). Finally, IL-10, which is an anti-inflammatory cytokine, protects the intestinal barrier by inhibiting ER stress and protein misfolding, as well as maintaining integrity of the mucus layer (Shkoda *et al.*, 2007).

The impact reported here for E171 differs from that of TiO<sub>2</sub>-NPs. Moreover, the effects of A12 differ from those of P25. Therefore, from these data, we cannot definitely conclude on the implication of NPs in the toxicological effects of E171. Moreover, most of the effects reported here are more intense in the Caco-2/HT29-MTX coculture than in the Caco-2 monoculture, as also previously reported (Brun *et al.*, 2014; Dorier *et al.*, submitted). This may be due to higher accumulation of TiO<sub>2</sub> particles in Caco-2/HT29-MTX cells than in Caco-2 monoculture, as previously reported (Brun *et al.*, 2014), that itself may be linked to the presence of mucus in the coculture model. Although the mucus layer is supposed to ensure host protection against external aggression, depending on their surface physical chemistry particles may interact or not with the mucus (Mercier-Bonin *et al.*, 2016; Ponchel and Irache, 1998). They may get trapped in the mucus, or cross the mucus layer. This would lead to prolonged residence time for particles in the membrane-bound layer of mucus that would subsequently serves as a reservoir of particles that may progressively be released and therefore constantly expose the underlying epithelium.

## Conclusion

In summary, we show here that E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs particles induce moderate but significant dysregulations of multiple markers related to the intestinal barrier function. These markers are linked with mucus secretion and composition, epithelial cell function and inflammatory response, all of them being somehow linked together. Exposure to TiO<sub>2</sub> may modify the composition and rheology of mucus and reduce mucus secretion by impairing intestinal cell proliferation and goblet cell differentiation. It modulates the expression of ABC transporters and therefore intestinal susceptibility to xenobiotics and resistance to chemotherapeutic drugs. The inflammatory response is moderate although significant. All these dysregulations would probably modulate the fine balance of intestinal homeostasis, therefore the implication of E171 in the development or aggravation of inflammatory bowel diseases and other intestinal pathologies would deserve more attention.

## Supplementary data

	Forward primer	Reverse primer
<b>Mucus</b>		
<b>TFF3</b>	5'-AGG-AGT-ACG-TGG-GCC-TGT-CT-3'	5'-AAG-GTG-CAT-TCT-GCT-TCC-TG-3'
<b>MUC1</b>	5'-AGA-CGT-CAG-CGT-GAG-TGA-TG-3'	5'-CAG-CTG-CCC-GTA-GTT-CTT-TC-3'
<b>KLF4</b>	5'-ATG-TGT-AAG-GCG-AGG-TGG-TC-3'	5'-CCC-ACA-CAG-GTG-AGA-AAC-CT-3'
<b>MUC12</b>	5'-ACC-TTA-GCA-CCA-GGG-TTG-TG-3'	5'-GGA-GGA-TGC-GTC-ATT-CAT-CT-3'
<b>MUC17</b>	5'-TGC-AGA-ACA-GGA-CCT-CAG-TG-3'	5'-AGG-TCA-TCT-CAG-GGT-TGG-TG-3'
<b>ABC transporters</b>		
<b>MDR1</b>	5'-GCC-AAA-GCC-AAA-ATA-TCA-GC-3'	5'-TTC-CAA-TGT-GTT-CGG-CAT-3'
<b>BCRP</b>	5'-TGC-AAC-ATG-TAC-TGG-CGA-AGA-3'	5'-TCT-TCC-ACA-AGC-CCC-AGG-3'
<b>MRP1</b>	5'-GGG-CTG-CGG-AAA-GTC-GT-3'	5'-AGC-CCT-TGA-TAG-CCA-CGT-G-3'
<b>MRP2</b>	5'-TGA-GCA-AGT-TTG-AAA-CGC-ACA-T-3'	5'-AGC-TCT-TCT-CCT-GCC-GTC-TCT-3'
<b>Inflammation</b>		
<b>IL-8</b>	5'-TGG-CAG-CCT-TCC-TGA-TTT-CT-3'	5'-ATT-TCT-GTG-TTG-GCG-CAG-TG-3'
<b>IL-18</b>	5'-CTC-GCC-AGT-GAA-ATG-ATG-GCT-3'	5'-TAG-GTC-GAT-GCT-TAG-AGG-CTG-3'
<b>MCP-1</b>	5'-CAT-TGT-GGC-CAA-GGA-GAT-CTG-3'	5'-TTC-GTT-TCC-CTT-TGA-GGC-TTC-3'
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5'-GGC-GTG-GAG-CTGA-GAG-ATA-AC-3'	5'-GGT-GTG-GGT-GAG-GAG-CAC-AT-3'

Table S1. Primer sequences for qPCR experiments.

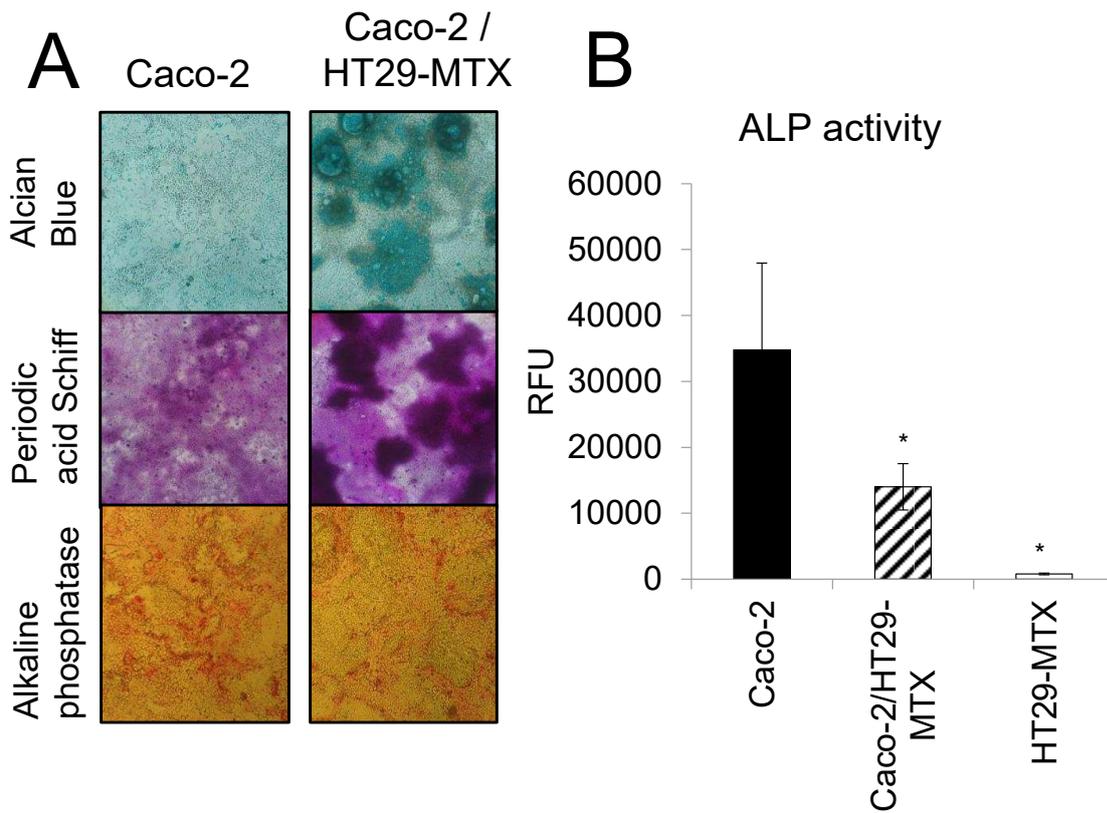


Figure S1. Cell model characterization. (A) Mucus staining obtained with Alcian Blue and Periodic Acid Schiff, alkaline phosphatase staining obtained using Fast-Red, in Caco-2/HT29-MTX coculture compared to Caco-2 cells. (B) Alkaline phosphatase activity measured in Caco-2 monoculture, Caco-2/HT29-MTX coculture and HT29-MTX monoculture after 21 days of differentiation. Mean fluorescence  $\pm$  standard deviation; statistical significance \* $p < 0.05$  exposed vs control,  $n = 3$ .

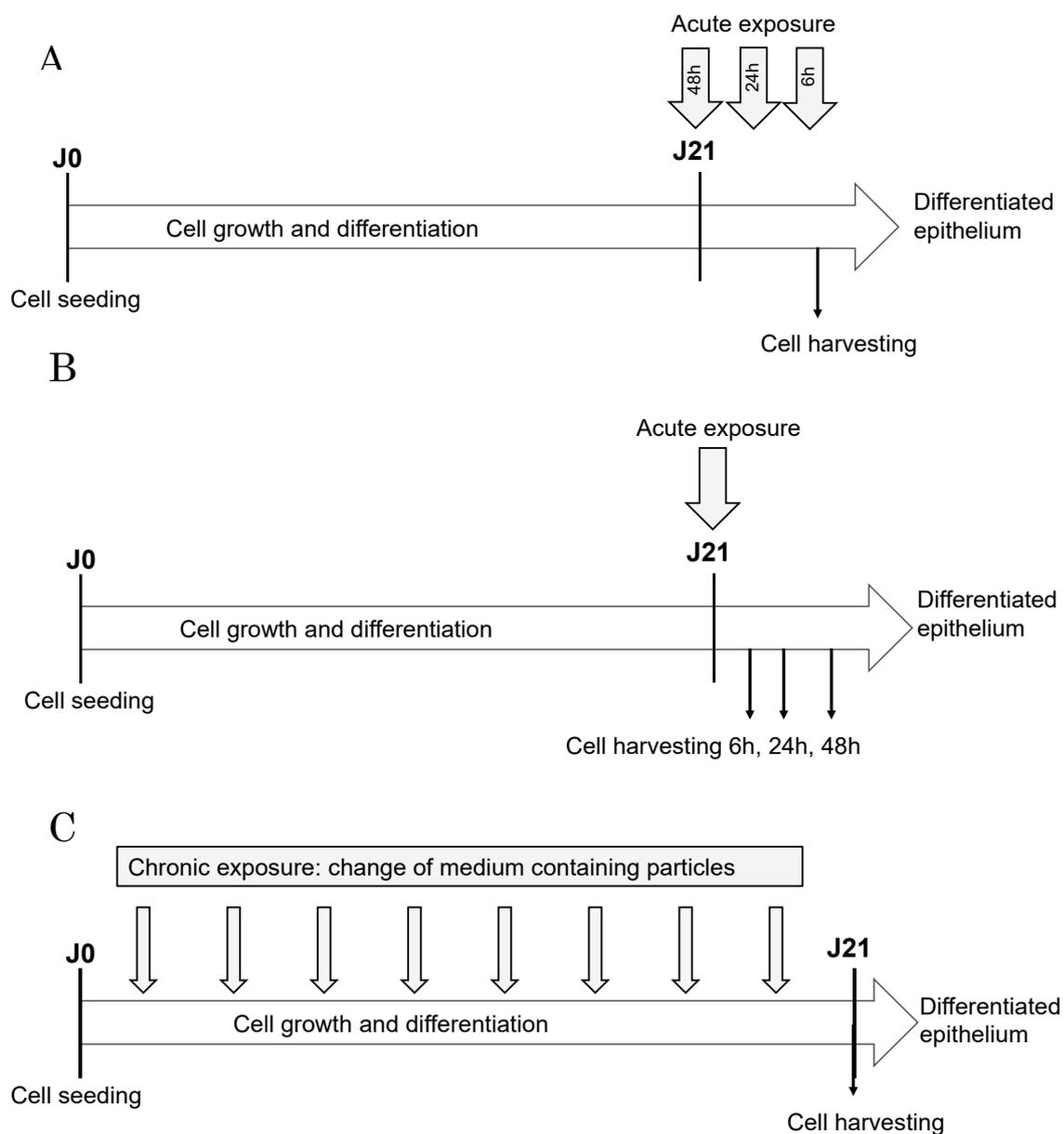


Figure S2. Exposure protocols. (A-B) Acute exposure: differentiated cells were exposed to particles for 6 h or 48 h, 21 days after seeding. Cells were either exposed at different time and harvested at the same time (A) or exposed at the same time and harvested at different times (B). (C) Chronic exposure: cells were exposed to particles the day after their seeding, then repeatedly three times per week for 21 days, i.e. eight times from seeding to harvesting, by renewing the culture medium containing TiO<sub>2</sub> particles.

### 3. Résultats complémentaires, sécrétion du mucus

Nous avons cherché à quantifier certaines protéines entrant dans la composition de la couche de mucus, afin d'évaluer si, au-delà de la quantité de mucus, l'exposition au colorant E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub> pouvait modifier la composition de celui-ci. Dans les premiers essais, nous avons tenté de quantifier deux mucines, MUC1 et MUC4 (Johansson *et al.*, 2013), après l'exposition des cellules Caco-2/HT29-MTX et HT29-MTX au colorant E171 à 50 µg/mL. Ces essais n'ont pas été concluants.

Nous avons donc imaginé réaliser une étape préalable aux quantifications par Western Blot qui consistait à traiter les cellules avec un antibiotique, la bréfeldine A ou la tunicamycine, connus pour bloquer le transport des mucines et empêcher leur sécrétion. La bréfeldine A bloque le transport des protéines entre les différents organites (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique) et la membrane cellulaire (Klausner, 1992). La tunicamycine quant à elle bloque la N-glycosylation et indirectement la O-glycosylation des protéines, c'est à dire l'ajout des sucres sur les chaînes d'asparagine, entraînant ainsi leur rétention dans le réticulum endoplasmique de la cellule. Elle a aussi pour effet de bloquer le transport intracellulaire des protéines (Garlatti and Barouki, 2002; Shah, 2009).

La cytotoxicité de ces antibiotiques sur les lignées cellulaires Caco-2 et HT29-MTX a été évaluée par le test MTT après 48 h de traitement, de manière à identifier une dose qui bloque efficacement le transport des protéines sans pour autant entraîner de mortalité cellulaire. Pour ces tests les cellules sont à 100% de confluence mais ne sont pas différenciées. Les résultats des tests de cytotoxicité sont présentés dans la figure 62, pour la lignée Caco-2 et dans la figure 63 pour la lignée HT29-MTX.

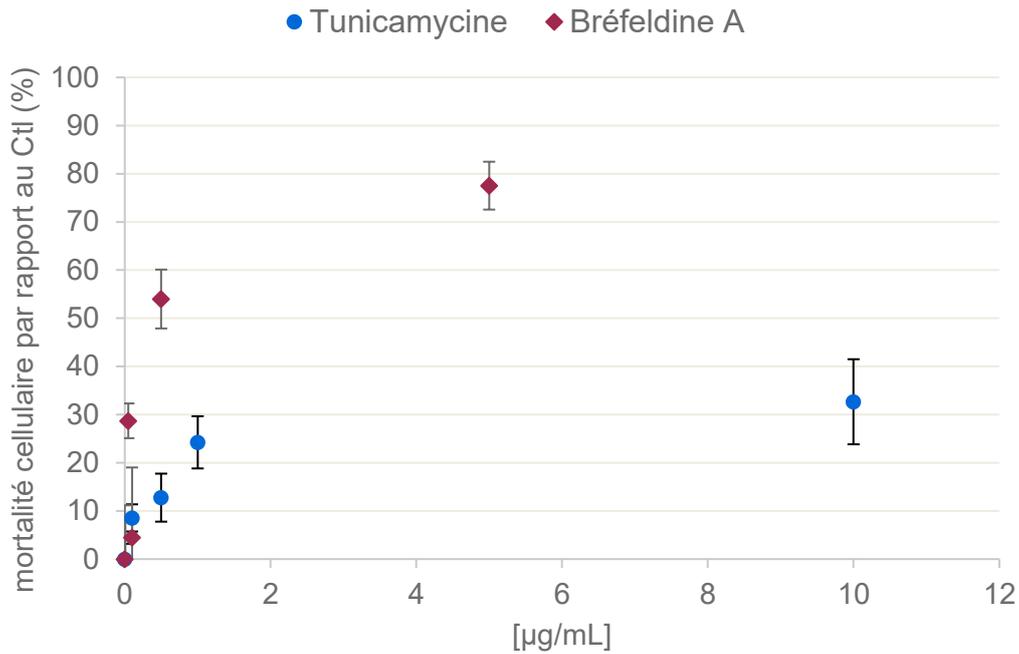


Figure 62 : Cytotoxicité des antibiotiques inhibiteurs de la sécrétion des protéines sur la lignée cellulaire Caco-2. Exposition à la bréfeldine A [0-5 µg/mL] pendant 48 h sur les cellules Caco-2 à 100 % confluence (losange violet). Exposition à la tunicamycine [0-10 µg/mL] pendant 48 h sur les cellules Caco-2 à 100 % confluence (rond bleu).

Les résultats après traitement à la bréfeldine A montrent que, sur la lignée Caco-2, la toxicité est de 30 % pour 0,05 µg/mL (DL30) et pour 0,5 µg/mL elle atteint 55-60 % (figure 62). Sur la lignée HT29-MTX il y a 20 % (DL20) de toxicité à 0,05 µg/mL d'antibiotique et la toxicité maximale est de 60 % à 0,5 µg/mL (figure 63). Les résultats après traitement à la tunicamycine montrent que sur la lignée Caco-2 la toxicité est de 20 % à 1 µg/mL puis elle atteint un plateau à 30 % pour 10 µg/mL (figure 62). Sur la lignée HT29-MTX la toxicité maximale atteint un plateau à 20 % (DL20) de toxicité pour 10 µg/mL d'antibiotique (figure 63).

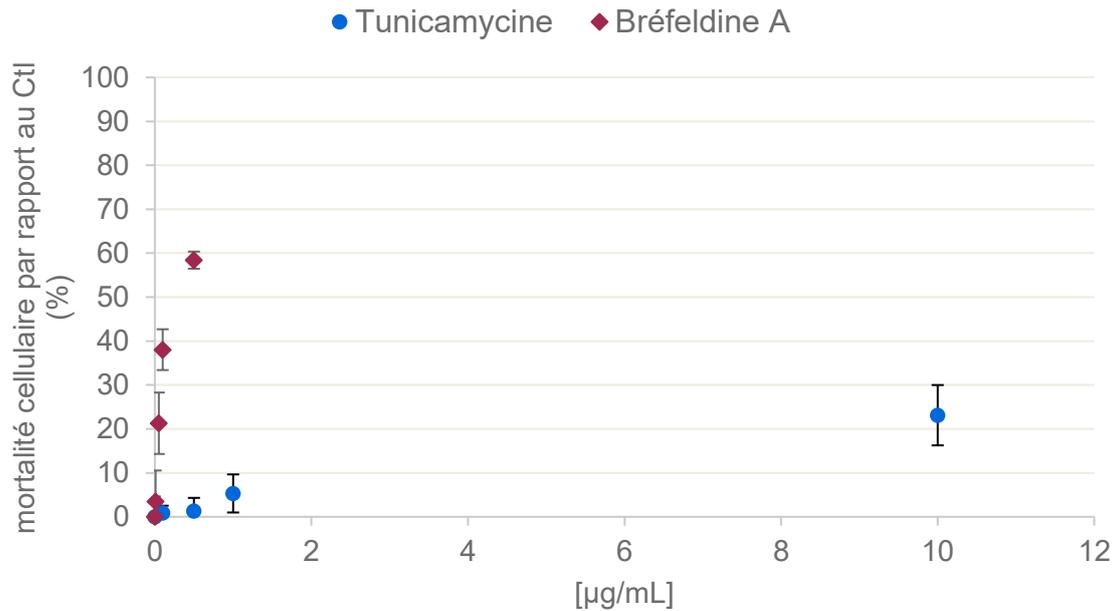


Figure 63 : Cytotoxicité des antibiotiques inhibiteurs de la sécrétion des protéines sur la lignée cellulaire HT29-MTX. Exposition à la bréfeldine A [0-0,5 µg/mL] pendant 48 h sur les cellules HT29-MTX à 100 % confluence (losange violet). Exposition à la tunicamycine [0-10 µg/mL] pendant 48 h sur les cellules HT29-MTX à 100 % confluence (rond bleu).

D'après la littérature, les effets bloqueurs de la sécrétion de mucus de ces antibiotiques sont visibles dès 0,1 µg/mL pour la bréfeldine A et dès 0,3 µg/mL pour la tunicamycine (Paszkievicz-Gadek *et al.*, 2006). Ces concentrations sont bien en dessous de la DL20 des deux antibiotiques dans nos conditions d'exposition. Nous avons donc utilisé ces concentrations pour traiter les cellules.

Les résultats obtenus (figure 64) montrent que ce traitement des cellules à la bréfeldine A à 0,1 µg/mL pendant 48 h n'induit pas l'augmentation du contenu protéique en MUC1 et MUC4 dans le modèle Caco-2/HT29-MTX, ni de MUC1 dans le modèle HT29-MTX. Seulement MUC4 est augmenté dans le modèle HT29-MTX. Le traitement à la Bréfeldine A ne semble pas approprié ici. Ces mêmes essais doivent être réalisés avec la tunicamycine.

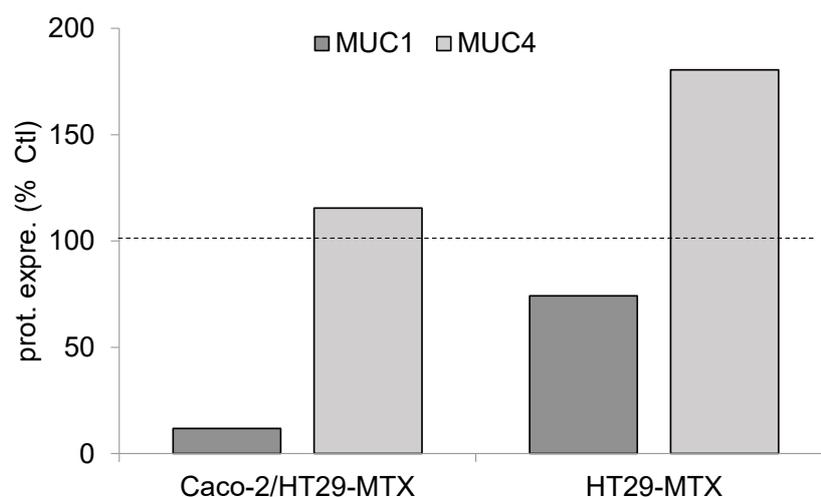


Figure 64 : Résultats préliminaires obtenus par Western Blot pour la quantification des mucines MUC1 et MUC4. Le modèle Caco-2/HT29-MTX ainsi que les cellules HT29-MTX ont été cultivées 21 jours puis exposées à la bréfeldine A à 0,1  $\mu\text{g/mL}$  pendant 48 h.

#### 4. Conclusion

Dans les modèles cellulaires Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX différenciés, le colorant alimentaire E171 et les NPs de  $\text{TiO}_2$  impactent de façon modérée mais significative la fonction de barrière intestinale. Ils induisent la dérégulation de nombreux marqueurs impliqués dans cette fonction, liés à la sécrétion et la composition de la couche de mucus, aux transports de xénobiotiques à travers l'épithélium intestinal, et à la réponse inflammatoire. Ces marqueurs semblent d'une certaine manière étroitement liés, par des mécanismes encore méconnus.

L'ensemble des effets observés est susceptible de moduler l'homéostasie intestinale et notamment la capacité qu'il a à se défendre contre les agressions extérieures. L'ingestion de micro- et nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  semble être l'un des facteurs environnementaux à prendre en considération comme pouvant aggraver les symptômes de la maladie chez les personnes souffrant de MICI.

En effet, comme cela a déjà été soulevé dans le chapitre 4 de cette thèse, les effets observés ne semblent pas uniquement attribuables à la part nanométrique des particules du E171.

## *Conclusion sur l'impact de la fonction de barrière*

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que le colorant E171 exerce un effet, bien que modéré, sur la barrière intestinale. En effet, les résultats antérieurs obtenus avec des NPs de TiO<sub>2</sub>, anatase et rutile, avait déjà montré qu'une exposition aiguë aux particules entraînait une surexpression des transporteurs ABC dans le modèle Caco-2. Dans l'étude du colorant E171, nous montrons qu'il augmente la sécrétion de mucus et modifie sa composition, il modifie également l'expression des transporteurs ABC et provoque une modification de la sécrétion de marqueurs liés à l'inflammation. En revanche, l'exposition au colorant n'impacte pas l'intégrité des épithélia Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX.

Ces résultats sont principalement observés après les expositions chroniques aux particules, alors que l'exposition aiguë entraîne moins d'effets. D'autre part les résultats obtenus avec A12 diffèrent de ceux obtenus avec P25, prouvant que la taille n'est pas le seul paramètre influençant l'impact des particules de TiO<sub>2</sub> sur la fonction de barrière.

Le colorant E171 est un élément, parmi tant d'autres, susceptible d'impacter la barrière intestinale. Chez les personnes saines, cette barrière est performante alors que chez les personnes souffrant des MICI, l'épithélium intestinal est enflammé de façon chronique, la fonction de barrière de leur intestin est altérée et le système immunitaire répond de manière disproportionnée. C'est pourquoi, pour ces personnes, l'introduction de particules minérales et notamment de NPs, comme celles contenues dans le colorant E171 ou E551, est susceptible d'aggraver l'inflammation, et les symptômes de la maladie. La réglementation concernant l'étiquetage, le nombre, la taille des particules qui composent ces additifs alimentaires est en train de changer, lentement, mais la prise de conscience des consommateurs et l'augmentation du nombre d'études s'intéressant à l'ingestion des NPs, sont aussi là pour rappeler aux entités réglementaires le besoin de transparence et de faire changer les choses.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

### *Discussion méthodologique*

A propos des particules

Par souci de réalisme, les études ont été menées avec un lot d'additif E171 commercial, utilisé par les industriels et présent dans les produits alimentaires. Les particules de TiO<sub>2</sub> présentent un diamètre variable, elles sont à la fois de taille micro et nano-particulaire, avec 47 % de NPs dans la poudre E171-A utilisée ici. Cette poudre contient une quantité de NPs parmi les plus élevées de celles rapportées dans la littérature, i.e., entre 10 et 43,7 % de NPs (Chen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014; Weir *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). Alors que le micro TiO<sub>2</sub> est supposé inerte et peu réactif, les NPs sont utilisées pour leur plus grande réactivité du fait du grand rapport surface/volume (INRS, 2013; Shi *et al.*, 2013). Mais de ce fait, elles sont généralement considérées comme étant plus toxiques que des particules de taille plus grande (Oberdörster *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2013). C'est pourquoi alors que le E171 est autorisé depuis le début des années 60, des questions se posent aujourd'hui quant à sa toxicité. En plus d'évaluer l'impact de ce colorant sur les cellules, nous voulions évaluer si ces effets étaient attribuables à la fraction nanométrique des particules. En parallèle du E171, nous avons donc étudié l'impact de deux NPs de TiO<sub>2</sub>. Tout d'abord les P25, qui font partie des NPs du JRC (NM-105) et qui étaient la NP de TiO<sub>2</sub> de référence dans le programme de tests de toxicité de nanomatériaux mené par l'OCDE depuis 2006<sup>40</sup>. Ces NPs sont très utilisées par les industriels pour des applications autre que l'agroalimentaire, notamment en photocatalyse (Ohno *et al.*, 2001). De nombreuses études nanotoxicologiques, *in vivo* et *in vitro* (Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011), sur des modèles pulmonaires (Armand *et al.*, 2016; Jagan *et al.*, 2011) ou intestinaux

---

<sup>40</sup> [www.ocde.org/chemicalsafety/nanosafety/testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm](http://www.ocde.org/chemicalsafety/nanosafety/testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm)

(Gerloff *et al.*, 2009; Koeneman *et al.*, 2009; McCracken *et al.*, 2013) se sont intéressées à leur toxicité et aux mécanismes associés. Contrairement au E171 qui est composé majoritairement de TiO<sub>2</sub> de structure cristalline anatase (>95 % pour les 5 lots testés dans le cadre de ce travail mais aussi dans la littérature (Weir *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014), P25 possède une structure cristalline mixte de 86 % d'anatase et 14 % de rutile ; en réalité cette poudre est constituée d'un mélange de NPs anatases et de NPs rutilés<sup>41</sup>. Nous avons donc utilisé une seconde NP, A12, elle aussi composée de TiO<sub>2</sub> mais de structure cristalline majoritairement anatase (>95 %). Ces NPs ne sont pas commerciales, elles sont élaborées par nos collaborateurs (Pignon *et al.*, 2008). Au vu des résultats divergents que nous obtenons entre E171 et A12, ainsi qu'entre A12 et P25, il semble que l'impact du colorant E171 ne soit pas uniquement attribuable à la fraction nanoparticulaire des particules. Il serait intéressant d'ajouter à notre étude une poudre de taille micrométrique afin de voir si les effets observés sont attribuables à la fraction micrométrique des particules ou si au contraire, la synergie des particules de tailles différentes, et la polydispersité du colorant en sont l'explication.

#### A propos des modèles cellulaires

Le premier modèle cellulaire que nous avons utilisé est le modèle Caco-2 en monoculture. Initialement utilisé en pharmacologie pour étudier le transport de molécules à travers l'épithélium intestinal, cette lignée cellulaire est également utilisée en toxicologie pour étudier l'impact des NPs sur la paroi intestinale (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Koeneman *et al.*, 2009; Mahler *et al.*, 2012; Tarantini *et al.*, 2015). Le modèle Caco-2 est représentatif d'un épithélium composé d'entérocytes. Lorsqu'elles se différencient, les cellules forment des jonctions cellulaires assurant l'intégrité de l'épithélium. Elles possèdent également des transporteurs membranaires de type SLC, qui sont principalement des transporteurs de nutriments, et des transporteurs de type ABC, qui sont des pompes d'efflux aux xénobiotiques. Elles expriment également des activités enzymatiques caractéristiques des entérocytes (Le Ferrec, 2001; Lea, 2015;

---

<sup>41</sup> Publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC\_86291/lbna26637enn.pdf

Rousset, 1986; Sambuy *et al.*, 2005). Ce modèle cellulaire est le plus simple et de ce fait il ne reproduit pas toutes les caractéristiques de la barrière intestinale.

C'est pour cela que nous avons utilisé un deuxième modèle cellulaire représentatif de l'épithélium intestinal, le modèle de coculture Caco-2/HT29-MTX qui est composé d'entérocytes et de cellules sécrétrices de mucus (Lesuffleur *et al.*, 1990; Walczak *et al.*, 2015). Lorsque les cellules se différencient, elles forment un épithélium recouvert d'une couche de mucus ayant un rôle protecteur. Cependant, il est possible que la couche de mucus puisse accumuler des particules et ainsi serve de réservoir de particules. En effet, selon la taille, la charge et d'autres caractéristiques physico-chimiques, les particules pourraient pénétrer la couche de mucus et interagir avec ses composants, jusqu'à atteindre l'épithélium sous-jacent (Mercier-Bonin *et al.*, 2016; Ponchel and Irache, 1998). Contrairement à l'épithélium composé uniquement de cellules Caco-2 qui possède une TEER très élevée, représentative d'un épithélium très jointif, le modèle composé de cellules Caco-2 et HT-29-MTX possède une TEER plus faible, car l'épithélium est moins jointif, compte tenu du fait que les cellules HT29-MTX forment moins de jonctions cellulaires (Lu *et al.*, 1996; Schimpel *et al.*, 2014; Srinivasan *et al.*, 2015). De plus, du fait de l'absence de microvillosités, les cellules HT29-MTX semblent accumuler davantage de NPs que les entérocytes, et sont potentiellement plus sensibles. Nous avons montré que les cellules HT29-MTX sécrètent une couche de mucus, qui est inhomogène, au sein de l'épithélium de coculture Caco-2/HT29-MTX. D'autre part, la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline prouve la présence des cellules Caco-2 différenciées.

Afin d'étudier l'impact du colorant E171 sur la réponse immunitaire de l'épithélium intestinal, nous avons mis en place et caractérisé un troisième modèle cellulaire. Celui-ci est représentatif des plaques de Peyer, bordant l'épithélium intestinal. Il est composé de cellules Caco-2(C1) et de lymphocytes RajiB, qui induisent la différenciation d'une partie des entérocytes en cellules M, caractéristiques de ces structures (des Rieux *et al.*, 2007). Ces cellules sont des sentinelles de l'immunité au sein de l'épithélium intestinal, elles sont aussi impliquées dans les mécanismes d'inflammation (Kernéis *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2007). Compte tenu de leur nature qui favorise la transcytose des antigènes de la

lumière intestinale vers l'intérieur de l'organisme et de l'absence de microvillosités à leur surface, les NPs de TiO<sub>2</sub> s'accumulent davantage dans les cellules M que dans les entérocytes (Brun *et al.*, 2014). Malheureusement, très peu d'expériences ont été menées sur ce modèle lors de ma thèse.

D'autre part, par souci de réalisme, nous avons d'abord étudié l'impact des particules sur des cellules différenciées. Compte tenu de nos résultats et de la littérature qui suggère que les cellules non différenciées sont plus sensibles, nous avons obtenu des résultats préliminaires sur les cellules non différenciées. Ces approches, i.e. différenciée vs. non différenciée, permettent également de modéliser l'impact des particules de TiO<sub>2</sub> sur l'épithélium intestinal dans plusieurs états physiologiques : des cellules bien différenciées déjà en place dans l'épithélium, mais aussi des cellules en cours de prolifération et de différenciation qui représentent l'épithélium en cours de renouvellement.

#### A propos du protocole de dispersion

Le protocole de dispersion qui est utilisé permet de réduire l'agglomération des NPs de TiO<sub>2</sub>, dans l'eau et dans le milieu d'exposition. Alors que les particules de E171 s'agglomèrent peu, ce n'est pas le cas des deux NPs de TiO<sub>2</sub> utilisées dans ce travail. Le même protocole a été utilisé pour mettre en suspension les trois particules de TiO<sub>2</sub> afin que les résultats soient comparables. En effet, il est possible que la sonication ait un effet sur la physico-chimie de surface des particules (abrasion, génération de ROS). Il convient donc de préparer tous les lots de la même façon. Les trois particules ont des diamètres théoriques différents, 160 nm, 12 nm, 24 nm pour E171, A12 et P25 respectivement. Après leur mise en suspension, le diamètre hydrodynamique mesuré par DLS dans l'eau augmente, il est de 415,4±69,5 nm (E171), 85±2,9 nm (A12) et 157,6±1,0 nm (P25), et augmente d'autant plus dans le milieu de culture, il est alors de 739,3±355,3 nm (E171), 447,9±0,3 nm (A12) et 439,9±6,7 nm (P25), montrant que les particules s'agglomèrent. Pour le E171, l'indice de polydispersité très élevé (0,48±0,071) même dans l'eau montre bien la dispersion de taille des particules. Des suspensions fraîches réalisées pendant les 21 jours de l'exposition chronique, et le suivi des diamètres hydrodynamiques par DLS ont permis de s'assurer de la

reproductibilité des suspensions. L'état d'agglomération qui est observé pour les NPs et pour le colorant alimentaire, laisse supposer que la macropinocytose pourrait jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes d'internalisation des particules.

#### A propos des concentrations et des modalités d'expositions aux particules de TiO<sub>2</sub>

Nous avons choisi d'exposer les modèles cellulaires à des doses croissantes de particules, allant de 10 µg/mL à 200 µg/mL. Les plus fortes concentrations, i.e. 100 et 200 µg/mL ont été utilisées uniquement pour étudier l'impact des particules sur la viabilité cellulaire. De telles concentrations sont utilisées dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Chen *et al.*, 2015b; Koeneman *et al.*, 2009; Periasamy *et al.*, 2015; B. Song *et al.*, 2015). Il s'agit de quantités importantes de particules, de 30 à 60 µg/cm<sup>2</sup>, et même ces fortes quantités n'impactent pas l'activité métabolique des cellules, mesurée par les tests MTT ou WST-1. De plus, aux très fortes concentrations, le risque d'interférences entre les particules et les différents tests biologiques est important. En effet, les NPs interfèrent dans de nombreux tests *in vitro* de toxicologie classique (test de cytotoxicité, MTT, WST-1, LDH), réponse pro-inflammatoire (ELISA) ou encore détection du stress oxydant, même s'il est possible de s'en affranchir (Guadagnini *et al.*, 2013). Comme ces concentrations sont très éloignées de la réalité, nous avons choisi deux concentrations plus réalistes, i.e. 10 µg/mL et 50 µg/mL, pour les différents tests réalisés. Les expositions aiguës à 10 et 50 µg/mL, (2 et 10 µg/cm<sup>2</sup>, en considérant que toutes les particules se déposent sur l'épithélium) pendant 6 h et 48 h restent élevées par rapport aux estimations de la dose journalière rapportée dans différentes études. Si l'on se base sur l'étude de Weir *et al.*, (2012), la dose journalière estimée est plus élevée chez les enfants que les adultes, compte tenu de la présence de cet additif dans les bonbons et chewing-gum principalement (Weir *et al.*, 2012). L'exposition quotidienne est estimée à 0,2-0,7 mg de TiO<sub>2</sub> par kg de poids corporel chez l'adulte et 1-2 mg chez l'enfant de moins de 10 ans, ce qui correspond à une dose d'environ 14-49 mg chez l'adulte et 30-60 mg chez l'enfant. En considérant la population des enfants la plus à risque, et en prenant 165 m<sup>2</sup> comme estimation de la superficie

de l'intestin humain, ceci correspond à 0,018-0,036  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , en considérant que la quantité se répartit sur l'ensemble de l'intestin (Helander and Fändriks, 2014; Peterson and Artis, 2014). Les doses que nous avons utilisées sont donc entre 100 et 500 fois plus élevées que la dose estimée par Weir *et al.* (2012). Cependant, l'utilisation de fortes doses ou « worst case scenario » est une stratégie classique en toxicologie, car on cherche à identifier des doses, même fortes, qui entraînent des effets significatifs. Contrairement aux toxiques chimiques, les effets des NPs pourraient ne pas varier linéairement avec la dose appliquée, notamment à cause des phénomènes d'agglomération et de sédimentation des particules en suspension. Un modèle informatique, *in vitro*, de sédimentation, diffusion et dosimétrie (ISDD), suggère que la sédimentation rapide des NPs favorise leur accumulation dans les cellules (Hinderliter *et al.*, 2010).

L'exposition aiguë correspond à une observation à un instant précis, comme par exemple après la consommation d'un paquet de bonbons ou d'un plat préparé contenant une quantité importante de colorant E171. Les expositions chroniques, à 10 et 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{TiO}_2$ , correspondent à une quantité cumulée pendant 21 jours de 10 à 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , en considérant que l'ensemble des particules des 8 expositions se déposent sur l'épithélium. Cette dose est presque aussi élevée que les concentrations 100 et 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  utilisées ici dans certaines expositions aiguës. Même si les quantités de particules sont très élevées par rapport à la dose quotidienne estimée, nous avons choisi de les utiliser dans le modèle d'exposition chronique car l'exposition aux particules de  $\text{TiO}_2$  par ingestion se fait de façon continue au cours de la vie des individus, et ce, dès le plus jeune âge. Hummel *et al.*, (2014) ont montré que la quantité de  $\text{TiO}_2$  retrouvées dans les plaques de Peyer augmentait avec l'âge des individus. En considérant un potentiel de toxicité cumulatif des particules, il est donc raisonnable d'utiliser des fortes doses même lors des expositions chroniques.

Contrairement aux études *in vivo*, il y a peu d'études, *in vitro* en chronique. Dans un intérêt mécanistique, les études sont généralement menées à fortes doses pendant des temps d'exposition courts. Dans notre étude, nous voulions évaluer si l'impact des particules de  $\text{TiO}_2$  était différent en fonction de la durée d'exposition i.e. 6 h, 24 h, 48 h, 21 jours. De plus, nous avons exposé les cellules à des particules

préparées dans du milieu de culture contenant du sérum, d'une part car il est indispensable au bon développement des cellules pendant les 21 jours de différenciation, d'autre part car on considère que lors de leur passage dans l'intestin, il est probable que les particules soient recouvertes de molécules biologiques, i.e. protéines, lipides, sucres (Lesniak *et al.*, 2013; Monopoli *et al.*, 2012). Pour davantage de réalisme, il conviendrait d'incuber dans un premier temps les particules avec de la salive puis des fluides gastriques reconstitués, comme cela a été entrepris dans différentes études, également susceptibles de modifier les caractéristiques physico-chimiques des particules (Gerloff *et al.*, 2013; Z.-M. Song *et al.*, 2015; Walczak *et al.*, 2015).

### *Discussion générale sur les résultats*

L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que le colorant E171 est peu toxique, notamment, il n'induit pas de diminution de la viabilité cellulaire ni de cassures à l'ADN, même pour les plus fortes concentrations en particules. Ces résultats ne sont pas surprenants dans la mesure où les particules de TiO<sub>2</sub> micrométriques ne sont pas considérées comme très toxiques après leur ingestion du fait de leur faible réactivité et de l'absence de solubilité en milieu aqueux (McCracken *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2011). Si de par leurs caractéristiques physico-chimiques elles parviennent à transloquer à travers l'épithélium intestinal, c'est sous forme particulaire (Pele *et al.*, 2015). Lorsqu'elles sont en suspension dans du milieu, le diamètre hydrodynamique moyen des particules du E171 est supérieur à 100 nm, cependant, l'indice de polydispersité élevé montre bien que la distribution de la taille des particules est très large.

#### Stress oxydant et dommages oxydatifs

Sans surprise car c'est un effet bien décrit des particules d'oxydes métalliques (McCracken *et al.*, 2016; Napierska *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2013), nous avons observé des effets oxydatifs des particules de TiO<sub>2</sub> sur les cellules intestinales. Le colorant E171 et les NPs de TiO<sub>2</sub> induisent l'accumulation de ROS intracellulaires

et interfèrent avec le système redox de la cellule. Le stress oxydant, qui résulte d'un déséquilibre de la balance oxydative cellulaire, est impliqué dans de nombreuses maladies comme les cancers, le diabète, des maladies cardiaques ou neurodégénératives (Reuter *et al.*, 2010). Après l'exposition chronique, le E171 augmente l'accumulation de ROS intracellulaires de façon significative mais modérée et induit des dommages de type oxydation de bases de l'ADN. Les ROS ont probablement une origine endogène, provenant du métabolisme des mitochondries ou du RE (Gerloff *et al.*, 2009; Magdolenova *et al.*, 2013; Tossa *et al.*, 2014) ; l'exposition aux particules de TiO<sub>2</sub> pourrait amplifier cette production endogène. D'autre part, les dommages de type oxydation de base de l'ADN sont concomitants avec la diminution de l'expression des gènes de la catalase (CAT), de la glutathion peroxydase (GSR), et de la superoxyde dismutase (SOD), trois enzymes impliquées dans l'équilibre redox de la cellule. Les particules de TiO<sub>2</sub> peuvent donc indirectement causer des dommages de type oxydatif à l'ADN, en altérant les systèmes enzymatiques de prise en charge des ROS. Le facteur de transcription NRF2 activé lors d'un stress oxydant, est décrit comme stimulant l'expression des transporteurs ABC (Maher *et al.*, 2007, 2005; Shelton and Jaiswal, 2013). Son expression n'est cependant pas modulée dans notre étude, suggérant que ce mécanisme de défense cellulaire n'est pas induit. Ceci dit, le mécanisme d'induction de la « réponse NRF2 » passe surtout par sa libération cytoplasmique à partir du complexe NRF2-KEAP-1, qui est la voie principale de régulation de son activité : quand NRF2 est libéré, il migre jusqu'au noyau et effectue son rôle de facteur de transcription (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Les ROS peuvent également empêcher le bon repliement des protéines, impactant alors leur fonction. D'autre part, une étude a montré dans un modèle animal de souris que le mauvais repliement de MUC2 entraînait du stress du RE et de l'inflammation intestinale (Heazlewood *et al.*, 2008). Enfin, sur le modèle pulmonaire, notre équipe a montré que les NP-TiO<sub>2</sub> entraînent une diminution significative des activités de réparation de l'ADN par excision/resynthèse (Jugan *et al.*, 2011; Biola-Clier *et al.*, sous presse). A nouveau, ceci pourrait constituer une voie indirecte par laquelle les particules de TiO<sub>2</sub> induisent des dommages aux bases de l'ADN.

## Stress du réticulum endoplasmique

Les protéines mal repliées s'accumulent dans le RE pour être dégradées. Si le RE est surchargé, la cellule est dite en état de stress du RE, ce qui déclenche les acteurs de la voie UPR (Unfolded protein response). Cette réponse a pour but de restaurer l'homéostasie du RE, en éliminant les protéines mal repliées et en restaurant le bon repliement des protéines, à défaut, elle induit l'apoptose des cellules (Garlatti and Barouki, 2002). Le stress du RE s'avère être un bon marqueur de la toxicité des NPs, comme illustré avec des NPs de ZnO ou d'Argent (R. Chen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012). Le stress du RE a été rapporté, *in vitro*, dans des cellules bronchiales humaines (16HBE14o-) après exposition à des NPs de TiO<sub>2</sub> P25, les auteurs ont ainsi montré par Western Blot l'augmentation de l'expression d'acteurs de la voie UPR i.e., Grp78/Bip, IRE-1 $\alpha$ , phospho-IRE-1 $\alpha$ , CHOP, de façon concomitante avec l'augmentation de la phosphorylation d'IRE-1, un marqueur de l'activation du stress du RE ainsi que la diminution d'expression de la calnexine, associée à l'intégrité du RE. De plus ils ont montré que lorsque les cellules étaient traitées avec un inhibiteur du stress du RE, i.e., la tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), la cytotoxicité des particules diminuait (Yu *et al.*, 2015a). Le stress du RE a également été rapporté, *in vitro*, sur des cellules hépatiques humaines (Huh7) exposées à des NPs de SiO<sub>2</sub> de 225 nm. Les auteurs ont montré l'induction des acteurs de la réponse UPR, Grp78/Bip, sXBP1, ATF-4, associé à du stress oxydant et l'induction de l'inflammation via les cytokines TNF- $\alpha$  et PP2AC (Christen *et al.*, 2014). *In vivo*, le stress du RE a été rapporté comme un mécanisme potentiel de toxicité dans des poumons de souris, après l'inhalation de NPs de TiO<sub>2</sub> pendant 28 jours. Les auteurs ont montré que le RE et les mitochondries étaient altérés, ce qui impactait leur fonction et pouvait conduire à un dysfonctionnement de l'autophagie (Yu *et al.*, 2015b). Un des effets du E171 que nous avons mis en évidence est la diminution de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la réponse UPR, mais également l'augmentation de CHOP. Le dysfonctionnement de la réponse UPR est susceptible d'augmenter la sensibilité de l'épithélium intestinal à l'inflammation (Hosomi *et al.*, 2015). *In vivo*, les souris ayant une déplétion en XBP1 et IRE-1, deux acteurs de la voie UPR, présentent une plus grande sensibilité aux MICI ainsi qu'une sensibilisation

accrue à l'inflammation intestinale (Bertolotti *et al.*, 2001). D'autre part, dans le modèle Caco-2/HT29-MTX, et à la plus forte concentration, les NPs de TiO<sub>2</sub> augmentent l'expression de *CHOP*, un acteur de la voie UPR. CHOP est up-régulé lors du stress du RE, il est l'un des facteurs qui contrôle l'entrée cellulaire en apoptose lorsque le stress du RE est trop important et que la réponse UPR est inefficace. L'accumulation de ROS intracellulaires, le déséquilibre de la balance redox et le stress du RE sont des effets, étroitement liés, caractéristiques de la toxicité des NPs de TiO<sub>2</sub> (Magdolenova *et al.*, 2013; McGuckin *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2010).

### Particules et fonction de l'intestin

La consommation prolongée de particules minérales comme le E171 ou encore le E551, i.e. des particules de silice, pourrait altérer les deux principales fonctions de l'intestin. Concernant l'absorption des nutriments, les travaux antérieurs à cette thèse ont montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> A12 et R20 augmentent les niveaux d'ARNm codant une série de transporteurs SLC, impliqués dans le transport de nutriments (sucres, acides aminés, lipides, ions organiques, etc.) dans les entérocytes. Les NPs induiraient une privation en nutriments dans la cellule, qui serait alors compensée par l'augmentation de l'expression des transporteurs. Cela s'illustre par la modification des gènes codant les protéines INSR, LRP1, GLUT-1, GLUT-4, CAV-1, impliquées dans la prise en charge du glucose. L'interaction entre NPs et sucres, lipides, protéines a été prouvée (Monopoli, 2012), suggérant la rétention de nutriments à la surface des NPs. D'autre part, une autre étude a également rapporté que des expositions aiguës et chroniques à des NPs de polystyrène modifiaient l'absorption intestinale du fer (Mahler *et al.*, 2012). Concernant la fonction de barrière, le colorant E171 et les NPs de TiO<sub>2</sub> induisent des effets modérés mais significatifs sur plusieurs composants de cette dernière, impliqués dans la sécrétion de la couche de mucus, le transport de xénobiotiques et la réponse inflammatoire. Ces effets sont étroitement liés aux observations précédentes relatant un stress oxydant et un stress du RE.

## Microbiote et mucus

Un intérêt croissant est porté au microbiote et à la couche de mucus, car ce sont eux qui déterminent, en partie, la biodisponibilité des particules pour l'épithélium, en interagissant avec les particules, même si les mécanismes sont encore méconnus (Mercier-Bonin *et al.*, 2016; Pietroiusti *et al.*, 2016). Le microbiote conditionne en grande partie l'état de santé chez l'Homme. Une dysbiose est observée dans le cas de MICI et de sensibilité intestinale (Frank *et al.*, 2007; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2013). Il est probable que les particules de TiO<sub>2</sub>, également utilisées dans certaines applications comme agents antibactériens, interagissent avec celui-ci, sans que les conséquences de cette interaction, pour les particules et pour le microbiote, ne soient encore connues (Chawengkijwanich and Hayata, 2008; Li *et al.*, 2008; Maness *et al.*, 1999). *In vivo*, des études ont rapporté une perturbation du microbiote après l'ingestion de NPs d'argent (Ag), chez le rat et la souris. Chez le rat, la population microbienne du microbiote est modifiée, avec notamment davantage de bactéries Gram négatif (Williams *et al.*, 2015). Chez la souris, une perturbation semblable à celle observée lors de troubles métaboliques et inflammatoires comme l'obésité a été détectée (van den Brule *et al.*, 2016). Ces résultats ne sont pas surprenants car ces NPs sont utilisées pour leurs propriétés antibactériennes (Hajipour *et al.*, 2012). Cependant, contrairement aux particules de TiO<sub>2</sub>, la toxicité des NPs d'Ag est principalement due au fait qu'elles se dissolvent en solution et libèrent les ions Ag<sup>+</sup>, qui sont connus comme étant très toxiques (Beer *et al.*, 2012; Lubick, 2008). Un nombre croissant d'études s'intéresse également à la couche de mucus qui recouvre l'épithélium intestinal afin de comprendre son organisation et sa composition, notamment pour des applications médicales, afin d'augmenter la biodisponibilité de vecteurs médicamenteux. La couche de mucus est chargée négativement, des polymères chargés positivement comme le chitosan sont développés pour délivrer des molécules thérapeutiques à l'épithélium (Artursson *et al.*, 1994; Behrens *et al.*, 2002; George and Abraham, 2006). Pour les MICI, des thérapies innovantes consistent à restaurer la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, notamment en renforçant la couche de mucus grâce à de la phosphatidylcholine (Torres *et al.*, 2013).

Nous avons mis en évidence une augmentation de la quantité de résidus glycosylés dans la coculture Caco-2/HT29-MTX suite à l'exposition à E171. Elle illustre soit une augmentation de la sécrétion de mucus, soit une augmentation de la quantité de glycoprotéines dans le mucus. Cependant, l'expression des mucines n'est pas augmentée, elle est même diminuée pour MUC1. Un temps de latence est nécessaire entre l'expression des ARNm codant les mucines et leur sécrétion. Ce temps de latence est dédié au repliement des protéines et aux transformations post-traductionnelles, comme les O et N-glycosylations pour les mucines ou la palmitoylation pour MUC2, qui sont cruciales pour le bon repliement des protéines et pour assurer leur fonction (Gouyer *et al.*, 2001; Heazlewood *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2005). Les mucines sont ensuite stockées dans des vésicules en attendant de leur sécrétion.

Trois hypothèses peuvent alors être émises pour expliquer cette augmentation de la quantité de résidus glycosylés. Il est possible qu'au moment où nous observons cette augmentation du niveau de glycosylation, le niveau d'expression génique des différentes mucines est déjà retourné à son niveau basal et que préalablement il y ait eu une surexpression massive des mucines. Une autre hypothèse est que l'effet que nous observons soit uniquement une augmentation du niveau de glycosylation des mucines préexistantes. Enfin, il est possible que nous observions une augmentation de la sécrétion de ces mucines stockées et en attente d'être sécrétées, sans qu'il n'y ait de nouvelle transcription des gènes.

La couche de mucus est altérée dans certaines pathologies intestinales, comme les MICI et les cancers colorectaux (Buisine *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2013; MacAdam, 1993). Une hypersécrétion de mucus est observée dans la maladie de Crohn, mais pas dans les cas de rectocolite hémorragique (Dvorak *et al.*, 1980; McGuckin *et al.*, 2009; Trabucchi *et al.*, 1986).

MUC1 participe à l'équilibre redox de la cellule lorsqu'elle est surexprimée, en favorisant la prise en charge des ROS intracellulaires par les enzymes antioxydantes, mais les mécanismes sont méconnus (Yin *et al.*, 2003). De plus, MUC1 est associée à une résistance accrue aux anti-cancéreux, notamment via la régulation des pompes d'efflux de xénobiotiques, i.e. les transporteurs ABC (Nath *et al.*, 2013) et elle est impliquée dans l'induction (Cascio *et al.*, 2011) ou le contrôle

(Guang *et al.*, 2010) des processus d'inflammation et dans la progression des cellules tumorales (Joshi *et al.* 2014; Nath and Mukherjee, 2014).

En plus de moduler la glycosylation des mucines, qui est essentielle à la mise en place du réseau du mucus qui sert de filtre protecteur de l'épithélium, le trefoil facteur TFF3 est également down-régulé par le E171 et les NPs de TiO<sub>2</sub>, ce qui est susceptible d'impacter la texture du mucus et notamment sa porosité (Mashimo *et al.*, 1996; McGuckin *et al.*, 2009; Taupin *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1997).

Enfin, les particules diminuent également l'expression de KLF4, un facteur de transcription impliqué dans la prolifération et la différenciation des cellules caliciformes (Katz *et al.*, 2002). Elles auraient donc tendance à diminuer la prolifération des cellules caliciformes, or c'est justement ce qui a été observé chez des souris exposées au E171 (Urrutia-Ortega *et al.*, 2016). KLF4 est associé à d'autres voies cellulaires via le facteur NF-κB, qui régule l'inflammation et le stress oxydant (Flandez *et al.*, 2008; Ghaleb *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2005).

Ainsi, le E171 et les NPs de TiO<sub>2</sub> impactent le mucus en modifiant ses propriétés dans le sens d'une augmentation de sa structuration (glycosylation), une modification de sa rhéologie (diminution de la viscosité), mais une diminution du nombre de cellules le sécrétant.

### Transporteurs ABC

De par leur rôle important dans l'absorption, la distribution, et le métabolisme des médicaments, les transporteurs ABC participent activement à la protection de l'épithélium intestinal (Szakács *et al.*, 2008).

L'exposition chronique au colorant E171 ne modifie pas l'intégrité des épithélias cellulaires, ce qui n'est pas le cas de l'expression génique et du contenu cellulaire des transporteurs membranaires ABC. Dans le modèle Caco-2/HT-29MTX exposé à E171, le contenu en transporteurs est augmenté après l'exposition aiguë, et diminué après l'exposition chronique, alors qu'il n'est pas modifié dans le modèle Caco-2. De même, pour les expositions aux NPs A12, P25, et R20, les expressions géniques et protéiques des transporteurs sont également modérément down-régulées ou up-régulées, mais il est difficile de conclure quant à un effet observé. La modulation de ces transporteurs peut être affectée via le mauvais repliement

des protéines ou via la modulation de MUC1 (Nath *et al.*, 2013). L'inactivation de certains transporteurs ABC est impliquée dans la pathogénicité de maladies génétiques, en particulier, la mucoviscidose (CFTR), l'hyperinsulinisme familial (SUR), le syndrome de Scott (MDR) ou le syndrome de Tangier (ABC1). De plus, l'expression génique de certains transporteurs ABC est diminuée chez des personnes souffrant de MICI (Englund *et al.*, 2007; Loo *et al.*, 2005). Au contraire, la surexpression des transporteurs ABC semble responsable de la résistance aux traitements antibiotiques de certaines bactéries pathogènes et agents infectieux (Mourez, 2000). Chez l'Homme, cette surexpression des transporteurs ABC entraîne une résistance accrue aux xénobiotiques, ce qui peut être bénéfique ou néfaste suivant le contexte comme dans les cas de résistance aux traitement anticancéreux (Chen and Tiwari, 2011; Leslie *et al.*, 2005; Szakács *et al.*, 2008).

#### TiO<sub>2</sub> et réponse inflammatoire

Le colorant E171 et les NPs de TiO<sub>2</sub> n'induisent pas de réponse inflammatoire majeure, mais des faibles régulations du contenu en certaines cytokines pro-inflammatoires. Cette réponse est principalement une diminution de la sécrétion d'un panel de cytokines. Au contraire IL-1 $\beta$ , IL-17A, Eotaxin, RANTES, bFGF voient leur sécrétion accrue dans le modèle Caco-2/HT29-MTX exposé à E171 pendant 21 jours. La modulation à la fois des gènes et du contenu protéique en cytokines pourrait impacter la sécrétion du mucus. En effet, en plus de leurs effets d'induction de la réponse inflammatoire, certaines cytokines comme IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , jouent un rôle dans l'exocytose des mucines (D. Ahn *et al.*, 2005; Cornick *et al.*, 2015; Enss *et al.*, 2000). Par exemple, IL-4 et IL-13 sont des inducteurs de l'expression de MUC2 et des TFFs, via le facteur NF- $\kappa$ B (D. Ahn *et al.*, 2005; Blanchard *et al.*, 2004; Iwashita *et al.*, 2003). Ce facteur nucléaire semble aussi impliqué, via IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , dans le contrôle de l'expression et de la sécrétion des mucines. D'autre part IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, intervient dans le bon repliement des protéines pour limiter le stress du RE (Shkoda *et al.*, 2007).

### Caco-2 vs. Caco-2/HT29-MTX

Nous obtenons une réponse cellulaire plus importante dans le modèle Caco-2/HT29-MTX que dans le modèle Caco-2. La première hypothèse serait celle d'une accumulation différente des particules dans les cellules Caco-2 ou HT29-MTX. En effet, des études antérieures ont montré que les NPs s'accumulent davantage dans les cellules HT29-MTX que dans les entérocytes Caco-2 (Brun *et al.*, 2014; Schimpel *et al.*, 2014). Ceci est certainement dû à la présence de microvillosités à la surface des cellules Caco-2 différenciées, qui interfèrent mécaniquement avec les phénomènes d'endocytose (Hansen *et al.*, 2009; Janer *et al.*, 2014). La deuxième hypothèse implique la couche de mucus. En effet, en fonction de leurs caractéristiques, en particulier de leur charge et de leur taille, les particules peuvent interagir avec la couche de mucus, s'y adsorber, s'y insérer et la traverser ou au contraire y être stockées (Mercier-Bonin *et al.*, 2016; Ponchel and Irache, 1998). Celui-ci est donc susceptible d'augmenter le temps de rétention des particules à proximité des épithélia, i.e. tel un « réservoir ». Il est également susceptible d'empêcher l'agglomération des particules ou de bloquer les plus grosses particules, laissant seulement les plus petites interagir avec l'épithélium. Outre le tri en taille des particules qui en résulterait, ce « réservoir » pourrait relarguer continuellement des particules à proximité de la membrane des cellules épithéliales, créant un stress perdurant.

### Exposition aiguë vs. exposition chronique

Les deux protocoles d'exposition aux particules de TiO<sub>2</sub> révèlent une différence de toxicité des particules après les expositions aiguës ou chroniques. Les modulations observées sont plus nombreuses après les expositions chroniques qu'aiguës. Certes, la quantité de particules reçue par les épithélia est plus importante compte tenu des expositions répétées dans le régime chronique, mais celle-ci est similaire entre l'exposition chronique à 10 µg/mL et l'exposition aiguë pendant 48 h à 100 µg/mL. Une autre hypothèse serait à nouveau la différence d'accumulation des particules dans les cellules. En effet, lors de l'exposition chronique, les cellules ne sont pas différenciées lors des premiers ajouts en particules, i.e. dès le 2<sup>ème</sup> jour après l'ensemencement. Au contraire lors des expositions aiguës, les particules sont

déposées sur des épithélia bien différenciés, i.e. après 21 jours de culture. Or, une étude a montré que les cellules Caco-2 accumulaient plus de particules lorsqu'elles étaient non différenciées (Z.-M. Song *et al.*, 2015) certainement car elles ne possèdent pas encore de microvillosités qui semblent limiter l'absorption des particules (Hansen *et al.*, 2009; Janer *et al.*, 2014).

Il est probable que le colorant E171 et les NPs de TiO<sub>2</sub> soient plus toxiques sur les cellules non différenciées.

En effet, plusieurs études suggèrent que les cellules Caco-2 non différenciées sont plus sensibles que les Caco-2 différenciées (Gerloff *et al.*, 2013; Z.-M. Song *et al.*, 2015; Tarantini *et al.*, 2015). Du point de vue de la viabilité cellulaire, nos résultats ne confirment pas cette observation. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres études menées avec des particules de TiO<sub>2</sub> anatase, comme A12, ou la fraction nanoparticulaire du E171 (Dorier *et al.*, 2015; B. Song *et al.*, 2015), par contre une étude menée avec des particules de structure mixte anatase/rutile, P25, a rapporté de la toxicité dans les cellules non différenciées (Gerloff *et al.*, 2012). Dans nos études, les cellules sont exposées dans du milieu de culture contenant du sérum, alors que dans les études qui rapportent de la mortalité cellulaire, les particules sont généralement préparées dans du milieu de culture sans sérum (De Angelis *et al.*, 2012; Gerloff *et al.*, 2012). En effet, l'impact des particules recouvertes d'une couronne de molécules, i.e. préparées dans du milieu de culture avec sérum, est inférieur à celui de particules présentant une couronne moins dense, i.e. préparées dans du milieu sans sérum (Lesniak *et al.*, 2012; Tenzer *et al.*, 2013; Walczak *et al.*, 2015). Cependant, d'autres études ont obtenu des résultats discordants, par exemple Song *et al.*, (2015). Concernant l'accumulation des ROS intracellulaires et l'expression des enzymes du stress oxydant et du stress du RE, les cellules non différenciées sont aussi sensibles que les épithélia différenciés. Même si toutefois, l'accumulation des ROS semble légèrement plus importante dans les cellules non différenciées.

## *Perspectives*

Grâce aux éléments qui constituent la barrière intestinale, l'Homme est a priori bien armé face à de potentielles agressions provenant de l'environnement. Cependant, nous avons montré que les particules de TiO<sub>2</sub> impactaient des éléments impliqués dans la fonction de barrière intestinale.

Pour approfondir notre compréhension de l'impact du E171 sur l'intestin, et en particulier sur l'impact de la barrière intestinale plusieurs approches pourraient être utilisées. Nous avons vu que l'exposition aux particules modulait l'expression de transporteurs membranaires, ces observations ont peut-être un impact sur la capacité qu'a la cellule pour se défendre. Il pourrait alors être intéressant de réaliser des co-expositions avec des cellules préalablement exposées au E171 ou à des NPs puis exposées à un xénobiotique, et de comparer son impact sur la viabilité des cellules et l'intégrité de l'ADN par rapport à des cellules non pré-exposées au E171. En effet, une approche similaire a été utilisée dans une étude qui a montré que l'exposition chronique aux NPs P25 sensibilisait des cellules pulmonaires à un agent génotoxique (Armand *et al.*, 2016).

D'autre part, chez les personnes souffrant de sensibilité intestinale et notamment des MICI, l'épithélium intestinal est enflammé et la barrière intestinale est altérée (Antoni *et al.*, 2014; McGuckin *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2013), laissant supposer que ces personnes pourraient être davantage sensibles aux E171 et aux NPs de TiO<sub>2</sub>. Chez ces personnes, la fonction de barrière intestinale est compromise sur plusieurs composants, le microbiote (Frank *et al.*, 2007; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2013), le mucus (Dvorak *et al.*, 1980; McGuckin *et al.*, 2009; Trabucchi *et al.*, 1986), l'intégrité/ la perméabilité de l'épithélium (Johansson *et al.*, 2013; McGuckin *et al.*, 2009; Strober *et al.*, 2007). Leur système immunitaire est activé et répond de façon disproportionnée à certains éléments étrangers (Gjymishka *et al.*, 2013; Kaser *et al.*, 2010). Il serait alors intéressant d'étudier l'impact du colorant E171 et des NPs de TiO<sub>2</sub> sur des modèles cellulaires présentant un environnement génétique leur conférant une susceptibilité aux MICI, par exemple une mutation au niveau de leur gène codant NOD2. A notre connaissance, il n'y a pas d'étude sur le colorant E171 et des modèles *in vitro* mutés NOD2, néanmoins, des modèles cellulaires

d'épithélia enflammés car préalablement exposés à des cytokines pro-inflammatoires ont déjà été utilisés pour étudier l'impact de NPs. Dans un modèle de cellules Caco-2 en coculture avec des macrophages THP1 et des cellules dendritique MUTZ-3, il a été montré que les cellules prétraitées avec de l'IL-1 $\beta$ , sont plus sensibles à des NPs d'Argent (Ag). Dans cette étude, des NPs d'Ag recouvertes avec du poly vinyl pyrrolidone (PVP) étaient utilisées à 312,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  et les tests utilisés pour démontrer cet effet étaient le test LDH et les mesures TEER. A l'opposé, elles induisent une légère diminution de la quantité d'IL-8. Au contraire, les NPs de TiO $_2$  (7-10 nm) n'induisent pas de toxicité ni d'inflammation dans ce modèle cellulaire (Susewind *et al.*, 2016).

Parmi les facteurs environnementaux en cause dans ces pathologies, se trouve le régime alimentaire, du fait de l'ajout croissant d'additifs sous forme de particules minérales dans les produits industrialisés. De ce fait, des études cliniques ont été menées pour évaluer si des régimes alimentaires pauvres en micro- et nanoparticules (donc éliminant notamment les aliments sources de TiO $_2$  et SiO $_2$ ) atténuent les symptômes de patients souffrant de la maladie de Crohn. Alors que l'étude pilote sur un groupe de 18 personnes a montré des résultats positifs de ce régime pauvre en micro et nanoparticules (Lomer *et al.*, 2001), une autre étude sur un panel plus large de patients, i.e. 83 personnes, n'a pas confirmé ces résultats (Lomer *et al.*, 2005). Cependant, une critique de ce travail est que les personnes du groupe contrôle se sont vu administrer l'équivalent de 5 mg de TiO $_2$  journalier alors que certaines estimations de consommation rapportent des ingestions journalières de 12-42 mg (Weir *et al.*, 2012).

Dans une revue sur l'impact des NPs présentes dans les produits alimentaires, McCracken *et al.*, (2016) soulèvent que l'impact des NPs chez les personnes souffrant de MICI mériterait un plus grand intérêt. Seule une étude épidémiologique, à grande échelle, chez des personnes saines et des personnes souffrant de MICI serait en mesure d'apporter des informations quant à l'impact des micros et nanoparticules présentes dans l'alimentation.

---

# CONCLUSION

---

Cette étude porte sur l'impact du colorant alimentaire E171 et des NPs de TiO<sub>2</sub> après leur ingestion. Les résultats ont montré que le colorant E171 exerce une toxicité modérée sur les modèles cellulaires, *in vitro*, Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX. La viabilité cellulaire n'est pas impactée par les expositions chroniques ou aiguës aux particules. Néanmoins, il module des marqueurs du stress oxydant, du stress du réticulum et de l'inflammation, et entraîne des dommages de type oxydatifs à l'ADN. De plus, la sécrétion du mucus et l'expression de transporteurs membranaires, en particulier de pompes d'efflux, sont impactés. Les résultats ont montré que les effets du colorant E171 n'étaient pas exclusivement imputables à la fraction nanométrique des particules.

Comme c'est souvent le cas dans la littérature relative à la toxicologie des nanomatériaux, et en particulier d'autres NPs d'oxydes métalliques peu solubles en milieu aqueux, i.e. SiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>, etc., certaines études sur la toxicité du E171 et des NPs de TiO<sub>2</sub> rapportent des résultats divergents (Gupta and Tripathi, 2011; McCracken *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Tarantini *et al.*, 2015).

Plus généralement, il est difficile de conclure quant à l'impact du colorant E171 sur la santé. Ces données ayant été obtenues *in vitro*, après exposition à de fortes doses, il est difficile de les extrapoler à ce que l'on pourrait observer chez l'Homme. Des études complémentaires sont nécessaires, en particulier *in vivo*, sur des modèles animaux en privilégiant des expositions chroniques à des concentrations plus réalistes. *In vivo*, les particules semblent s'accumuler davantage dans les plaques de Peyer que dans les autres cellules de l'épithélium intestinal (Brun et al, 2014). Des particules de TiO<sub>2</sub>, semblables à celles du colorant E171 ont en effet été retrouvées dans les plaques de Peyer d'enfants souffrant de MICI (Hummel, 2014). D'autre part nos collaborateurs de l'équipe TOXALIM à l'INRA de Toulouse (S. Bettini, L. Guzylack, E. Houdeau) ont observé, *in vivo*, une immunomodulation induite par le E171 lors d'expositions aiguës et chroniques (Communication orale

au colloque Nano-Agro de l'ANSES, sept. 2016 ; Bettini *et al.*, soumis). Une équipe de l'unité MICALIS, à l'INRA de Jouy-en-Josas (Communication orale au colloque Nano-Agro de l'ANSES, sept. 2016 ; M. Thomas et M. Mercier-Bonin), a par ailleurs étudié l'impact du E171 sur le microbiote et son interaction avec le mucus. Les résultats obtenus confirment ceux que nous rapportons dans ce travail, en particulier un impact sur la composition du mucus, dont les protéines sont davantage glycosylées après exposition à P25 ou E171. Du point de vue du microbiote, le E171 induit des modifications morphologiques des bactéries le composant, ainsi qu'une modification de leur croissance et une altération de leur métabolisme (Mercier-Bonin *et al.*, en préparation).

L'introduction de particules minérales dans les produits alimentaires n'est donc pas une question anodine, pourtant l'EFSA a émis une conclusion favorable quant à son utilisation dans des produits alimentaires (résolution adoptée en juin 2016 et publiée mi-septembre 2016, (EFSA, 2016)). Le panel d'experts conclut que l'absorption intestinale du  $\text{TiO}_2$  est faible, quelle que soit la taille de la particule, qu'il n'existe pas de risque génotoxique, et que du point de vue de la carcinogénicité, la NOAEL est de 2,25 mg  $\text{TiO}_2$ /kg de poids corporel/jour. Ce panel souligne la possible reprotoxicité du E171, mais en l'absence de données issues d'expositions chroniques il ne conclut pas quant à une dose ingérée quotidienne acceptable (ADI).

Entre l'âge de 2 ans et 4 ans, le microbiote chez l'enfant est mis en place, il est quasiment définitif et assure une grande partie de la défense de l'épithélium intestinal (Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Sommer and Bäckhed, 2013). Avant cet âge l'exposition aux nanomatériaux alimentaires et en particulier au  $\text{TiO}_2$  apparaît donc plus critique. Chez la plupart des personnes exposées, l'exposition aux micro- et nanoparticules alimentaires minérales, n'aura probablement aucun impact sur leur santé mais pour celles souffrant de sensibilités intestinales, cela pourrait être un des éléments à compter parmi les nombreux facteurs environnementaux suspectés d'intervenir dans la physiopathologie des MICI.

Enfin, plusieurs difficultés majeures sont rencontrées quand il s'agit de réglementer les NPs car en plus de leur nature chimique, de nombreux paramètres influencent leur toxicité. De plus, la définition de nanomatériau varie en fonction

des pays, des domaines d'applications et des institutions. La réglementation concernant la part de NPs dans les aliments est toujours floue et les tentatives de réglementations de ces particules avancent lentement comme illustré avec l'obligation d'étiquetage [nano] sur les produits alimentaires. Les associations de consommateurs militent pour plus de rigueur et de transparence concernant la fraction nanoparticulaire effectivement présente dans les aliments. De leur côté, les travaux de recherche tentent d'apporter un éclairage scientifique à l'impact potentiel de ces composés sur la santé humaine.

---

## REFERENCES

---

- Aamann, L., Vestergaard, E.M., Grønbaek, H., 2014. Trefoil factors in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 3223–3230. doi:10.3748/wjg.v20.i12.3223
- Adams, L.K., Lyon, D.Y., McIntosh, A., Alvarez, P.J.J., 2006. Comparative toxicity of nano-scale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> and ZnO water suspensions. *Water Sci. Technol.* 54, 327–334. doi:10.2166/wst.2006.891
- Ahn, D., Crawley, S., Hokari, R., Kato, S., Yang, S., Li, J., Kim, Y., 2005. TNF- $\alpha$  Activates MUC2 Transcription via NF- $\kappa$ B but Inhibits via JNK Activation. *Cell. Physiol. Biochem.* 15, 29–40. doi:10.1159/000083636
- Ahn, M.-H., Kang, C.-M., Park, C.-S., Park, S.-J., Rhim, T., Yoon, P.-O., Chang, H.S., Kim, S.-H., Kyono, H., Kim, K.C., 2005. Titanium dioxide particle – induced goblet cell hyperplasia : association with mast cells and IL-13. *Respir. Res.* 6, 34. doi:10.1186/1465-9921-6-34
- Al-Rasheed, N.M., Faddah, L.M., Mohamed, A.M., Abdel Baky, N.A., Al-Rasheed, N.M., Mohammad, R.A., 2013a. 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-Rasheed, N.M., Faddah, L.M., Mohamed, A.M., Baky, N.A.A., Al-Rasheed, N.M., Mohammad, R.A., 2013b. 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. doi:10.5650/jos.62.961
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix.*
- Amenta, V., Aschberger, K., Arena, M., Bouwmeester, H., Botelho Moniz, F., Brandhoff, P., Gottardo, S., Marvin, H.J.P., Mech, A., Quiros Pseudo, L., Rauscher, H., Schoonjans, R., Vettori, M.V., Weigel, S., Peters, R.J., 2015. Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 463–476. doi:10.1016/j.yrtph.2015.06.016
- Ananthakrishnan, A.N., 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 205–217. doi:10.1038/nrgastro.2015.34
- Anderle, P., Rakhmanova, V., Woodford, K., Zerangue, N., Sadée, W., 2003. Messenger RNA Expression of Transporter and Ion Channel Genes in Undifferentiated and Differentiated Caco-2 Cells Compared to Human Intestines. *Pharm. Res.* 20, 3–15. doi:10.1023/A:1022282221530
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., Batra, S.K., 2006. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1765, 189–222. doi:10.1016/j.bbcan.2006.01.002

- Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J., Stange, E.F., 2014. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 1165–1179. doi:10.3748/wjg.v20.i5.1165
- Araújo, F., Pereira, C., Costa, J., Barrias, C., Granja, P.L., Sarmiento, B., 2015. In vitro M-like cells genesis through a tissue-engineered triple-culture intestinal model. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* n/a–n/a. doi:10.1002/jbm.b.33508
- Armand, L., Tarantini, A., Beal, D., Biola-Clier, M., Bobyk, L., Sorieul, S., Pernet-Gallay, K., Marie-Desvergne, C., Lynch, I., Herlin-Boime, N., Carriere, M., 2016. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. *Nanotoxicology* 0, 1–11. doi:10.3109/17435390.2016.1141338
- Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S., Illum, L., 1994. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 11, 1358–1361.
- Artursson, P., Palm, K., Luthman, K., 2012. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, Supplement, 280–289. doi:10.1016/j.addr.2012.09.005
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., *et al.*, 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180. doi:10.1038/nature09944
- Ashwood, P., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., 2007. Fine particles that adsorb lipopolysaccharide via bridging calcium cations may mimic bacterial pathogenicity towards cells. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 232, 107–117.
- Athinarayanan, J., Alshatwi, A.A., Periasamy, V.S., Al-Warthan, A.A., 2015. Identification of Nanoscale Ingredients in Commercial Food Products and their Induction of Mitochondrially Mediated Cytotoxic Effects on Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Food Sci.* 80, N459–N464. doi:10.1111/1750-3841.12760
- Bai, Y., Wu, F., White, J.C., Xing, B., 2014. 100 Nanometers: A Potentially Inappropriate Threshold for Environmental and Ecological Effects of Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3098–3099. doi:10.1021/es500365k
- Baird, L., Dinkova-Kostova, A.T., 2011. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85, 241–272. doi:10.1007/s00204-011-0674-5
- Ballard, S.T., Hunter, J.H., Taylor, A.E., 1995. Regulation of Tight-Junction Permeability During Nutrient Absorption Across the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Nutr.* 15, 35–55. doi:10.1146/annurev.nu.15.070195.000343
- Bazin, E., Mouro, A., Humpage, A.R., Fessard, V., 2010. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 251–259. doi:10.1002/em.20539
- Becker, K., Schroecksadel, S., Geisler, S., Carriere, M., Gostner, J.M., Schennach, H., Herlin, N., Fuchs, D., 2014. TiO<sub>2</sub> nanoparticles and bulk material stimulate human peripheral blood mononuclear cells. *Food Chem. Toxicol.* 65, 63–69. doi:10.1016/j.fct.2013.12.018
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Autrup, H., 2012. Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? *Toxicol. Lett.* 208, 286–292. doi:10.1016/j.toxlet.2011.11.002
- Behrens, I., Pena, A.I.V., Alonso, M.J., Kissel, T., 2002. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human

- intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm. Res.* 19, 1185–1193.
- Bellmann, S., Carlander, D., Fasano, A., Momcilovic, D., Scimeca, J.A., Waldman, W.J., Gombau, L., Tsytsikova, L., Canady, R., Pereira, D.I.A., Lefebvre, D.E., 2015. Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 7, 609–622. doi:10.1002/wnan.1333
- Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P., 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–147. doi:10.1038/nrm3737
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529. doi:10.1038/nrm1155
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B., Ron, D., 2001. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 $\beta$ -deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107, 585–593. doi:10.1172/JCI11476
- Bhattacharjee, S., Opstal, E.J. van, Alink, G.M., Marcelis, A.T.M., Zuilhof, H., Rietjens, I.M.C.M., 2013. Surface charge-specific interactions between polymer nanoparticles and ABC transporters in Caco-2 cells. *J. Nanoparticle Res.* 15, 1–14. doi:10.1007/s11051-013-1695-1
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R.P., Hoffmann, E., Dopp, E., 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part. Fibre Toxicol.* 6, 17. doi:10.1186/1743-8977-6-17
- Bird, R.P., 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 37, 147–151.
- Bjerknes, M., Cheng, H., 2005. Gastrointestinal Stem Cells. II. Intestinal stem cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G381–G387. doi:10.1152/ajpgi.00160.2005
- Blanchard, C., Durual, S., Estienne, M., Bouzakri, K., Heim, M.H., Blin, N., Cuber, J.-C., 2004. IL-4 and IL-13 Up-Regulate Intestinal Trefoil Factor Expression: Requirement for STAT6 and De Novo Protein Synthesis. *J. Immunol.* 172, 3775–3783. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3775
- Boisseau, P., Loubaton, B., 2011. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Phys., Nanoscience and nanotechnologies: hopes and concerns* Nanoscience et nanotechnologies: espérances et inquiétudes 12, 620–636. doi:10.1016/j.crhy.2011.06.001
- Boland, S., Hussain, S., Baeza-Squiban, A., 2014. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 6, 641–652. doi:10.1002/wnan.1302
- Bouvier, N., Fougerey, S., Beaune, P., Thervet, E., Pallet, N., 2012. The Unfolded Protein Response Regulates an Angiogenic Response by the Kidney Epithelium during Ischemic Stress. *J. Biol. Chem.* 287, 14557–14568. doi:10.1074/jbc.M112.340570

- Brand, W., Schutte, M.E., Williamson, G., van Zanden, J.J., Cnubben, N.H.P., Groten, J.P., van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M.C.M., 2006. Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, food-borne toxic compounds and bioactive ingredients. *Biomed. Pharmacother.*, Special Issue for the 50<sup>e</sup> anniversary of the journal 60, 508–519. doi:10.1016/j.biopha.2006.07.081
- Brandtzaeg, P., 2009. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scand. J. Immunol.* 70, 505–515. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02319.x
- Brown, D., Donaldson, K., Stone, V., 2004. Effects of PM10 in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir. Res.* 5, 29. doi:10.1186/1465-9921-5-29
- Brun, E., Barreau, F., Veronesi, G., Fayard, B., Sorieul, S., Chanéac, C., Carapito, C., Rabilloud, T., Mabondzo, A., Herlin-Boime, N., Carrière, M., 2014. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. Part. *Fibre Toxicol.* 11, 13. doi:10.1186/1743-8977-11-13
- Brun, E., Jugan, M.-L., Herlin-Boime, N., Jaillard, D., Fayard, B., Flank, A.-M., Mabondzo, A., Carrière, M., 2011. Investigation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles translocation through a Caco-2 monolayer. *J. Phys. Conf. Ser.* 304, 012048. doi:10.1088/1742-6596/304/1/012048
- Buisine, M.-P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M.-C., Colombel, J.-F., Porchet, N., Aubert, J.-P., 2001. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* 49, 544–551. doi:10.1136/gut.49.4.544
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K., n.d. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2, MR17–MR71. doi:10.1116/1.2815690
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L., Sauvaigo, S., 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 424, 9–21. doi:10.1016/S0027-5107(99)00004-4
- Cascio, S., Zhang, L., Finn, O.J., 2011. MUC1 Protein Expression in Tumor Cells Regulates Transcription of Proinflammatory Cytokines by Forming a Complex with Nuclear Factor- $\kappa$ B p65 and Binding to Cytokine Promoters. *J. Biol. Chem.* 286, 42248–42256. doi:10.1074/jbc.M111.297630
- CDU-HGE, 2014. les fondamentaux de la pathologie digestive, Elsevier-Masson. ed.
- Cereijido, M., Contreras, R.G., Flores-Benítez, D., Flores-Maldonado, C., Larre, I., Ruiz, A., Shoshani, L., 2007. New Diseases Derived or Associated with the Tight Junction. *Arch. Med. Res.* 38, 465–478. doi:10.1016/j.arcmed.2007.02.003
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M.G., Zweibaum, A., 1988. Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of

- Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines. *Cancer Res.* 48, 1936–1942.
- Chapman-Kiddell, C.A., Davies, P.S.W., Gillen, L., Radford-Smith, G.L., 2010. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 137–151. doi:10.1002/ibd.20968
- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d’Hellencourt, C., Ramanan, P., 2014. A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. *Front. Cell. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fncel.2014.00213
- Chaudhry, Q., Castle, L., 2011. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends Food Sci. Technol., Agri-food nano applications: ensuring social benefits* 22, 595–603. doi:10.1016/j.tifs.2011.01.001
- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R., Watkins, R., 2008. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit. Contam. Part A* 25, 241–258. doi:10.1080/02652030701744538
- Chawengkijwanich, C., Hayata, Y., 2008. Development of TiO<sub>2</sub> powder-coated food packaging film and its ability to inactivate *Escherichia coli* in vitro and in actual tests. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 288–292. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.017
- Chen, E.Y.T., Garnica, M., Wang, Y.-C., Chen, C.-S., Chin, W.-C., 2011. Mucin Secretion Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles. *PLoS ONE* 6, e16198. doi:10.1371/journal.pone.0016198
- Chen, R., Huo, L., Shi, X., Bai, R., Zhang, Z., Zhao, Y., Chang, Y., Chen, C., 2014. Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Zinc Oxide Nanoparticles Is an Earlier Biomarker for Nanotoxicological Evaluation. *ACS Nano* 8, 2562–2574. doi:10.1021/nn406184r
- Chen, T., Yan, J., Li, Y., 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *J. Food Drug Anal., Nanomaterials - Toxicology and Medical Applications* 22, 95–104. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.008
- Chen, X., Mao, S.S., 2007. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem. Rev.* 107, 2891–2959. doi:10.1021/cr0500535
- Chen, X.-M., Elisia, I., Kitts, D.D., 2010. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 61, 334–342. doi:10.1016/j.vascn.2010.02.004
- Chen, X.-X., Cheng, B., Yang, Y.-X., Cao, A., Liu, J.-H., Du, L.-J., Liu, Y., Zhao, Y., Wang, H., 2013. Characterization and Preliminary Toxicity Assay of Nano-Titanium Dioxide Additive in Sugar-Coated Chewing Gum. *Small* 9, 1765–1774. doi:10.1002/sml.201201506
- Chen, Y., Brandizzi, F., 2013. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol.* 23. doi:10.1016/j.tcb.2013.06.005
- Chen, Z., Wang, Y., Zhuo, L., Chen, S., Zhao, L., Chen, T., Li, Y., Zhang, W., Gao, X., Li, P., Wang, H., Jia, G., 2015a. Interaction of titanium dioxide nanoparticles with glucose on young rats after oral administration. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 1633–1642. doi:10.1016/j.nano.2015.06.002

- Chen, Z., Wang, Y., Zhuo, L., Chen, S., Zhao, L., Luan, X., Wang, H., Jia, G., 2015b. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the cardiovascular system after oral administration. *Toxicol. Lett.* 239, 123–130. doi:10.1016/j.toxlet.2015.09.013
- Chen, Z.-S., Tiwari, A.K., 2011. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J.* 278, 3226–3245. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08235.x
- Christen, V., Camenzind, M., Fent, K., 2014. Silica nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress response, oxidative stress and activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. *Toxicol. Rep.* 1, 1143–1151. doi:10.1016/j.toxrep.2014.10.023
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B., 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology, DNA Repair in Toxicology* 193, 3–34. doi:10.1016/S0300-483X(03)00287-7
- Clevers, H., 2006. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469–480. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018
- Cornick, S., Tawiah, A., Chadee, K., 2015. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* 3, e982426. doi:10.4161/21688370.2014.982426
- Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359. doi:10.1038/nrg1840
- Danese, S., 2012. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut* 61, 918–932. doi:10.1136/gutjnl-2011-300904
- Date, S., Sato, T., 2015. Mini-Gut Organoids: Reconstitution of the Stem Cell Niche. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 269–289. doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125218
- Dave, M., Higgins, P.D., Middha, S., Rioux, K.P., 2012. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl. Res., In-Depth Review: Of Microbes and Men: Challenges of the Human Microbiome* 160, 246–257. doi:10.1016/j.trsl.2012.05.003
- Davies, K.J.A., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1–31. doi:10.1042/bss0610001
- De Angelis, I., Barone, F., Zijno, A., Bizzarri, L., Russo, M.T., Pozzi, R., Franchini, F., Giudetti, G., Ubaldi, C., Ponti, J., Rossi, F., De Berardis, B., 2012. Comparative study of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles: physicochemical characterisation and toxicological effects on human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology* 7, 1361–1372. doi:10.3109/17435390.2012.741724
- De Lerna Barbaro, A., Perletti, G., Bonapace, I.M., Monti, E., 2014. Inflammatory cues acting on the adult intestinal stem cells and the early onset of cancer (review). *Int. J. Oncol.* 45, 959–968. doi:10.3892/ijo.2014.2490
- Des Rieux, A., Fievez, V., Théate, I., Mast, J., Préat, V., Schneider, Y.-J., 2007. An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 30, 380–391. doi:10.1016/j.ejps.2006.12.006
- Deuring, J.J., Peppelenbosch, M.P., Kuipers, E.J., van der Woude, C.J., de Haar, C., 2011. Impeded protein folding and function in active inflammatory bowel disease. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1107–1111. doi:10.1042/BST0391107

- Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Luinetti, O., Ricevuti, L., Morera, R., Cifone, M.G., Solcia, E., Corazza, G.R., 2003. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis. Colon Rectum* 46, 1498–1507. doi:10.1097/01.DCR.0000089118.20964.12
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11971–11975. doi:10.1073/pnas.1002601107
- Doré, J., Blottière, H., 2015. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. *Curr. Opin. Biotechnol., Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 32, 195–199. doi:10.1016/j.copbio.2015.01.002
- Dorier, M., Brun, E., Veronesi, G., Barreau, F., Pernet-Gallay, K., Desvergne, C., Rabilloud, T., Carapito, C., Herlin-Boime, N., Carrière, M., 2015. Impact of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles on uptake carriers and efflux pumps in Caco-2 gut epithelial cells. *Nanoscale*. doi:10.1039/C5NR00505A
- Dušinská, M., Collins, A., 1996. Detection of Oxidized Purines and UV-Induced Photoproducts in DNA of Single Cells, by Inclusion of Lesion-Specific Enzymes in the Comet Assay. *Altern. Lab. Anim. ATLA* 24, 405–411.
- Dvorak, A.M., Monahan, R.A., Osage, J.E., Dickersin, G.R., 1980. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum. Pathol.* 11, 606–619.
- Dydensborg, A.B., Herring, E., Auclair, J., Tremblay, E., Beaulieu, J.-F., 2006. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1067–G1074. doi:10.1152/ajpgi.00234.2005
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635–1638. doi:10.1126/science.1110591
- EFSA, 2016. Re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. *EFSA J.* 14, n/a–n/a. doi:10.2903/j.efsa.2016.4545
- El-Khider, F., McDonald, C., 2016. Links of Autophagy Dysfunction to Inflammatory Bowel Disease Onset. *Dig. Dis. Basel Switz.* 34, 27–34. doi:10.1159/000442921
- Elson, C.O., Cong, Y., McCracken, V.J., Dimmitt, R.A., Lorenz, R.G., Weaver, C.T., 2005. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol. Rev.* 206, 260–276. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00291.x
- Enders, G., 2015. *Le charme discret de l'intestin*, Actes Sud. ed.
- Englund, G., Jacobson, A., Rorsman, F., Artursson, P., Kindmark, A., Rönnblom, A., 2007. Efflux transporters in ulcerative colitis: Decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 291–297. doi:10.1002/ibd.20030

- Ensign, L.M., Cone, R., Hanes, J., 2012. Oral Drug Delivery with Polymeric Nanoparticles: The Gastrointestinal Mucus Barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 557–570. doi:10.1016/j.addr.2011.12.009
- Enss, M.L., Cornberg, M., Wagner, S., Gebert, A., Henrichs, M., Eisenblätter, R., Beil, W., Kownatzki, R., Hedrich, H.J., 2000. Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* Al 49, 162–169.
- Farh, K.K.-H., Marson, A., Zhu, J., Kleinewietfeld, M., Housley, W.J., Beik, S., Shores, N., Whitton, H., Ryan, R.J.H., Shishkin, A.A., Hatan, M., Carrasco-Alfonso, M.J., Mayer, D., Luckey, C.J., Patsopoulos, N.A., De Jager, P.L., Kuchroo, V.K., Epstein, C.B., Daly, M.J., Hafler, D.A., Bernstein, B.E., 2015. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* 518, 337–343. doi:10.1038/nature13835
- Faust, J.J., Doudrick, K., Yang, Y., Westerhoff, P., Capco, D.G., 2014. Food grade titanium dioxide disrupts intestinal brush border microvilli in vitro independent of sedimentation. *Cell Biol. Toxicol.* 30, 169–188. doi:10.1007/s10565-014-9278-1
- Fernández-Blanco, C., Font, G., Ruiz, M.-J., 2014. Oxidative stress of alternariol in Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.* 229, 458–464. doi:10.1016/j.toxlet.2014.07.024
- Filippi, C., Pryde, A., Cowan, P., Lee, T., Hayes, P., Donaldson, K., Plevris, J., Stone, V., 2015. Toxicology of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on hepatocytes: Impact on metabolism and bioenergetics. *Nanotoxicology* 9, 126–134. doi:10.3109/17435390.2014.895437
- Flandez, M., Guilmeau, S., Blache, P., Augenlicht, L.H., 2008. KLF4 regulation in intestinal epithelial cell maturation. *Exp. Cell Res.* 314, 3712–3723. doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.004
- Flier, L.G. van der, Clevers, H., 2009. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163145
- Fodde, R., Smits, R., Clevers, H., 2001. APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 55–67. doi:10.1038/35094067
- Fong, Y.W., Cattoglio, C., Tjian, R., 2013. The Intertwined Roles of Transcription and Repair Proteins. *Mol. Cell* 52, 291–302. doi:10.1016/j.molcel.2013.10.018
- Forestier, A., Douki, T., Sauvaigo, S., De Rosa, V., Demeilliers, C., Rachidi, W., 2012. Alzheimer's Disease-Associated Neurotoxic Peptide Amyloid- $\beta$  Impairs Base Excision Repair in Human Neuroblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14766–14787. doi:10.3390/ijms131114766
- Francisca Araújo, B.S., 2013. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. *Int. J. Pharm.* doi:10.1016/j.ijpharm.2013.10.003
- Frank, D.N., Amand, A.L.S., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13780–13785. doi:10.1073/pnas.0706625104

- Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., *et al.*, 2010. Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nat. Genet.* 42, 1118–1125. doi:10.1038/ng.717
- Fröhlich, E., 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 7, 5577–5591. doi:10.2147/IJN.S36111
- Fröhlich, E., Roblegg, E., 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology* 291, 10–17. doi:10.1016/j.tox.2011.11.004
- Frossi, B., Tell, G., Spessotto, P., Colombatti, A., Vitale, G., Pucillo, C., 2002. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces translocation of APE/Ref-1 to mitochondria in the Raji B-cell line. *J. Cell. Physiol.* 193, 180–186. doi:10.1002/jcp.10159
- Fujishima, A., Honda, K., 1972. Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. *Nature* 238, 37–38. doi:10.1038/238037a0
- Gaffet, E., 2011. Nanomatériaux : Une revue des définitions, des applications et des effets sur la santé. Comment implémenter un développement sûr. *Comptes Rendus Phys., Nanoscience and nanotechnologies: hopes and concerns* Nanoscience et nanotechnologies : espérances et inquiétudes 12, 648–658. doi:10.1016/j.crhy.2011.06.002
- García-Lorenzo, A., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Rodríguez-Berrocal, F.J., Cadena, M.P. de la, Martínez-Zorzano, V.S., 2012. Changes on the Caco-2 Secretome through Differentiation Analyzed by 2-D Differential In-Gel Electrophoresis (DIGE). *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14401–14420. doi:10.3390/ijms131114401
- Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Agostinis, P., 2012. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? *Trends Mol. Med.* 18, 589–598. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.010
- Garlatti, M., Barouki, R., 2002. Le stress du réticulum endoplasmique : adaptation et toxicité. *médecine/sciences* 18, 585–594. doi:10.1051/medsci/2002185585
- George, M., Abraham, T.E., 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *J. Controlled Release* 114, 1–14. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.017
- Geraets, L., Oomen, A.G., Krystek, P., Jacobsen, N.R., Wallin, H., Laurentie, M., Verharen, H.W., Brandon, E.F., de Jong, W.H., 2014. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 30. doi:10.1186/1743-8977-11-30
- Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., Schins, R.P.F., 2009. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology* 3, 355–364. doi:10.3109/17435390903276933
- Gerloff, K., Fenoglio, I., Carella, E., Kolling, J., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., Schins, R.P.F., 2012. Distinctive Toxicity of TiO<sub>2</sub> Rutile/Anatase Mixed Phase Nanoparticles on Caco-2 Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 646–655. doi:10.1021/tx200334k
- Gerloff, K., Pereira, D.I.A., Faria, N., Boots, A.W., Kolling, J., Förster, I., Albrecht, C., Powell, J.J., Schins, R.P.F., 2013. Influence of simulated gastrointestinal conditions on particle-induced cytotoxicity and interleukin-8 regulation in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Nanotoxicology* 7, 353–366. doi:10.3109/17435390.2012.662249

- Gesenhues, U., 2001. Calcination of Metatitanic Acid to Titanium Dioxide White Pigments. *Chem. Eng. Technol.* 24, 685–694. doi:10.1002/1521-4125(200107)24:7<685::AID-CEAT685>3.0.CO;2-1
- Ghaleb, A.M., Laroui, H., Merlin, D., Yang, V.W., 2014. Genetic Deletion of *Klf4* in the Mouse Intestinal Epithelium Ameliorates Dextran Sodium Sulfate–induced Colitis by Modulating the NF- $\kappa$ B Pathway Inflammatory Response. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 811–820. doi:10.1097/MIB.000000000000022
- Giacomini, K.M., Huang, S.-M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L.R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., Hoffmaster, K.A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R.B., Lee, C.A., Niemi, M., Polli, J.W., Sugiyama, Y., Swaan, P.W., Ware, J.A., Wright, S.H., Yee, S.W., Zamek-Gliszczyński, M.J., Zhang, L., 2010. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 215–236. doi:10.1038/nrd3028
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E., 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312, 1355–1359. doi:10.1126/science.1124234
- Giovanni, M., Yue, J., Zhang, L., Xie, J., Ong, C.N., Leong, D.T., 2015. Pro-inflammatory responses of RAW264.7 macrophages when treated with ultralow concentrations of silver, titanium dioxide, and zinc oxide nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* 297, 146–152. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.04.081
- Gitrowski, C., Al-Jubory, A.R., Handy, R.D., 2014. Uptake of different crystal structures of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by Caco-2 intestinal cells. *Toxicol. Lett.* 226, 264–276. doi:10.1016/j.toxlet.2014.02.014
- Gjymishka, A., Coman, R.M., Brusko, T.M., Glover, S.C., 2013. Influence of host immunoregulatory genes, ER stress and gut microbiota on the shared pathogenesis of inflammatory bowel disease and Type 1 diabetes. *Immunotherapy* 5, 1357–1366. doi:10.2217/imt.13.130
- Goodell, M.A., Nguyen, H., Shroyer, N., 2015. Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 299–309. doi:10.1038/nrm3980
- Gouyer, V., Wiede, A., Buisine, M.-P., Dekeyser, S., Moreau, O., Lesuffleur, T., Hoffmann, W., Huet, G., 2001. Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1539, 71–84. doi:10.1016/S0167-4889(01)00092-1
- Grassian, V.H., O’Shaughnessy, P.T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J.M., Thorne, P.S., 2007. Inhalation Exposure Study of Titanium Dioxide Nanoparticles with a Primary Particle Size of 2 to 5 nm. *Environ. Health Perspect.* 115, 397–402. doi:10.1289/ehp.9469
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P., 2009. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 3–20. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038
- Guadagnini, R., Halamoda Kenzaoui, B., Cartwright, L., Pojana, G., Magdolenova, Z., Bilanicova, D., Saunders, M., Juillerat, L., Marcomini, A., Huk, A., Dusinska, M., Fjellsbø, L.M., Marano, F., Boland, S., 2013. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay

- processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology* 0–0. doi:10.3109/17435390.2013.829590
- Guang, W., Ding, H., Czinn, S.J., Kim, K.C., Blanchard, T.G., Lillehoj, E.P., 2010. Muc1 Cell Surface Mucin Attenuates Epithelial Inflammation in Response to a Common Mucosal Pathogen. *J. Biol. Chem.* 285, 20547–20557. doi:10.1074/jbc.M110.121319
- Gupta, S.M., Tripathi, M., 2011. A review of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chin. Sci. Bull.* 56, 1639–1657. doi:10.1007/s11434-011-4476-1
- Gurr, J.-R., Wang, A.S.S., Chen, C.-H., 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. doi:10.1016/j.tox.2005.05.007
- Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2004. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.* 5, 21–53.
- Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I.R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J., Mahmoudi, M., 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 30, 499–511. doi:10.1016/j.tibtech.2012.06.004
- Halamoda Kenzaoui, B., Chapuis Bernasconi, C., Guney-Ayra, S., Juillerat-Jeanneret, L., 2012. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *Biochem. J.* 441, 813–821. doi:10.1042/BJ20111252
- Hanaor, D.A.H., Sorrell, C.C., 2010. Review of the anatase to rutile phase transformation. *J. Mater. Sci.* 46, 855–874. doi:10.1007/s10853-010-5113-0
- Hansen, G.H., Rasmussen, K., Niels-Christiansen, L.-L., Danielsen, E.M., 2009. Endocytic trafficking from the small intestinal brush border probed with FM dye. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297, G708–715. doi:10.1152/ajpgi.00192.2009
- Hansson, G.C., 2012. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr. Opin. Microbiol., Host—microbe interactions: bacteria* 15, 57–62. doi:10.1016/j.mib.2011.11.002
- Harris, H., 1990. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186, 133–150. doi:10.1016/0009-8981(90)90031-M
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G.S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S.-I., Lowe, A.W., Itoh, K., Kiyono, H., Ohno, H., 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462, 226–230. doi:10.1038/nature08529
- Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., Adams, R., Kato, M., Nelms, K.A., Hong, N.A., Florin, T.H.J., Goodnow, C.C., McGuckin, M.A., 2008. Aberrant Mucin Assembly in Mice Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Spontaneous Inflammation Resembling Ulcerative Colitis. *PLOS Med* 5, e54. doi:10.1371/journal.pmed.0050054

- Hediger, M.A., Cléménçon, B., Burrier, R.E., Bruford, E.A., 2013. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol. Aspects Med.* 34, 95–107. doi:10.1016/j.mam.2012.12.009
- Heiligtag, F.J., Niederberger, M., 2013. The fascinating world of nanoparticle research. *Mater. Today* 16, 262–271. doi:10.1016/j.mattod.2013.07.004
- Helander, H.F., Fändriks, L., 2014. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scand. J. Gastroenterol.* 49, 681–689. doi:10.3109/00365521.2014.898326
- Henderson, P., Stevens, C., 2012. The Role of Autophagy in Crohn’s Disease. *Cells* 1, 492–519. doi:10.3390/cells1030492
- Heppner, F.L., Christ, A.D., Klein, M.A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J.-P., Aguzzi, A., 2001. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat. Med.* 7, 976–977. doi:10.1038/nm0901-976
- Herrmann, J.-M., 1999. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catal. Today* 53, 115–129. doi:10.1016/S0920-5861(99)00107-8
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C.G., Lipka, E., Amidon, G.L., Langguth, P., 2000. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *J. Pharm. Sci.* 89, 63–75. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6
- Hinderliter, P.M., Minard, K.R., Orr, G., Chrisler, W.B., Thrall, B.D., Pounds, J.G., Teeguarden, J.G., 2010. ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 36. doi:10.1186/1743-8977-7-36
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H.-C., Nadeau, W.J., McCormick, B.A., Podolsky, D.K., 2003. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 993–1000. doi:10.1053/gast.2003.50153
- Hosomi, S., Kaser, A., Blumberg, R.S., 2015. Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 31, 81–88. doi:10.1097/MOG.0000000000000144
- Hou, J.K., Abraham, B., El-Serag, H., 2011. Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 563–573. doi:10.1038/ajg.2011.44
- Hummel, T.Z., Kindermann, A., Stokkers, P.C.F., Benninga, M.A., ten Kate, F.J.W., 2014. Exogenous Pigment in Peyer Patches of Children Suspected of Having IBD: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 58, 477–480. doi:10.1097/MPG.0000000000000221
- Hussain, S., Thomassen, L.C., Ferecatu, I., Borot, M.-C., Andreau, K., Martens, J.A., Fleury, J., Baeza-Squiban, A., Marano, F., Boland, S., 2010. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 10. doi:10.1186/1743-8977-7-10
- Hussain, S., Vanoirbeek, J.A.J., Hoet, P.H.M., 2012. Interactions of nanomaterials with the immune system. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 4, 169–183. doi:10.1002/wnan.166

- IARC, 2010. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans :VOLUME 93, Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc.
- INRS, 2013. TiO<sub>2</sub>.
- Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S.E., Martin, A., Philpott, D.J., 2014. The Multifaceted Role of the Intestinal Microbiota in Colon Cancer. *Mol. Cell* 54, 309–320. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.039
- Iwashita, J., Sato, Y., Sugaya, H., Takahashi, N., Sasaki, H., Abe, T., 2003. mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF- $\alpha$  through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells. *Immunol. Cell Biol.* 81, 275–282. doi:10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01163.x
- Janer, G., Mas del Molino, E., Fernández-Rosas, E., Fernández, A., Vázquez-Campos, S., 2014. Cell uptake and oral absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 228, 103–110. doi:10.1016/j.toxlet.2014.04.014
- Jani, P.U., McCarthy, D.E., Florence, A.T., 1994. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *Int. J. Pharm.* 105, 157–168. doi:10.1016/0378-5173(94)90461-8
- Ji, L., Li, H., Gao, P., Shang, G., Zhang, D.D., Zhang, N., Jiang, T., 2013. Nrf2 Pathway Regulates Multidrug-Resistance-Associated Protein 1 in Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0063404
- Jia, F., Sun, Z., Yan, X., Zhou, B., Wang, J., 2014. Effect of pubertal nano-TiO<sub>2</sub> exposure on testosterone synthesis and spermatogenesis in mice. *Arch. Toxicol.* 88, 781–788. doi:10.1007/s00204-013-1167-5
- Johansson, M.E.V., 2012. Fast Renewal of the Distal Colonic Mucus Layers by the Surface Goblet Cells as Measured by In Vivo Labeling of Mucin Glycoproteins. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0041009
- Johansson, M.E.V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Subramani, D.B., Holmén-Larsson, J.M., Thomsson, K.A., Bergström, J.H., Post, S. van der, Rodriguez-Piñeiro, A.M., Sjövall, H., Bäckström, M., Hansson, G.C., 2011a. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3635–3641. doi:10.1007/s00018-011-0822-3
- Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., Hansson, G.C., 2011b. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4659–4665. doi:10.1073/pnas.1006451107
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., Hansson, G.C., 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 352–361. doi:10.1038/nrgastro.2013.35
- Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V., 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. Part. *Fibre Toxicol.* 6, 33. doi:10.1186/1743-8977-6-33
- Jones, K., Morton, J., Smith, I., Jurkschat, K., Harding, A.-H., Evans, G., 2015. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 233, 95–101. doi:10.1016/j.toxlet.2014.12.005

- Jovanović, B., 2015. Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 11, 10–20. doi:10.1002/ieam.1571
- Jugan, M.-L., Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., Carriere, M., 2011. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology* 6, 501–513. doi:10.3109/17435390.2011.587903
- Juge, N., 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* 20, 30–39. doi:10.1016/j.tim.2011.10.001
- Jung, C., Hugot, J.-P., Barreau, F., 2010. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int. J. Inflamm.* 2010. doi:10.4061/2010/823710
- Karam, S.M., 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 4, D286–298.
- Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S., 2008. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743–756. doi:10.1016/j.cell.2008.07.021
- Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R.S., 2010. Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101225
- Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C.S., Labosky, P.A., Yang, V.W., Kaestner, K.H., 2002. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 129, 2619–2628.
- Kazak, L., Reyes, A., Holt, I.J., 2012. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 659–671. doi:10.1038/nrm3439
- Kernéis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.-P., Pringault, E., 1997. Conversion by Peyer's Patch Lymphocytes of Human Enterocytes into M Cells that Transport Bacteria. *Science* 277, 949–952. doi:10.1126/science.277.5328.949
- Kiesler, P., Fuss, I.J., Strober, W., 2015. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *CMGH Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 154–170. doi:10.1016/j.jcmgh.2015.01.006
- Kilcoyne, M., Gerlach, J.Q., Farrell, M.P., Bhavanandan, V.P., Joshi, L., 2011. Periodic acid–Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format. *Anal. Biochem.* 416, 18–26. doi:10.1016/j.ab.2011.05.006
- Kim, M., Osone, S., Kim, T., Higashi, H., Seto, T., 2016. Synthesis of Nanoparticles by Laser Ablation: A Review. *KONA Powder Part. J. advpub.* doi:10.14356/kona.2017009
- Kim, S.A., Tai, C.-Y., Mok, L.-P., Mosser, E.A., Schuman, E.M., 2011. Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell–cell junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9857–9862. doi:10.1073/pnas.1019003108
- Kim, S.-H., Jang, Y.-S., 2014. Antigen targeting to M cells for enhancing the efficacy of mucosal vaccines. *Exp. Mol. Med.* 46, e85. doi:10.1038/emm.2013.165
- Kim, S.-H., Jung, D.-I., Yang, I.-Y., Kim, J., Lee, K.-Y., Nochi, T., Kiyono, H., Jang, Y.-S., 2011. M cells expressing the complement C5a receptor are efficient

- targets for mucosal vaccine delivery. *Eur. J. Immunol.* 41, 3219–3229. doi:10.1002/eji.201141592
- Kim, Y.S., Ho, S.B., 2010. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319–330. doi:10.1007/s11894-010-0131-2
- Kiwi, J., Rtimi, S., Sanjines, R., Pulgarin, C., 2014. TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-Doped Films Able to Kill Bacteria by Contact: New Evidence for the Dynamics of Bacterial Inactivation in the Dark and under Light Irradiation. *Int. J. Photoenergy* 2014, e785037. doi:10.1155/2014/785037
- Klausner, R., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116, 1071–1080.
- Klinken, B.J.-W. van, Oussoren, E., Weenink, J.-J., Strous, G.J., Büller, H.A., Dekker, J., Einerhand, A.W.C., 1996. The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconj. J.* 13, 757–768. doi:10.1007/BF00702340
- Koeneman, B.A., Zhang, Y., Westerhoff, P., Chen, Y., Crittenden, J.C., Capco, D.G., 2009. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol. Toxicol.* 26, 225–238. doi:10.1007/s10565-009-9132-z
- Korkaya, H., Wicha, M.S., 2010. Cancer stem cells: nature versus nurture. *Nat. Cell Biol.* 12, 419–421. doi:10.1038/ncb0510-419
- Koropatkin, N.M., Cameron, E.A., Martens, E.C., 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 323–335. doi:10.1038/nrmicro2746
- Koutroubakis, I., Manousos, O., Meuwissen, S., Pena, A., 1995. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology.* 43, 381–393.
- Krüger, K., Cossais, F., Neve, H., Klempt, M., 2014. Titanium dioxide nanoparticles activate IL8-related inflammatory pathways in human colonic epithelial Caco-2 cells. *J. Nanoparticle Res.* 16, 1–12. doi:10.1007/s11051-014-2402-6
- Kumar, A., Pandey, A.K., Singh, S.S., Shanker, R., Dhawan, A., 2011. Engineered ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1872–1881. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.025
- Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Wirtz, D., Hanes, J., 2009. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 86–100. doi:10.1016/j.addr.2008.09.012
- Lautenschläger, C., Schmidt, C., Fischer, D., Stallmach, A., 2014. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014 Editor's Collection 71, 58–76. doi:10.1016/j.addr.2013.10.001
- Lazzeri, M., Vittadini, A., Selloni, A., 2001. Structure and energetics of stoichiometric TiO<sub>2</sub> anatase surfaces. *Phys. Rev. B* 63, 155409. doi:10.1103/PhysRevB.63.155409
- Le Ferrec, 2001. In *Vitro Models of the Intestinal Barrier*.
- Lea, T., 2015. Caco-2 Cell Line, in: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing, pp. 103–111.

- Lee, J.B., Son, S.H., Park, M.C., Kim, T.H., Kim, M.G., Yoo, S.D., Kim, S., n.d. A novel in vitro permeability assay using three-dimensional cell culture system. *J. Biotechnol.* doi:10.1016/j.jbiotec.2014.12.019
- Lees, C.W., Barrett, J.C., Parkes, M., Satsangi, J., 2011. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 60, 1739–1753. doi:10.1136/gut.2009.199679
- Leonard, F., Collnot, E.-M., Lehr, C.-M., 2010. A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells To Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro. *Mol. Pharm.* 7, 2103–2119. doi:10.1021/mp1000795
- Lerner, A., Matthias, T., n.d. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* doi:10.1016/j.autrev.2015.01.009
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol., Membrane Transporters in Toxicology* 204, 216–237. doi:10.1016/j.taap.2004.10.012
- Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M.P., Åberg, C., Dawson, K.A., Salvati, A., 2012. Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. *ACS Nano* 6, 5845–5857. doi:10.1021/nn300223w
- Lesniak, A., Salvati, A., Santos-Martinez, M.J., Radomski, M.W., Dawson, K.A., Åberg, C., 2013. Nanoparticle Adhesion to the Cell Membrane and Its Effect on Nanoparticle Uptake Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 1438–1444. doi:10.1021/ja309812z
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A., 1990. Growth Adaptation to Methotrexate of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells Is Associated with Their Ability to Differentiate into Columnar Absorptive and Mucus-secreting Cells. *Cancer Res.* 50, 6334–6343.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D., Gum, J.R., Kim, Y.S., Real, F.X., Zweibaum, A., 1993. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J. Cell Sci.* 106, 771–783.
- Lev, R., Spicer, S.S., 1965. A Histochemical Comparison of Human Epithelial Mucins in Normal and in Hypersecretory States Including Pancreatic Cystic Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 46, 23–47.
- Li, B., Ze, Y., Sun, Q., Zhang, T., Sang, X., Cui, Y., Wang, X., Gui, S., Tan, D., Zhu, M., Zhao, X., Sheng, L., Wang, L., Hong, F., Tang, M., 2013. Molecular Mechanisms of Nanosized Titanium Dioxide-Induced Pulmonary Injury in Mice. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0055563
- Li, M., Yin, J.-J., Wamer, W.G., Lo, Y.M., 2014. Mechanistic characterization of titanium dioxide nanoparticle-induced toxicity using electron spin resonance. *J. Food Drug Anal., Nanomaterials - Toxicology and Medical Applications* 22, 76–85. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.006
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., Alvarez, P.J.J., 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Res.* 42, 4591–4602. doi:10.1016/j.watres.2008.08.015

- Li, Q., Shu, Y., 2014. Role of solute carriers in response to anticancer drugs. *Mol. Cell. Ther.* 2. doi:10.1186/2052-8426-2-15
- Limbergen, J.V., Wilson, D.C., Satsangi, J., 2009. The Genetics of Crohn's Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10, 89–116. doi:10.1146/annurev-genom-082908-150013
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., Walter, P., 2007. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318, 944–949. doi:10.1126/science.1146361
- Lin, L., Yee, S.W., Kim, R.B., Giacomini, K.M., 2015. SLC Transporters as Therapeutic Targets: Emerging Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 543–560. doi:10.1038/nrd4626
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715. doi:10.1038/362709a0
- Liu, H., Ma, L., Liu, J., Zhao, J., Yan, J., Hong, F., 2010. Toxicity of nano-anatase TiO<sub>2</sub> to mice: Liver injury, oxidative stress. *Toxicol. Environ. Chem.* 92, 175–186. doi:10.1080/02772240902732530
- Liu, S., Xu, L., Zhang, T., Ren, G., Yang, Z., 2010. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology* 267, 172–177. doi:10.1016/j.tox.2009.11.012
- Lomer, M.C., Harvey, R.S., Evans, S.M., Thompson, R.P., Powell, J.J., 2001. Efficacy and tolerability of a low microparticle diet in a double blind, randomized, pilot study in Crohn's disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 101–106.
- Lomer, M.C.E., Grainger, S.L., Ede, R., Catterall, A.P., Greenfield, S.M., Cowan, R.E., Vicary, F.R., Jenkins, A.P., Fidler, H., Harvey, R.S., Ellis, R., McNair, A., Ainley, C.C., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., 2005. Lack of efficacy of a reduced microparticle diet in a multi-centred trial of patients with active Crohn's disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 377–384.
- Lomer, M.C.E., Hutchinson, C., Volkert, S., Greenfield, S.M., Catterall, A., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., 2004. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br. J. Nutr.* 92, 947. doi:10.1079/BJN20041276
- Lomer, M.C.E., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., 2002. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc. Nutr. Soc.* 61, 123–130. doi:10.1079/PNS2001134
- Loo, T.W., Bartlett, M.C., Clarke, D.M., 2005. Rescue of Folding Defects in ABC Transporters Using Pharmacological Chaperones. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 501–507. doi:10.1007/s10863-005-9499-3
- Lopes, V.R., Loitto, V., Audinot, J.-N., Bayat, N., Gutleb, A.C., Cristobal, S., 2016. Dose-dependent autophagic effect of titanium dioxide nanoparticles in human HaCaT cells at non-cytotoxic levels. *J. Nanobiotechnology* 14. doi:10.1186/s12951-016-0174-0
- Louis, P., Hold, G.L., Flint, H.J., 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 661–672. doi:10.1038/nrmicro3344
- Lu, S., Gough, A.W., Bobrowski, W.F., Stewart, B.H., 1996. Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite

- underlying physiological and ultrastructural changes. *J. Pharm. Sci.* 85, 270–273. doi:10.1021/js950269u
- Lubick, N., 2008. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both? *Environ. Sci. Technol.* 42, 8617–8617. doi:10.1021/es8026314
- Luo, C., Puigserver, P., 2016. Stem cells: Dietary fat promotes intestinal dysregulation. *Nature* 531, 42–43. doi:10.1038/531042a
- Luttrell, T., Halpegamage, S., Tao, J., Kramer, A., Sutter, E., Batzill, M., 2014. Why is anatase a better photocatalyst than rutile? - Model studies on epitaxial TiO<sub>2</sub> films. *Sci. Rep.* 4. doi:10.1038/srep04043
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., Mahajan, A., 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 6, 666–677. doi:10.1038/mi.2013.30
- MacAdam, A., 1993. The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev., Relevance of Mucus to Advanced Drug Delivery* 11, 201–220. doi:10.1016/0169-409X(93)90010-2
- MacNicoll, A., 2015. A study of the uptake and biodistribution of nano-titanium dioxide using in vitro and in vivo models of oral intake. doi:10.1007/s11051-015-2862-3
- Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., Lamarre, A., 2001. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.* 3, 1021–1035. doi:10.1016/S1286-4579(01)01460-5
- Magdolenova, Z., Bilaničová, D., Pojana, G., Fjellsbø, L.M., 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, 455–464. doi:10.1039/C2EM10746E
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., Dusinska, M., 2013. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 8, 233–278. doi:10.3109/17435390.2013.773464
- Maher, J.M., Cheng, X., Slitt, A.L., Dieter, M.Z., Klaassen, C.D., 2005. Induction of the Multidrug Resistance-Associated Protein Family of Transporters by Chemical Activators of Receptor-Mediated Pathways in Mouse Liver. *Drug Metab. Dispos.* 33, 956–962. doi:10.1124/dmd.105.003798
- Maher, J.M., Dieter, M.Z., Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Guo, G., Tanaka, Y., Scheffer, G.L., Chan, J.Y., Manautou, J.E., Chen, Y., Dalton, T.P., Yamamoto, M., Klaassen, C.D., 2007. Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor- $\kappa$ B-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology* 46, 1597–1610. doi:10.1002/hep.21831
- Mahler, G.J., Esch, M.B., Tako, E., Southard, T.L., Archer, S.D., Glahn, R.P., Shuler, M.L., 2012. Oral exposure to polystyrene nanoparticles affects iron absorption. *Nat. Nanotechnol.* 7, 264–271. doi:10.1038/nnano.2012.3
- Mahler, G.J., Shuler, M.L., Glahn, R.P., 2009. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *J. Nutr. Biochem.* 20, 494–502. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.05.006

- Maness, P.-C., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Jacoby, W.A., 1999. Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO<sub>2</sub> Reaction: toward an Understanding of Its Killing Mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4094–4098.
- Mashimo, H., Wu, D.-C., Podolsky, D.K., Fishman, M.C., 1996. Impaired Defense of Intestinal Mucosa in Mice Lacking Intestinal Trefoil Factor. *Science* 274, 262–265. doi:10.1126/science.274.5285.262
- Masuda, K., Kajikawa, A., Igimi, S., 2011. Establishment and Evaluation of an in vitro M Cell Model using C2BBel Cells and Raji Cells. *Biosci. Microflora* 30, 37–44. doi:10.12938/bifidus.30.37
- Matés, >J. M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83–104. doi:10.1016/S0300-483X(00)00306-1
- Maubon, N., Le Vee, M., Fossati, L., Audry, M., Le Ferrec, E., Bolze, S., Fardel, O., 2007. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21, 659–663. doi:10.1111/j.1472-8206.2007.00550.x
- McCracken, C., 2015. Toxicity of Food-Relevant Nanoparticles in Intestinal Epithelial Models.
- McCracken, C., Dutta, P.K., Waldman, W.J., 2016. Critical assessment of toxicological effects of ingested nanoparticles. *Environ. Sci. Nano.* doi:10.1039/C5EN00242G
- McCracken, C., Zane, A., Knight, D.A., Dutta, P.K., Waldman, W.J., 2013. Minimal Intestinal Epithelial Cell Toxicity in Response to Short- and Long-Term Food-Relevant Inorganic Nanoparticle Exposure. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1514–1525. doi:10.1021/tx400231u
- McCracken, V.J., Lorenz, R.G., 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell. Microbiol.* 3, 1–11. doi:10.1046/j.1462-5822.2001.00090.x
- McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M., Kiyono, H., 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10, 75–88. doi:10.1016/0264-410X(92)90021-B
- McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H.J., Radford-Smith, G.Dp., 2009. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. [Review]. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 100–113. doi:10.1002/ibd.20539
- McGuckin, M.A., Eri, R.D., Das, I., Lourie, R., Florin, T.H., 2011a. Intestinal secretory cell ER stress and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1081–1085. doi:10.1042/BST0391081
- McGuckin, M.A., Eri, R.D., Das, I., Lourie, R., Florin, T.H., 2010. ER stress and the unfolded protein response in intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G820–G832. doi:10.1152/ajpgi.00063.2010
- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H., 2011b. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 265–278. doi:10.1038/nrmicro2538
- McMichael, A.J., McCall, M.G., Hartshore, J.M., Woodings, T.L., 1980. Patterns of gastro-intestinal cancer in european migrants to Australia: The role of dietary change. *Int. J. Cancer* 25, 431–437. doi:10.1002/ijc.2910250402

- Meijer, G.A., Schroeijers, A.B., Flens, M.J., Meuwissen, S.G., Valk, P. van der, Baak, J.P., Scheper, R.J., 1999. Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* 52, 450–454. doi:10.1136/jcp.52.6.450
- Mercier-Bonin, M., Despax, B., Raynaud, P., Houdeau, E., Thomas, M., 2016. Exposition orale et devenir dans l'intestin des nanoparticules alimentaires : exemple de l'argent et du dioxyde de titane. *Cah. Nutr. Diététique* 51, 195–203. doi:10.1016/j.cnd.2016.03.001
- Miller, H., Zhang, J., KuoLee, R., Patel, G.B., Chen, W., 2007. Intestinal M cells: The fallible sentinels? *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 1477–1486. doi:10.3748/wjg.v13.i10.1477
- Ming, S.-C., 1998. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric Cancer* 1, 31–50. doi:10.1007/s101200050053
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., Kaplan, G.G., 2012. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* 142, 46–54.e42. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001
- Monopoli, M.P., Aberg, C., Salvati, A., Dawson, K.A., 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* 7, 779–786. doi:10.1038/nnano.2012.207
- Mortensen, N.P., Hurst, G.B., Wang, W., Foster, C.M., Nallathamby, P.D., Retterer, S.T., 2013. Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity. *Nanoscale* 5, 6372. doi:10.1039/c3nr33280b
- Mowat, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341. doi:10.1038/nri1057
- Moyes, S.M., Smyth, S.H., Shipman, A., Long, S., Morris, J.F., Carr, K.E., 2007. Parameters influencing intestinal epithelial permeability and microparticle uptake in vitro. *Int. J. Pharm.* 337, 133–141. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.12.036
- Napierska, D., Thomassen, L.C., Lison, D., Martens, J.A., Hoet, P.H., 2010. The nanosilica hazard: another variable entity. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 39. doi:10.1186/1743-8977-7-39
- Nath, S., Daneshvar, K., Roy, L.D., Grover, P., Kidiyoor, A., Mosley, L., Sahraei, M., Mukherjee, P., 2013. MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes. *Oncogenesis* 2, e51. doi:10.1038/oncsis.2013.16
- Nath, S., Mukherjee, P., 2014. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 20, 332–342. doi:10.1016/j.molmed.2014.02.007
- Natoli, M., Leoni, B.D., D'Agnano, I., Zucco, F., Felsani, A., 2012. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol. In Vitro, The LIINTOP project: Optimisation of liver and intestine in vitro models for pharmacokinetics and pharmacodynamics studies* 26, 1243–1246. doi:10.1016/j.tiv.2012.03.009

- Nguyen, T., Chin, W.C., Verdugo, P., 1998. Role of Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> ion exchange in intracellular storage and release of Ca<sup>2+</sup>. *Nature* 395, 908–912. doi:10.1038/27686
- Nigam, S.K., 2015. What do drug transporters really do? *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 29–44. doi:10.1038/nrd4461
- Nogueira, C.M., de Azevedo, W.M., Dagli, M.L.Z., Toma, S.H., Leite, A.Z. de A., Lordello, M.L., Nishitokukado, I., Ortiz-Agostinho, C.L., Duarte, M.I.S., Ferreira, M.A., Sipahi, A.M., 2012. Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World J. Gastroenterol. WJG* 18, 4729–4735. doi:10.3748/wjg.v18.i34.4729
- Nunes, T., Bernardazzi, C., de Souza, H.S., Nunes, T., Bernardazzi, C., de Souza, H.S., 2014. Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium, Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium. *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* 2014, 2014, e218493. doi:10.1155/2014/218493, 10.1155/2014/218493
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.-P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H., 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606. doi:10.1038/35079114
- Oh, N., Park, J.-H., 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* 9, 51–63. doi:10.2147/IJN.S26592
- Ohno, H., 2016. Intestinal M cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 159, 151–160. doi:10.1093/jb/mvv121
- Ohno, H., Hase, K., 2010. Glycoprotein 2 (GP2). *Gut Microbes* 1, 407–410. doi:10.4161/gmic.1.6.14078
- Ohno, T., Sarukawa, K., Tokieda, K., Matsumura, M., 2001. Morphology of a TiO<sub>2</sub> Photocatalyst (Degussa, P-25) Consisting of Anatase and Rutile Crystalline Phases. *J. Catal.* 203, 82–86. doi:10.1006/jcat.2001.3316
- Onishchenko, G.E., Erokhina, M.V., Abramchuk, S.S., Shaitan, K.V., Raspopov, R.V., Smirnova, V.V., Vasilevskaya, L.S., Gmshinski, I.V., Kirpichnikov, M.P., Tutelyan, V.A., 2012. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Small Intestinal Mucosa in Rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 154, 265–270. doi:10.1007/s10517-012-1928-9
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W.M., Belzer, C., 2012. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00104
- Oyadomari, S., Mori, M., 2003. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11, 381–389. doi:10.1038/sj.cdd.4401373
- Panieri, E., Gogvadze, V., Norberg, E., Venkatesh, R., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2013. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic. Biol. Med.* 57, 176–187. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.024

- Papineni, R.V.L., Umar, S., 2013. Spot light on intestinal microbiota. translational cancer research. doi:doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.12
- Paszkiwicz-Gadek, A., Porowska, H., Lemancewicz, D., Wolczynski, S., Gindzienski, A., 2006. The influence of N- and O-glycosylation inhibitors on the glycosylation profile of cellular membrane proteins and adhesive properties of carcinoma cell lines. *Int. J. Mol. Med.* doi:10.3892/ijmm.17.4.669
- Paul, B., Barnes, S., Demark-Wahnefried, W., Morrow, C., Salvador, C., Skibola, C., Tollefsbol, T.O., 2015. Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. *Clin. Epigenetics* 7, 1–11. doi:10.1186/s13148-015-0144-7
- Pautrat, J.-L., 2011. Nanosciences: Evolution or revolution? *Comptes Rendus Phys., Nanoscience and nanotechnologies: hopes and concerns* Nanoscience et nanotechnologies: espérances et inquiétudes 12, 605–613. doi:10.1016/j.crhy.2011.06.003
- Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M.H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñero, A.M., Nyström, E.E.L., Wising, C., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* 260, 8–20. doi:10.1111/imr.12182
- Pele, L.C., Thoree, V., Bruggraber, S.F., Koller, D., Thompson, R.P., Lomer, M.C., Powell, J.J., 2015. Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Part. Fibre Toxicol.* 12. doi:10.1186/s12989-015-0101-9
- Peltekova, V.D., Wintle, R.F., Rubin, L.A., Amos, C.I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Oene, M.V., Cescon, D., Greenberg, G., Griffiths, A.M., St George-Hyslop, P.H., Siminovitch, K.A., 2004. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat. Genet.* 36, 471–475. doi:10.1038/ng1339
- Periasamy, V.S., Athinarayanan, J., Al-Hadi, A.M., Juhaimi, F.A., Mahmoud, M.H., Alshatwi, A.A., 2015. Identification of titanium dioxide nanoparticles in food products: Induce intracellular oxidative stress mediated by TNF and CYP1A genes in human lung fibroblast cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 176–186. doi:10.1016/j.etap.2014.11.021
- Peters, R.J.B., Bouwmeester, H., Gottardo, S., Amenta, V., Arena, M., Brandhoff, P., Marvin, H.J.P., Mech, A., Moniz, F.B., Pesudo, L.Q., Rauscher, H., Schoonjans, R., Undas, A.K., Vettori, M.V., Weigel, S., Aschberger, K., 2016. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. *Trends Food Sci. Technol.* 54, 155–164. doi:10.1016/j.tifs.2016.06.008
- Peters, R.J.B., van Bommel, G., Herrera-Rivera, Z., Helsper, H.P.F.G., Marvin, H.J.P., Weigel, S., Tromp, P.C., Oomen, A.G., Rietveld, A.G., Bouwmeester, H., 2014. Characterization of Titanium Dioxide Nanoparticles in Food Products: Analytical Methods To Define Nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 62, 6285–6293. doi:10.1021/jf5011885
- Petersen, E.J., Nelson, B.C., 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 613–650. doi:10.1007/s00216-010-3881-7

- Petersen, E.J., Reipa, V., Watson, S.S., Stanley, D.L., Rabb, S.A., Nelson, B.C., 2014. DNA Damaging Potential of Photoactivated P25 Titanium Dioxide Nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1877–1884. doi:10.1021/tx500340v
- Peterson, D.A., Frank, D.N., Pace, N.R., Gordon, J.I., 2008. Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe* 3, 417–427. doi:10.1016/j.chom.2008.05.001
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153. doi:10.1038/nri3608
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36–e36. doi:10.1093/nar/30.9.e36
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.
- Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K., Girardin, S.E., 2014. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 9–23. doi:10.1038/nri3565
- Piana, C., Wirth, M., Gerbes, S., Viernstein, H., Gabor, F., Toegel, S., 2008. Validation of reference genes for qPCR studies on Caco-2 cell differentiation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1187–1192. doi:10.1016/j.ejpb.2008.03.008
- Pietrojusti, A., Magrini, A., Campagnolo, L., 2016. New frontiers in nanotoxicology: Gut microbiota/microbiome-mediated effects of engineered nanomaterials. *Toxicol. Appl. Pharmacol., The First Decade of Nanotoxicology: Achievements, Disappointments and Lessons* 299, 90–95. doi:10.1016/j.taap.2015.12.017
- Pignon, B., Maskrot, H., Guyot Ferreol, V., Leconte, Y., Coste, S., Gervais, M., Pouget, T., Reynaud, C., Tranchant, J.-F., Herlin-Boime, N., 2008. Versatility of Laser Pyrolysis Applied to the Synthesis of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles – Application to UV Attenuation. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2008, 883–889. doi:10.1002/ejic.200700990
- Pinto, D., Clevers, H., 2005. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res., Molecular Control of Stem Cell Differentiation* 306, 357–363. doi:10.1016/j.yexcr.2005.02.022
- Ponchel, G., Irache, J.-M., 1998. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev., Oral Particulates* 34, 191–219. doi:10.1016/S0169-409X(98)00040-4
- Ponder, A., Long, M.D., 2013. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin. Epidemiol.* 5, 237–247. doi:10.2147/CLEP.S33961
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., Arnaud, P., 2001. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *J. Pharm. Sci.* 90, 1608–1619. doi:10.1002/jps.1111
- Potet, F., Florent, C., Benhamou, E., Cabrières, F., Bommelaer, G., Hostein, J., Bigard, M.A., Bruley De Varannes, S., Colombel, J.F., Rampal, P., 1993.

- Chronic gastritis: prevalence in the French population. *CIRIG. Gastroentérologie Clin. Biol.* 17, 103–108.
- Powell, J.J., Faria, N., Thomas-McKay, E., Pele, L.C., 2010. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J. Autoimmun., The Environment, Geopidemiology and Autoimmune Disease* 34, J226–J233. doi:10.1016/j.jaut.2009.11.006
- Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., Cameán, A.M., 2010. Microcystin-LR induces toxic effects in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Arch. Toxicol.* 84, 405–410. doi:10.1007/s00204-010-0513-0
- Pujalté, I., Passagne, I., Daculsi, R., Portal, C. de, Ohayon-Courtès, C., L'Azou, B., 2015. Cytotoxic effects and cellular oxidative mechanisms of metallic nanoparticles on renal tubular cells: impact of particle solubility. *Toxicol. Res.* 4, 409–422. doi:10.1039/C4TX00184B
- Rajakumar, G., Rahuman, A.A., Roopan, S.M., Khanna, V.G., Elango, G., Kamaraj, C., Zahir, A.A., Velayutham, K., 2012. Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 91, 23–29. doi:10.1016/j.saa.2012.01.011
- Rajilić-Stojanović, M., Shanahan, F., Guarner, F., de Vos, W.M., 2013. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 481–488. doi:10.1097/MIB.0b013e31827fec6d
- Raliya, R., Biswas, P., Tarafdar, J.C., 2015. TiO<sub>2</sub> nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L.). *Biotechnol. Rep.* 5, 22–26. doi:10.1016/j.btre.2014.10.009
- Ramachandran, A., Madesh, M., Balasubramanian, K.A., 2000. Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 109–120. doi:10.1046/j.1440-1746.2000.02059.x
- Rang, H., Ritter, J., Flower, R., Henderson, H., 2011. *Rang & Dale's Pharmacology*, 7th Edition. Elsevier.
- Ranjan, S., Dasgupta, N., Chakraborty, A.R., Samuel, S.M., Ramalingam, C., Shanker, R., Kumar, A., 2014. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. *J. Nanoparticle Res.* 16, 1–23. doi:10.1007/s11051-014-2464-5
- Reboldi, A., Cyster, J.G., 2016. Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunol. Rev.* 271, 230–245. doi:10.1111/imr.12400
- Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F., Jha, A.N., 2008. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 640, 113–122. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010
- Reis, C.A., David, L., Correa, P., Carneiro, F., Bolós, C. de, Garcia, E., Mandel, U., Clausen, H., Sobrinho-Simões, M., 1999. Intestinal Metaplasia of Human Stomach Displays Distinct Patterns of Mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) Expression. *Cancer Res.* 59, 1003–1007.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

- Reyes-Coronado, D., Rodríguez-Gattorno, G., Espinosa-Pesqueira, M.E., Cab, C., Coss, R. de, Oskam, G., 2008. Phase-pure TiO<sub>2</sub> nanoparticles: anatase, brookite and rutile. *Nanotechnology* 19, 145605. doi:10.1088/0957-4484/19/14/145605
- Rieux, A. des, Ragnarsson, E.G.E., Gullberg, E., Pr at, V., Schneider, Y.-J., Artursson, P., 2005. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25, 455–465. doi:10.1016/j.ejps.2005.04.015
- Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., Belluzzi, A., Roda, E., 2010. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol. WJG* 16, 4264–4271. doi:10.3748/wjg.v16.i34.4264
- Rogers, D.F., 2007a. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir. Care* 52, 1134–1146; discussion 1146–1149.
- Rogers, D.F., 2007b. Mucoactive Agents for Airway Mucus Hypersecretory Diseases. *Respir. Care* 52, 1176–1197.
- Roggenbuck, D., Hausdorf, G., Martinez-Gamboa, L., Reinhold, D., B ttner, T., Jungblut, P.R., Porstmann, T., Laass, M.W., Henker, J., B ning, C., Feist, E., Conrad, K., 2009. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn’s disease. *Gut* 58, 1620–1628. doi:10.1136/gut.2008.162495
- Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313–323. doi:10.1038/nri2515
- Rousset, M., 1986. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68, 1035–1040. doi:10.1016/S0300-9084(86)80177-8
- Saber, A.T., Jensen, K.A., Jacobsen, N.R., Birkedal, R., Mikkelsen, L., M ller, P., Loft, S., Wallin, H., Vogel, U., 2012. Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology* 6, 453–471. doi:10.3109/17435390.2011.587900
- Sahu, K.K., Alex, T.C., Mishra, D., Agrawal, A., 2006. An overview on the production of pigment grade titania from titania-rich slag. *Waste Manag. Res.* 24, 74–79. doi:10.1177/0734242X06061016
- Sambuy, Y., Angelis, I.D., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., Zucco, F., 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26. doi:10.1007/s10565-005-0085-6
- Sanchez, M.C., 2015. Food Additives, in: *Food Law and Regulation for Non-Lawyers, Food Science Text Series*. Springer International Publishing, pp. 165–195.
- Sancho, E., Batlle, E., Clevers, H., 2003. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 763–770. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.012
- Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J., 2001. Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 11, 173–186. doi:10.1159/000047804

- Sayah, S., Leon, P., Chan, P., Fontaine, M., 1998. Les récepteurs des anaphylatoxines C3a (C3aR) et C5a (C5aR). *médecine/sciences* 14, 291. doi:10.4267/10608/1032
- Sayes, C.M., Wahi, R., Kurian, P.A., Liu, Y., West, J.L., Ausman, K.D., Warheit, D.B., Colvin, V.L., 2006. Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells. *Toxicol. Sci.* 92, 174–185. doi:10.1093/toxsci/kfj197
- Schanen, B.C., Karakoti, A.S., Seal, S., Drake, D.R., Warren, W.L., Self, W.T., 2009. Exposure to Titanium Dioxide Nanomaterials Provokes Inflammation of an in Vitro Human Immune Construct. *ACS Nano* 3, 2523–2532. doi:10.1021/nn900403h
- Scherz-Shouval, R., Elazar, Z., 2011. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 36, 30–38. doi:10.1016/j.tibs.2010.07.007
- Schimpel, C., Teubl, B., Absenger, M., Meindl, C., Fröhlich, E., Leitinger, G., Zimmer, A., Roblegg, E., 2014. Development of an Advanced Intestinal in Vitro Triple Culture Permeability Model To Study Transport of Nanoparticles. *Mol. Pharm.* 11, 808–818. doi:10.1021/mp400507g
- Schmitz, H., Barmeyer, C., Fromm, M., Runkel, N., Foss, H.-D., Bentzel, C.J., Riecken, E.-O., Schulzke, J.-D., 1999. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116, 301–309. doi:10.1016/S0016-5085(99)70126-5
- Scotto, K.W., 2003. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22, 7496–7511. doi:10.1038/sj.onc.1206950
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904. doi:10.1152/physrev.00045.2009
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164, 337–340. doi:10.1016/j.cell.2016.01.013
- Shah, A.A., 2009. Evaluation of Mucin Glycosylation as a barrier to drug uptake : a quantitative approach. NORTHEASTERN UNIVERSITY.
- Shah, P., Fritz, J.V., Glaab, E., Desai, M.S., Greenhalgh, K., Frachet, A., Niegowska, M., Estes, M., Jäger, C., Seguin-Devieux, C., Zenhausem, F., Wilmes, P., 2016. A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nat. Commun.* 7, 11535. doi:10.1038/ncomms11535
- Shelton, P., Jaiswal, A.K., 2013. The transcription factor NF-E2-related Factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J.* 27, 414–423. doi:10.1096/fj.12-217257
- Sheng, Y.H., Hasnain, S.Z., Florin, T.H.J., McGuckin, M.A., 2012. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27, 28–38. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06909.x
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 15. doi:10.1186/1743-8977-10-15
- Shkoda, A., Ruiz, P.A., Daniel, H., Kim, S.C., Rogler, G., Sartor, R.B., Haller, D., 2007. Interleukin-10 Blocked Endoplasmic Reticulum Stress in Intestinal

- Epithelial Cells: Impact on Chronic Inflammation. *Gastroenterology* 132, 190–207. doi:10.1053/j.gastro.2006.10.030
- Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L’Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., Carrière, M., 2008. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*, This issue includes: Proceedings of the Annual Congress of The British Toxicology Society 253, 137–146. doi:10.1016/j.tox.2008.09.007
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., Novak, S., 2011. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol. Oncol.* 45, 227–247. doi:10.2478/v10019-011-0037-0
- Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J.V., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J.C., Wolf, C.R., 2002. Mutations in APC, Kirstenras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9433–9438. doi:10.1073/pnas.122612899
- Smolkova, B., El Yamani, N., Collins, A.R., Gutleb, A.C., Dusinska, M., 2015. Nanoparticles in food. Epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. *Food Chem. Toxicol.* 77, 64–73. doi:10.1016/j.fct.2014.12.015
- Sommer, F., Bäckhed, F., 2013. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 227–238. doi:10.1038/nrmicro2974
- Song, B., Liu, J., Feng, X., Wei, L., Shao, L., 2015. A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 10, 342. doi:10.1186/s11671-015-1042-9
- Song, Chen, N., Liu, J.-H., Tang, H., Deng, X., Xi, W.-S., Han, K., Cao, A., Liu, Y., Wang, H., 2015. Biological effect of food additive titanium dioxide nanoparticles on intestine: an in vitro study. *J. Appl. Toxicol.* 35, 1169–1178. doi:10.1002/jat.3171
- Sonström, P., Bäumer, M., 2011. Supported colloidal nanoparticles in heterogeneous gas phase catalysis: on the way to tailored catalysts. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 19270. doi:10.1039/c1cp22048a
- Speckmann, B., Gerloff, K., Simms, L., Oancea, I., Shi, W., McGuckin, M.A., Radford-Smith, G., Khanna, K.K., 2014. Selenoprotein S is a marker but not a regulator of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 67, 265–277. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.001
- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J., 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J. Lab. Autom.* 20, 107–126. doi:10.1177/2211068214561025
- Srivastava, R.K., Rahman, Q., Kashyap, M.P., Singh, A.K., Jain, G., Jahan, S., Lohani, M., Lantow, M., Pant, A.B., 2013. Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 153–166. doi:10.1177/0960327112462725

- Stark, W.J., Stoessel, P.R., Wohlleben, W., Hafner, A., 2015. Industrial applications of nanoparticles. *Chem Soc Rev* 44, 5793–5805. doi:10.1039/C4CS00362D
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D., 1991. Vegetables, Fruit, and Cancer. I. *Epidemiology. Cancer Causes Control* 2, 325–357.
- Stern, S.T., Adisheshaiah, P.P., Crist, R.M., 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. Part. *Fibre Toxicol.* 9, 20. doi:10.1186/1743-8977-9-20
- Stolarczyk, E.I., Reiling, C.J., Paumi, C.M., 2011. Regulation of ABC Transporter Function Via Phosphorylation by Protein Kinases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 621–635.
- Strober, W., Fuss, I., Mannon, P., 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 117, 514–521. doi:10.1172/JCI30587
- Sugimoto, T., Zhou, X., Muramatsu, A., 2003. Synthesis of uniform anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles by gel–sol method: 3. Formation process and size control. *J. Colloid Interface Sci.* 259, 43–52. doi:10.1016/S0021-9797(03)00036-5
- Suran, M., 2014. A little hard to swallow? *EMBO Rep.* 15, 638–641. doi:10.15252/embr.201438925
- Susewind, J., Carvalho-Wodarz, C. de S., Repnik, U., Collnot, E.-M., Schneider-Daum, N., Griffiths, G.W., Lehr, C.-M., 2016. A 3D co-culture of three human cell lines to model the inflamed intestinal mucosa for safety testing of nanomaterials. *Nanotoxicology* 10, 53–62. doi:10.3109/17435390.2015.1008065
- Szakács, G., Váradi, A., Özvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox). *Drug Discov. Today* 13, 379–393. doi:10.1016/j.drudis.2007.12.010
- Tanoue, T., Nishitani, Y., Kanazawa, K., Hashimoto, T., Mizuno, M., 2008. In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 565–569. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.063
- Tarantini, A., Lancelot, R., Mourot, A., Lavault, M.-T., Casterou, G., Jarry, G., Hogeveen, K., Fessard, V., 2015. Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line. *Toxicol. In Vitro* 29, 398–407. doi:10.1016/j.tiv.2014.10.023
- Taupin, D.R., Kinoshita, K., Podolsky, D.K., 2000. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 799–804.
- Taurozzi, J.S., Hackley, V.A., Wiesner, M.R., 2010. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. *Nanotoxicology* 5, 711–729. doi:10.3109/17435390.2010.528846
- Tay, C.Y., Fang, W., Setyawati, M.I., Chia, S.L., Tan, K.S., Hong, C.H.L., Leong, D.T., 2014. Nano-hydroxyapatite and Nano-titanium Dioxide Exhibit Different Subcellular Distribution and Apoptotic Profile in Human Oral Epithelium. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 6248–6256. doi:10.1021/am501266a

- Tedja, R., Lim, M., Amal, R., 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. doi:10.1021/nn3004845
- Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S.K., Stauber, R.H., 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* 8, 772–781. doi:10.1038/nnano.2013.181
- Teoule, R., Bert, C., Bonicel, A., 1977. Thymine fragment damage retained in the DNA polynucleotide chain after gamma irradiation in aerated solutions. II. *Radiat. Res.* 72, 190–200.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005–L1028.
- Thia, K.T., Loftus, E.V., Sandborn, W.J., Yang, S.-K., 2008. An Update on the Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in Asia. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 3167–3182. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02158.x
- Thim, L., Madsen, F., Poulsen, S.S., 2002. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 519–527. doi:10.1046/j.1365-2362.2002.01014.x
- Thompson, A.I., Lees, C.W., 2011. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 831–848. doi:10.1002/ibd.21375
- Tian, H., Biehs, B., Chiu, C., Siebel, C.W., Wu, Y., Costa, M., de Sauvage, F.J., Klein, O.D., 2015. Opposing Activities of Notch and Wnt Signaling Regulate Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. *Cell Rep.* 11, 33–42. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.007
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J
- Torres, J., Danese, S., Colombel, J.-F., 2013. New therapeutic avenues in ulcerative colitis: thinking out of the box. *Gut* 62, 1642–1652. doi:10.1136/gutjnl-2012-303959
- Tossa, P., Roguet, T., Thoren, A.-C., Piotrowski, A., 2014. Potentiel génotoxique des nanomatériaux : où en est la recherche? *Environ. Risques Santé* 13, 113–122. doi:10.1684/ers.2014.0684
- Towner, R.R., Gray, J.M., Porter, L.M., 1988. International strategic minerals inventory summary report; titanium (USGS Numbered Series No. 930-G), Circular. U.S. Dept. of the Interior, Geological Survey,.
- Trabucchi, E., Mukenge, S., Baratti, C., Colombo, R., Fregoni, F., Montorsi, W., 1986. Differential diagnosis of Crohn's disease of the colon from ulcerative colitis: ultrastructure study with the scanning electron microscope. *Int. J. Tissue React.* 8, 79–84.
- Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., Schiestl, R.H., 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2496

- Tsuang, Y.-H., Sun, J.-S., Huang, Y.-C., Lu, C.-H., Chang, W.H.-S., Wang, C.-C., 2008. Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles. *Artif. Organs* 32, 167–174. doi:10.1111/j.1525-1594.2007.00530.x
- Urrutia-Ortega, I.M., Garduño-Balderas, L.G., Delgado-Buenrostro, N.L., Freyre-Fonseca, V., Flores-Flores, J.O., González-Robles, A., Pedraza-Chaverri, J., Hernández-Pando, R., Rodríguez-Sosa, M., León-Cabrera, S., Terrazas, L.I., van Loveren, H., Chirino, Y.I., 2016. Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food Chem. Toxicol.* 93, 20–31. doi:10.1016/j.fct.2016.04.014
- Van den Brule, S., Ambroise, J., Lecloux, H., Levard, C., Soulas, R., De Temmerman, P.-J., Palmari-Pallag, M., Marbaix, E., Lison, D., 2016. Dietary silver nanoparticles can disturb the gut microbiota in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 13. doi:10.1186/s12989-016-0149-1
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., Augenlicht, L., 2002. Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2. *Science* 295, 1726–1729. doi:10.1126/science.1069094
- Venema, K., van den Abbeele, P., 2013. Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 115–126. doi:10.1016/j.bpg.2013.03.002
- Walczak, A.P., Kramer, E., Hendriksen, P.J.M., Helsdingen, R., van der Zande, M., Rietjens, I.M.C.M., Bouwmeester, H., 2015. In vitro gastrointestinal digestion increases the translocation of polystyrene nanoparticles in an in vitro intestinal co-culture model. *Nanotoxicology* 1–9. doi:10.3109/17435390.2014.988664
- Waller, S., Tremelling, M., Bredin, F., Godfrey, L., Howson, J., Parkes, M., 2006. Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *Gut* 55, 809–814. doi:10.1136/gut.2005.084574
- Walter, E., Janich, S., Roessler, B.J., Hilfinger, J.M., Amidon, G.L., 1996. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: In vitro–in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *J. Pharm. Sci.* 85, 1070–1076. doi:10.1021/js960110x
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., Jia, G., Gao, Y., Li, B., Sun, J., Li, Y., Jiao, F., Zhao, Y., Chai, Z., 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.* 168, 176–185. doi:10.1016/j.toxlet.2006.12.001
- Wang, Y., Chen, Z., Ba, T., Pu, J., Chen, T., Song, Y., Gu, Y., Qian, Q., Xu, Y., Xiang, K., Wang, H., Jia, G., 2013. Susceptibility of Young and Adult Rats to the Oral Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Small* 9, 1742–1752. doi:10.1002/sml.201201185
- Warheit, D.B., Brown, S.C., Donner, E.M., 2015. Acute and subchronic oral toxicity studies in rats with nanoscale and pigment grade titanium dioxide particles. *Food Chem. Toxicol.* 84, 208–224. doi:10.1016/j.fct.2015.08.026
- Warheit, D.B., Webb, T.R., Reed, K.L., Frerichs, S., Sayes, C.M., 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230, 90–104. doi:10.1016/j.tox.2006.11.002

- Watson, A.J.M., Collins, P.D., 2011. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig. Dis. Basel Switz.* 29, 222–228. doi:10.1159/000323926
- Watson, J.D., Crick, F.H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738.
- Wei, D., Kanai, M., Huang, S., Xie, K., 2005. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis* 27, 23–31. doi:10.1093/carcin/bgi243
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., von Goetz, N., 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2242–2250. doi:10.1021/es204168d
- Wijeratne, S.S.K., Cuppett, S.L., Schlegel, V., 2005. Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress Damage and Antioxidant Enzyme Response in Caco-2 Human Colon Cells. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8768–8774. doi:10.1021/jf0512003
- Wikman-Larhed, A., Artursson, P., 1995. Co-cultures of human intestinal goblet (HT29-H) and absorptive (Caco-2) cells for studies of drug and peptide absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3, 171–183. doi:10.1016/0928-0987(95)00007-Z
- Williams, K., Milner, J., Boudreau, M.D., Gokulan, K., Cerniglia, C.E., Khare, S., 2015. Effects of subchronic exposure of silver nanoparticles on intestinal microbiota and gut-associated immune responses in the ileum of Sprague-Dawley rats. *Nanotoxicology* 9, 279–289. doi:10.3109/17435390.2014.921346
- Wright, N.A., Hoffmann, W., Otto, W.R., Rio, M.-C., Thim, L., 1997. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett.* 408, 121–123. doi:10.1016/S0014-5793(97)00424-9
- Wright, N.A., Poulson, R., Stamp, G., Van Noorden, S., Sarraf, C., Elia, G., Ahnen, D., Jeffery, R., Longcroft, J., Pike, C., 1993. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104, 12–20.
- Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Wilson, K.T., 2010. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 713–739. doi:10.1128/CMR.00011-10
- Xavier, R.J., Rioux, J.D., 2008. Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 631–643. doi:10.1038/nri2361
- Xu, C., 2005. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 115, 2656–2664. doi:10.1172/JCI26373
- Yada, R.Y., Buck, N., Canady, R., DeMerlis, C., Duncan, T., Janer, G., Juneja, L., Lin, M., McClements, D.J., Noonan, G., Oxley, J., Sabliov, C., Tsytsikova, L., Vázquez-Campos, S., Yourick, J., Zhong, Q., Thurmond, S., 2014. Engineered Nanoscale Food Ingredients: Evaluation of Current Knowledge on Material Characteristics Relevant to Uptake from the Gastrointestinal Tract. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 730–744. doi:10.1111/1541-4337.12076
- Yang, Y., Doudrick, K., Bi, X., Hristovski, K., Herckes, P., Westerhoff, P., Kaegi, R., 2014. Characterization of Food-Grade Titanium Dioxide: The Presence

- of Nanosized Particles. *Environ. Sci. Technol.* 48, 6391–6400. doi:10.1021/es500436x
- Yin, L., Li, Y., Ren, J., Kuwahara, H., Kufe, D., 2003. Human MUC1 Carcinoma Antigen Regulates Intracellular Oxidant Levels and the Apoptotic Response to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 278, 35458–35464. doi:10.1074/jbc.M301987200
- Yu, K.-N., Chang, S.-H., Park, S.J., Lim, J., Lee, J., Yoon, T.-J., Kim, J.-S., Cho, M.-H., 2015a. 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. doi:10.1371/journal.pone.0131208
- Yu, K.-N., Sung, J.H., Lee, S., Kim, J.-E., Kim, S., Cho, W.-Y., Lee, A.Y., Park, S.J., Lim, J., Park, C., Chae, C., Lee, J.K., Lee, J., Kim, J.-S., Cho, M.-H., 2015b. Inhalation of titanium dioxide induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and inflammation in mice. *Food Chem. Toxicol., Nanotoxicology and Nanomedicine* 85, 106–113. doi:10.1016/j.fct.2015.08.001
- Zhang, H., Banfield, J.F., 1998. Thermodynamic analysis of phase stability of nanocrystalline titania. *J. Mater. Chem.* 8, 2073–2076. doi:10.1039/A802619J
- Zhang, J., Zhou, P., Liu, J., Yu, J., 2014. New understanding of the difference of photocatalytic activity among anatase, rutile and brookite TiO<sub>2</sub>. *Phys Chem Chem Phys* 16, 20382–20386. doi:10.1039/C4CP02201G
- Zhang, K., Kaufman, R.J., 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455–462. doi:10.1038/nature07203
- Zhang, R., Piao, M.J., Kim, K.C., Kim, A.D., Choi, J.-Y., Choi, J., Hyun, J.W., 2012. Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in silver nanoparticles-induced apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 224–232. doi:10.1016/j.biocel.2011.10.019
- Zijno, A., De Angelis, I., De Berardis, B., Andreoli, C., Russo, M.T., Pietraforte, D., Scorza, G., Degan, P., Ponti, J., Rossi, F., Barone, F., 2015. Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Toxicol. In Vitro* 29, 1503–1512. doi:10.1016/j.tiv.2015.06.009
- Zimmer, U.-P.D.K.-P., Laffolie, J. de, Barone, M.V., Naim, H.Y., 2016. Endocytosis in enterocytes. *Wien. Med. Wochenschr.* 166, 205–210. doi:10.1007/s10354-016-0448-z

---

# ANNEXES

---

*Annexe 1 : Article Nanoscale*



Cite this: *Nanoscale*, 2015, 7, 7352

## Impact of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles on uptake carriers and efflux pumps in Caco-2 gut epithelial cells†

M. Dorier,<sup>a,b</sup> E. Brun,<sup>c</sup> G. Veronesi,<sup>d</sup> F. Barreau,<sup>e</sup> K. Pernet-Gallay,<sup>f,g</sup> C. Desvergne,<sup>h</sup> T. Rabilloud,<sup>i</sup> C. Carapito,<sup>j</sup> N. Herlin-Boime<sup>k</sup> and M. Carrière<sup>\*a,b</sup>

TiO<sub>2</sub> microparticles are widely used in food products, where they are added as a white food colouring agent. This food additive contains a significant amount of nanoscale particles; still the impact of TiO<sub>2</sub> nanoparticles (TiO<sub>2</sub>-NPs) on gut cells is poorly documented. Our study aimed at evaluating the impact of rutile and anatase TiO<sub>2</sub>-NPs on the main functions of enterocytes, *i.e.* nutrient absorption driven by solute-liquid carriers (SLC transporters) and protection against other xenobiotics driven by efflux pumps from the ATP-binding cassette (ABC) family. We show that acute exposure of Caco-2 cells to both anatase (12 nm) and rutile (20 nm) TiO<sub>2</sub>-NPs induce early upregulation of a battery of efflux pumps and nutrient transporters. In addition they cause overproduction of reactive oxygen species and misbalance redox repair systems, without inducing cell mortality or DNA damage. Taken together, these data suggest that TiO<sub>2</sub>-NPs may increase the functionality of gut epithelial cells, particularly their property to form a protective barrier against exogenous toxicants and to absorb nutrients.

Received 22nd January 2015,

Accepted 24th March 2015

DOI: 10.1039/c5nr00505a

www.rsc.org/nanoscale

### 1. Introduction

Titanium dioxide particles are among the most produced mineral particles in the world; they are now introduced in a wide range of commercial products including food and daily

hygiene products.<sup>1</sup> Their production was evaluated at 5000 tons per year in 2006–2010 and was estimated to increase to 10 000 tons per year in 2011–2014.<sup>2</sup> Estimations based on daily consumption of TiO<sub>2</sub>-containing food lead to the conclusion that US children may be exposed to 1–2 mg TiO<sub>2</sub> per kg bw per day and US adults may be exposed to 0.2–0.7 mg TiO<sub>2</sub> per kg bw per day.<sup>3</sup> Another estimation reports exposure to ~5 mg TiO<sub>2</sub> per person per day in the UK.<sup>4</sup> TiO<sub>2</sub> food additive is mainly composed of micro-particles with diameter >100 nm, still about 36% of the particles are less than 100 nm in diameter, *i.e.* are nanoparticles (TiO<sub>2</sub>-NPs).<sup>3</sup> The crystal phase of this food-grade TiO<sub>2</sub> is either pure anatase or mixed anatase and rutile.<sup>5</sup> As recently reviewed,<sup>6</sup> the literature reporting their impact on gut cells is scarce.

Bio-distribution, toxicokinetics and impact of TiO<sub>2</sub>-NPs administered *per os* to rodents depend on NP primary diameter, administration mode, as well as the age of animals. Adverse effects are observed in a variety of organs including the intestine, liver, kidneys, brain, immune cells and reproductive organs.<sup>7–9</sup> *In vitro*, TiO<sub>2</sub>-NP toxicity studies have, up to now, focused on the most classical toxicological endpoints, *i.e.* cytotoxicity, genotoxicity, oxidative and pro-inflammatory potentials of NPs. They show that the impact of TiO<sub>2</sub>-NPs depends on their physico-chemical characteristics, their agglomeration state and the modalities of exposure, particularly the presence or absence of serum in exposure medium. Indeed, it is well documented that the presence *vs.* absence of

<sup>a</sup>Univ. Grenoble Alpes, INAC, SCIB, F-38000 Grenoble, France.

Fax: +33 4 38 78 5090; Tel: +33 4 38 78 03 28; E-mail: marie.carriere@cea.fr

<sup>b</sup>CEA, INAC, SCIB, F-38054 Grenoble, France

<sup>c</sup>UMR3299 CEA-CNRS, NIMBE, Laboratoire Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM), CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France

<sup>d</sup>European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), ID21 beamline, B.P. 220, F-38043 Grenoble, France

<sup>e</sup>INSERM, UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse, Université de Toulouse, France

<sup>f</sup>INSERM, U836, Grenoble, F-38042, France

<sup>g</sup>Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, F-38042, France

<sup>h</sup>Univ. Grenoble Alpes, CEA, Nanosafety Platform, Medical Biology Laboratory (LBM), 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France

<sup>i</sup>ProMD team, UMR CNRS 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-Univ. Grenoble Alpes, F-38054 Grenoble, France

<sup>j</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio Organique (LSMBO), Université de Strasbourg, IPHC, CNRS UMR7178, Strasbourg, France

<sup>k</sup>URA2453 CEA-CNRS, NIMBE, LEDNA, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France

†Electronic supplementary information (ESI) available: Nanoparticle physico-chemical characterization: size distribution in exposure medium, as measured by DLS (Fig. S1), and X-ray diffraction patterns of A12 and R20 (Fig. S2); characterization of the protein corona on A12 and R20 (Table S1–S4 and experimental). See DOI: 10.1039/c5nr00505a

serum, as well as the batch of serum modulates the internalization efficiency and adverse outcome of NPs.<sup>10,11</sup> Mixed anatase/rutile TiO<sub>2</sub>-NPs, prepared in serum-free cell culture medium, induce cell mortality and DNA damage, but no oxidative stress in undifferentiated Caco-2 cells.<sup>12,13</sup> Conversely pure anatase TiO<sub>2</sub>-NPs, also prepared in serum-free medium, induce early production of reactive oxygen species (ROS) and cause the release of IL-8 chemokine, but no overt cytotoxicity.<sup>14</sup> In differentiated Caco-2 cells, acute exposure to mixed anatase/rutile TiO<sub>2</sub>-NPs in serum-free medium does not compromise the epithelium integrity and does not cause cell mortality.<sup>15</sup> In this context, we previously showed that pure anatase TiO<sub>2</sub>-NPs accumulate but do not translocate through an epithelium of differentiated Caco-2 cells, and do not cause overt cytotoxicity and epithelial structure disorganization.<sup>16</sup> It is also well documented that the crystalline phase governs the biological impact of TiO<sub>2</sub>-NPs, both *in vitro*<sup>13,19</sup> and *in vivo*.<sup>20</sup> Anatase TiO<sub>2</sub>-NPs are considered to be more toxic than rutile NPs, particularly in the presence of light, due to a higher photo-catalytic activity. NPs with mixed anatase and rutile phases induce more severe cytotoxic and genotoxic damage than pure anatase or pure rutile NPs. This is possibly due to a synergistic effect of anatase and rutile phases in contact with each other.<sup>13</sup>

To go one step beyond these classical toxicological endpoints, in the present study we focused on TiO<sub>2</sub>-NP impact on the main functions of enterocytes, *i.e.* nutrient absorption and protection against xenobiotic. The rationale for testing such impact is that these two functions rely on the activity of a series of cell membrane transporters. Since we previously showed that TiO<sub>2</sub>-NPs adsorb on gut cell surface and accumulate in gut cells,<sup>16</sup> we hypothesized that they may affect the function of transporters located on the cell membrane of enterocytes. Nutrient absorption is based on the activity of membrane transporters from the family of solute lipid carriers (SLC). The protective function relies on efflux pumps which are members of the family of ATP binding cassette (ABC) transporters, which contribute to the efflux of toxins from enterocytes and therefore function as gatekeepers against xenobiotic in the intestine.<sup>17</sup>

We thus examined the impact of TiO<sub>2</sub>-NPs on the expression of these cell membrane transporters on the Caco-2 cell line, which is considered as a good model of enterocytes, and has been used for long to study the transport and impact of pharmaceutical molecules through the gut.<sup>18</sup> In parallel, we evaluated TiO<sub>2</sub>-NP cyto- and genotoxic impact, as well as the oxidative status of Caco-2 cells exposed to these NPs. We compared the impact of fully characterized anatase and rutile TiO<sub>2</sub>-NPs with diameter 12 and 20 nm, termed A12 and R20 (A standing for anatase and R for rutile; 12 standing for 12 nm mean diameter and 20 for 20 nm mean diameter).

## 2. Results

In most experiments, cells were exposed to 50 μg mL<sup>-1</sup> of TiO<sub>2</sub>-NP, which is a high concentration that can be considered

as a worst case scenario. We chose to expose cells in serum-containing medium since NPs entering the gut would improbably have a pristine surface, but would rather be coated by a dense protein corona.

### 2.1 Nanoparticle physico-chemical characterization

Suspensions of A12 and R20 were dispersed by sonication in water and diluted in exposure medium, *i.e.* complete cell culture medium (DMEM + 10% FBS). Sonication in water efficiently dispersed A12 (see Fig. S1†) but not R20, even after long term high energy sonication. The Z-average of A12 was 132 nm while it was >1000 nm for R20 (Table 1 and Fig. S1†). Upon dilution in exposure medium, the Z-average of A12 shifted to 320 nm and PdI increased to 0.290, *i.e.* the suspension slightly agglomerated (Table 1 and Fig. S1†). R20 remained agglomerated.

The zeta potential of both NP suspensions in exposure medium was negative but close to 0, attesting for the instability of the suspensions (Table 1). A12 did not further agglomerate during the following 48 h,<sup>16</sup> certainly because FBS induced the formation of a tightly-packed protein layer that prevented further agglomeration, as described by others.<sup>21,22</sup> The proteins that adsorbed on the surface of A12 and R20 upon dilution in exposure medium are listed in Tables S1 and S2.† These coronas were quite similar. Still 13 proteins out of 42 were contained in the corona of A12 but not of R20 (Table S3†) and 7 proteins out of 35 were part of the corona of R20 but not of A12 (Table S4†). Though, the non-overlapping proteins are among the minor contributors of the coronas with low unique peptide counts (for all A12 and R20 non-overlapping proteins, the number of unique peptides is lower than 4).

Therefore physico-chemical parameters that significantly differed between suspensions of A12 and R20 were their crystalline phase, their agglomeration state and, to a smaller extent, the composition of their protein corona.

**Table 1** Physico-chemical characteristics of the TiO<sub>2</sub>-NPs<sup>a</sup>

Parameter	A12	R20
Crystalline phase	95% anatase, 5% rutile	90% rutile, 10% anatase
Mean diameter (TEM) (nm)	12 ± 3	22 ± 4
SSA (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	82 ± 3 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	73 ± 5 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>
Z-Average in water (nm)	132 ± 1	>1000
	(PdI = 0.188)	(PdI > 0.8)
ζ in water (mV)	-20.0 ± 0.6	-19.5 ± 0.9
PZC	6.4	5.6
Z-Average in expo. medium (nm)	320	>1000
	(PdI = 0.290)	(PdI > 0.8)
ζ in expo. medium (mV)	-10.8 ± 0.6	-11.7 ± 0.8

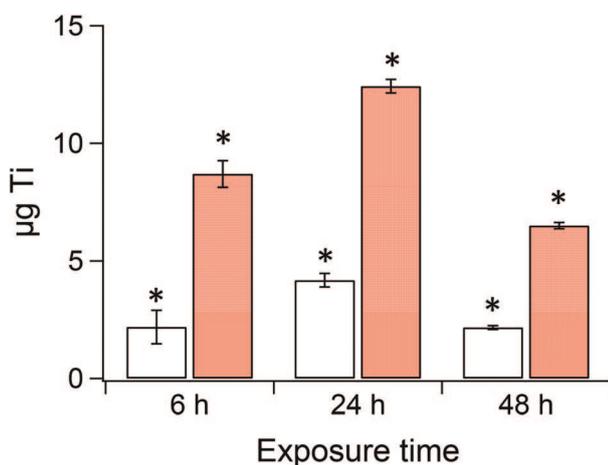
<sup>a</sup> Primary particle diameter (mean diameter) was measured on transmission electron microscopy (TEM) images. SSA: specific surface area. Z-Average: measurement of NP hydrodynamic diameter (in number), obtained by photon correlation spectroscopy (PCS). PdI: polydispersity index. ζ: zeta potential. PZC: point of zero charge. Expo. medium: exposure medium.

## 2.2 Nanoparticle cellular accumulation and distribution

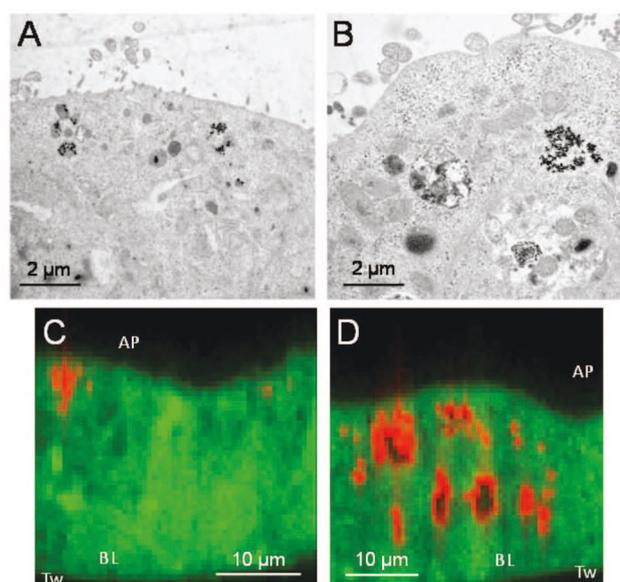
Ti content in cells exposed to A12 and R20, reflecting intracellular accumulation as well as cell membrane adsorption, was measured by ICP-MS after exposure of Caco-2 cells to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of these NPs. Ti content in cells exposed to R20 was 3 to 4 times as high as in cells exposed to A12 (Fig. 1). It increased between 6 h and 24 h of exposure; then it slightly decreased between 24 h and 48 h (Fig. 1). In the same exposure conditions, their intracellular distribution was observed by TEM (Fig. 2A and B) and micro-X-ray fluorescence ( $\mu\text{XRF}$ ) (Fig. 2C and D).<sup>16,23</sup> Electron-dense agglomerates were observed in cells exposed to A12 (Fig. 2A) and R20 (Fig. 2B). They located close to the apical pole, entrapped in large cytoplasmic compartments and were identified as being composed of Ti (Fig. 2C and D).

## 2.3 Cytotoxicity, genotoxicity, cell redox status

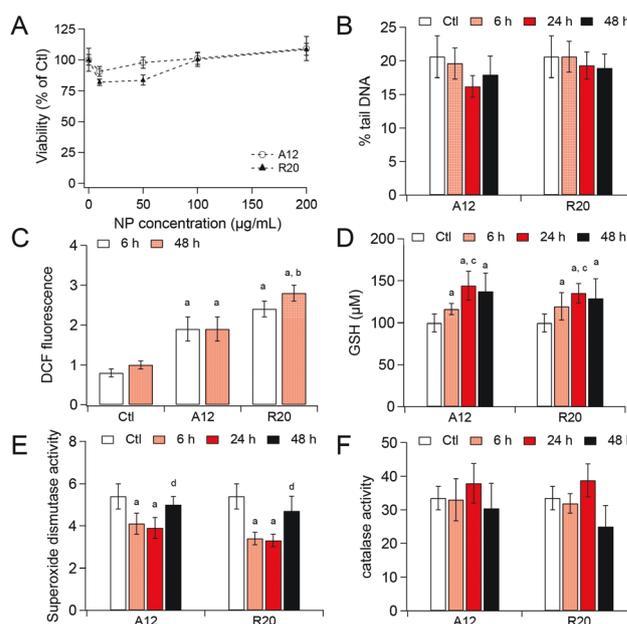
We already reported the absence of overt cytotoxicity, epithelial integrity alteration and *para*-cellular and *trans*-cellular permeability properties in differentiated Caco-2 cells exposed to A12.<sup>16</sup> In the present study, neither A12 nor R20 induced overt cell mortality of undifferentiated Caco-2 cells (Fig. 3A), or any DNA strand breaks or alkali-labile sites in the comet assay (Fig. 3B). In contrast, we monitored a significant production of ROS in cells exposed to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of either A12 or R20. This increased production of ROS was significant at 6 h of exposure and did not further increase at 48 h post-exposure (Fig. 3C). At 48 h post-exposure, ROS content was significantly higher in cells exposed to R20 than in cells exposed to A12 (Fig. 3C). A12 and R20 also significantly increased cellular glutathione content (Fig. 3D). Although the activity of superoxide dismu-



**Fig. 1**  $\text{TiO}_2$ -NP accumulation in Caco-2 cells. Intracellular content of Ti was measured by ICP-MS in Caco-2 cells exposed to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of A12 (white bars) or R20 (red bars) for 6, 24 or 48 h. Cells were then harvested, live cells were counted and Ti content was measured in 360 000 cells ( $\mu\text{g Ti}$ ). Presented data are expressed as mean of three independent replicates per condition  $\pm$  standard deviation; statistical significance of exposed cells vs. control cells, \* $p < 0.05$ , Mann-Whitney  $U$ -test.



**Fig. 2** TEM and  $\mu\text{XRF}$  images of  $\text{TiO}_2$ -NPs accumulated in Caco-2 cells. TEM observation of Caco-2 cells exposed to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of A12 (A) or R20 for 24 h (B). Micro-XRF imaging of Caco-2 cells exposed to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of A12 (C) or R20 (D) for 48 h. Phosphorous (P) et titanium (Ti) distributions are mapped in green and red, respectively. AP: apical pole; BL: basolateral pole; Tw: transwell membrane.



**Fig. 3** Cell viability was probed with the MTT assay (A) after a 24 h exposure at NP concentrations ranging from 0 to  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Genotoxicity of  $\text{TiO}_2$ -NPs ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) assessed *via* the alkaline comet assay (B). Reactive oxygen species (C) and reduced glutathione (GSH, D) contents, superoxide dismutase (E) and catalase (F) activity modulations, measured after exposure for 6 h, 24 h or 48 h to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of A12 and R20. Results are average of 3 independent experiments  $\pm$  standard deviation except for comet assay where they are median  $\pm$  standard error of the mean. \* $p < 0.05$ ; Mann-Whitney  $U$ -test; a: control cells vs. exposed cells; b: A12 vs. R20, 48 h; c: 6 h vs. 24 h; d: 24 h vs. 48 h.

tase was significantly reduced (Fig. 3E), we did not observe any modulation of catalase activity (Fig. 3F). Altogether, these data evidenced that exposure to NPs did not alter cell viability, but disturbed the redox balance of exposed cells.

#### 2.4 Impact of TiO<sub>2</sub>-NPs on nutrient uptake transporters and xenobiotic efflux pumps

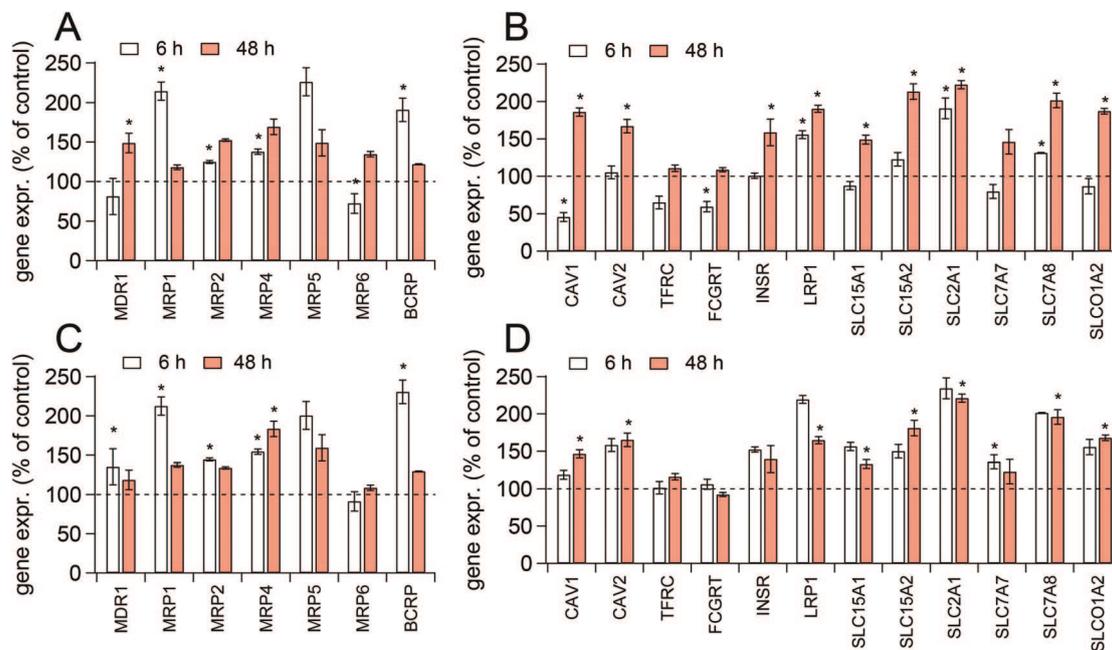
TiO<sub>2</sub>-NPs are accumulated in Caco-2 cells, but also adsorbed on cell membranes. This interaction may lead to impairment of membrane functions, which for enterocytes are nutrient uptake through the SLC transporter family, and protection

against drugs and xenobiotic through efflux pumps from the ABC transporter family. Differentiation is essential for membrane transporters to reach their final location, *i.e.* either the apical or the basolateral pole of the cell. For this experiment we thus used differentiated Caco-2 cells, *i.e.* cells grown 21 days post-confluence.

We monitored significant, although moderate, modulations of the expression of genes encoding these two families of transporters (see Table 2 for detail) in Caco-2 cells exposed for 6 h or 48 h to 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of A12 (Fig. 4A and B) and R20 (Fig. 4C and D). We generally observed early up-regulation of

**Table 2** Genes encoding key transport proteins that were analysed by RT-qPCR

Gene identification	Encoded protein name and function
CAV1, CAV2	Caveolin 1 and 2, caveolae proteins
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1, endocytic receptor
FCGRT	Uptake of IgG through intestinal epithelial cells
INSR	Insulin receptor
TFRC	Transferrin receptor
SLC2A1	Glucose transporter
SLC15A1, 15A2	Proton-coupled peptide transporters
SLC7A7, 7A8	Cationic amino-acid transporters
SLC01A2	Sodium-dependent transporter of organic ions
MDR1 = ABCB1	P-glycoprotein, drug and xenobiotic efflux, broad substrate specificity
MRP1 = ABCC1	Multidrug resistance protein 1, efflux of organic anions and glutathione-conjugated compounds
MRP2 = ABCC2	Multidrug resistance protein 2, efflux of organic anions
MRP4 = ABCC4	Multidrug resistance protein 4, efflux of organic anions, undetermined specific function
MRP5 = ABCC5	Multidrug resistance protein 5, efflux of cyclic nucleotides
MRP6 = ABCC6	Multidrug resistance protein 6, efflux of organic anions, glutathione-conjugated compounds
BCRP = ABCG2	Breast cancer resistance protein

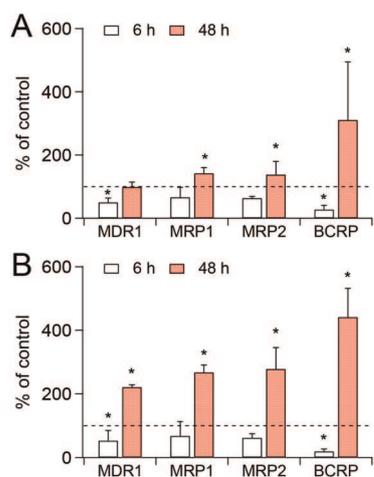


**Fig. 4** mRNA expression in Caco-2 cells exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs. mRNA expression of ABC efflux pumps and nutrient transporters, quantified by RT-qPCR after 6 h or 48 h of exposure to 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of A12 (A–B) and R20 (C–D). Results are expressed as fold change in NP-exposed cells as compared to unexposed cells. They represent mean of 3 replicates  $\pm$  standard deviation; control vs. exposed cells, \* $p < 0.05$ , Mann–Whitney *U*-test.

ABC transporter-encoding genes: MRP1, MRP2, MRP4 and BCRP were up-regulated in cells exposed for 6 h to A12 (Fig. 4A) and R20 (Fig. 4C). Moreover, at 6 h of exposure, MDR1 was upregulated by R20 only and MRP6 was down-regulated by A12 only. These modulations were transient since after 48 h of exposure the only significant changes in gene expression was up-regulation of MDR1 in cells exposed to A12 and up-regulation of MRP4 in cells exposed to R20.

In opposition to the early up-regulation of efflux pumps, we observed late modulation of the expression of genes encoding SLC transporters, which was also rather up-regulation (Fig. 4B and 4D). After 48 h of exposure, both A12 and R20 induced up-regulation of SLC2A1 (GLUT-1) and LRP1, encoding transporters involved in the hexose/lipid homeostasis processes. A12 and R20 also induced up-regulation of SLC7A8, SLC15A1 and SLC15A2 encoding proton-coupled PepT1 and PepT2 peptide transporters, respectively, involved in the amino acid and peptide absorption processes. Finally they both induced up-regulation of SLCO1A2, encoding the OATP1A2 transporter, implicated in the transport of a variety of organic ions including drugs and xenobiotic. Furthermore, A12 and R20 induced up-regulation of genes encoding two caveolins (CAV1 and CAV2). The insulin receptor, INRS, was upregulated in cells exposed for 48 h to A12 only. LRP1, SLC2A1 and SLC7A8 were also upregulated by A12 after 6 h of exposure, while CAV1 and FCGRT, encoding an IgG transporter, were down-regulated by A12 after 6 h of exposure. Finally, SLC7A7 was upregulated in cells exposed for 6 h to R20.

At the protein level, expressions of MDR1 and BCRP were significantly reduced in Caco-2 cells exposed 6 h to A12 and R20, and expression of MDR1, MRP1, MRP2 and BCRP were significantly increased after 48 h of exposure to both A12 (Fig. 5A) and R20 (Fig. 5B).



**Fig. 5** Protein expression in Caco-2 cells exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs. Protein expression of MDR1, MRP1, MRP2 and BCRP, quantified by western blot after 6 h or 48 h of exposure of Caco-2 cells to 50 μg mL<sup>-1</sup> of A12 (A) and R20 (B). Data represent mean of 3 replicates ± standard deviation; control vs. exposed cells, \**p* < 0.05, Mann–Whitney *U*-test.

### 3. Discussion

ABC transporters are considered as gatekeepers in the gut, as they reduce the cellular burden of xenobiotics.<sup>17</sup> Regulation of their expression has been extensively studied since it is one of the mechanisms leading to the multi-drug resistance phenotype in cancer cells. It occurs at both the transcriptional, post-transcriptional and post-translational levels. Our results show a global induction of MRP1, MRP2, MRP4 and BCRP genes in cells exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs. This induction is detected at the mRNA expression level after 6 h of exposure and at the protein level following 48 h of exposure. This can be interpreted as a feedback loop, where cells react to the lack of protein by inducing mRNA expression; consequently at 48 h, these ABC transporters are upregulated at the protein level while their mRNA expression has returned to its basal level. Coordinated regulation of these genes has already been demonstrated in the liver, in response to binding to their promoter region of nuclear receptors such as aryl hydrocarbon receptor, pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, peroxisome proliferator-activated receptor α and nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2).<sup>24,25</sup> Nrf2 is a transcription factor that is activated in response to oxidative stress. It regulates the expression of a battery of antioxidant genes;<sup>26</sup> it has also been shown to positively regulate the expression of MRP1, MRP2, MRP4, MRP6, BCRP, MDR1.<sup>24,25,27</sup> With respect to the misbalance of redox systems that we observe in this study, it is probable that Nrf2 is activated, which would explain the up-regulation of ABC transporters. This hypothesis is in adequacy with the results reported by others, from *in vivo* experiments.<sup>7</sup> The consequences of up-regulation of ABC transporters in cells exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs would be increased resistance to xenobiotic, but also to drugs such as chemotherapeutic agents, which is either beneficial or detrimental depending on the situation, *i.e.* normal life *vs.* therapeutic treatment.

Enterocytes express at their cell membrane a battery of transporters mediating the absorption of main dietary nutrients, *i.e.* sugars, amino acids, peptides, lipids, organic ions and a number of ions and solutes. In response to TiO<sub>2</sub>-NP exposure, we observe a global up-regulation of transporters involved in the absorption of most of these nutrients. This suggests a response to starvation caused by TiO<sub>2</sub>-NP exposure, and the necessity to increase cellular absorption of nutrients. For instance, increased expression of INSR would lead to increased fixation of insulin, and subsequent translocation of insulin-responsive vesicles (IRVs). The fusion of these vesicles with plasma membrane would increase GLUT-4 on the plasma membrane and finally enhance glucose absorption. We also report up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), which is a major component of IRVs.<sup>28</sup> This down-regulation in intestinal cells has been associated with decreased IRVs migration toward cell surface.<sup>29</sup> LRP1 up-regulation in TiO<sub>2</sub>-NP-exposed cells would thus be induced in response to the signal of IRVs migration for GLUT-4 presentation on cell surface, which would result from glucose starvation. In our results, up-regulation of GLUT-1 also suggests a

response to glucose starvation, GLUT-1 being a facilitated-diffusion glucose transporter that is essential for the maintenance of high rates of glucose influx demanded by glycolysis. The insulin-responsive glucose absorption pathway has been identified as regulated by caveolin-1, an integral transmembrane protein of caveolae which protects the insulin receptor against degradation by the proteasome.<sup>30</sup> In TiO<sub>2</sub>-NP exposed cells, CAV-1 mRNA expression is reduced; insulin-receptor would thus be less protected from degradation, which would be another argument supporting glucose starvation. Moreover CAV-1 is necessary for the migration of GLUT4 to cell surface, certainly in caveolae.<sup>30</sup> This possible response to starvation may be induced by sequestration of nutrients on the surface of TiO<sub>2</sub>-NPs, as already suggested for carbon-based NPs, particularly nanotubes.<sup>31</sup> Nanoparticle interaction with biomolecules is not limited to interaction with proteins, interaction with lipids and carbohydrates has also been demonstrated.<sup>32</sup> This interaction may deplete exposure medium from these nutrients, thus inducing cell starvation.

Recent studies show that TiO<sub>2</sub>-NPs exert some toxic effects on undifferentiated<sup>12,13</sup> or differentiated<sup>15</sup> Caco-2 cells when they are prepared in serum-free medium. In the present study we evidence neither cytotoxicity nor DNA damage in Caco-2 cells exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs. Discrepancies between these studies and our results can be explained by the surface coating of TiO<sub>2</sub>-NPs by the different protein coronas that form on NPs in presence and in absence of serum. As previously reported for SiO<sub>2</sub>- and polystyrene-NPs the impact and cell uptake of NPs prepared in serum-containing culture medium is lower than that of NPs prepared in medium that does not contain serum.<sup>11,33</sup> In absence of serum, NP adhesion on cell membranes and cellular uptake is higher and results in a different intracellular distribution: some NPs are observed "free" in cell cytosol, while in the presence of serum all the NPs are entrapped and sequestered in cytoplasmic vesicles that may avoid their interaction with active molecules in the cytosol.<sup>11,33</sup> Our results, added to the data that we previously reported in A549 cells<sup>34,35</sup> and the results from the literature, suggest that this might also be the case for TiO<sub>2</sub>-NPs.

Next, our results evidence that intracellular accumulation of R20 is higher than accumulation of A12. This can either be due to more efficient cell uptake of R20, as compared to A12, or to higher exposure of cells to R20, as compared to A12. Again, uptake efficiency has been described as being driven by the protein corona that coats NPs,<sup>11,33</sup> which defines their potency to interact with cell membranes and membrane transporters/receptors that may contribute to their internalization. It has also been shown to be governed by the crystalline structure of TiO<sub>2</sub>-NPs (for reviews see ref. 36, 37) and by their agglomeration state.<sup>38</sup> Nevertheless, as the protein coronas on the surface of A12 and R20 have very close compositions, this parameter cannot explain differential accumulation of these NPs. Moreover A12 and R20 are covered with proteins, their mineral surface is thus hidden behind this corona and it is unlikely that the crystalline structure affects NP uptake by cells since the cell membrane is thus not directly exposed to

anatase or a rutile mineral surface. Finally R20 are more agglomerated than A12 in exposure medium, this may trigger more efficient cell uptake since agglomeration state defines the route by which NPs are taken up in cells, some routes being more efficient and fast than others. Noteworthy, R20 being more agglomerated than A12, these NPs may more efficiently settle down on the cell layer, and consequently cell exposure to R20 may be higher than cell exposure to A12, as suggested in the ISDD model.<sup>39</sup> Consequently, we consider that agglomeration state rather than the biological identity (*i.e.* the protein corona) or crystalline phase explains the higher accumulation of R20 in Caco-2 cells that we observe. TiO<sub>2</sub>-NP accumulation increases between 6 h and 24 h of exposure, then decreases between 24 h and 48 h of exposure. This may be due to the release of NPs from cells, or more probably by NPs being split between daughter cells during cell division, as suggested by others.<sup>40,41</sup>

Finally, we show that both rutile and anatase TiO<sub>2</sub>-NPs cause major redox disorder in Caco-2 cells *i.e.* increased ROS and GSH contents, as well as inactivation of superoxide dismutase, but not catalase. GSH is a major molecular antioxidant in cells. Together with catalase, it is implicated in the elimination of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Correlation of increased intracellular ROS content and increased glutathione production suggests that cells respond to ROS by inducing antioxidant response, thereby precluding the settling of oxidative stress. This hypothesis is supported by the observation of absence of further increase of ROS content between 6 h and 48 h. However, inactivation of superoxide dismutase, which catalyses the dismutation of superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) to molecular oxygen (O<sub>2</sub>) or hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), may lead to accumulation of superoxide in NP-exposed cells. Superoxide is a byproduct of mitochondrial respiration; it is thus permanently produced in cells where it causes oxidative damage, such as mutagenesis and genomic instability, if not appropriately scavenged. Consequently our results prove that TiO<sub>2</sub>-NPs might indirectly cause oxidative damage in exposed cells, by avoiding the scavenging of deleterious O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

In summary, we show that TiO<sub>2</sub>-NPs, both anatase and rutile, induce up-regulation of a battery of SLC transporter and efflux pumps from the ABC transporter family in Caco-2 enterocytes, correlated to misbalance of cellular redox systems which may lead to accumulation of superoxide in exposed cells. However they do not cause overt mortality or damage to DNA.

## 4. Experimental

### 4.1 Physico-chemical characterization of nanoparticles

The used TiO<sub>2</sub>-NPs, termed A12 and R20, were produced in our laboratories.<sup>42</sup> Their specific surface area was measured by the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method, their crystalline phase by X-ray diffraction and their diameter was measured on transmission electron microscopy (TEM) images, as previously described.<sup>34,35</sup> NPs suspensions (10 mg mL<sup>-1</sup>)

were prepared in ultrapure sterile water by pulsed probe sonication (Vibra Cell 75043, 20 kHz, Bioblock scientific, 28% amplitude, 1 s on/1 s off, 4 °C). Cells were exposed to 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of NPs diluted in cell culture medium containing 10% FBS. Their zeta potential was measured using a Zetasizer 3000HS and their agglomeration state was followed by dynamic light scattering (Malvern ZetaSizer 3000HS, Worcestershire, UK).

## 4.2 Cell culture

Caco-2 cells (ATCC HTB-37, passages from 39 to 45) were cultured in Dulbecco Modified Medium supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1% (v/v) non-essential amino acids, 50 UI  $\text{mL}^{-1}$  penicillin and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin and maintained at 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ . For synchrotron-radiation micro X-ray fluorescence (SR- $\mu\text{XRF}$ ), TEM and qPCR experiments, cells were seeded at a density of 50 000 cells  $\text{cm}^{-2}$  on Transwell-Clear® inserts (polyester, 0.4  $\mu\text{m}$  pores, Costar), grown to confluence and exposed to NPs at 21 days post-confluence. In this condition, the Caco-2 epithelium was well differentiated.<sup>16</sup> For all other experiments, cells were exposed at sub-confluence in multi-well plates.

## 4.3 Imaging

**4.3.1 Transmission electron microscopy.** After 48 h of exposure to NPs of the apical pole of cells, transwell membranes on which cells were grown were rinsed with PBS, fixed in 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer and in 1% osmium tetroxide, dehydrated through a graded series of ethanol and embedded in Epon resin. Ultra-thin sections were cut and stained with 1% uranyl acetate. They were observed on a JEOL 1200EX TEM operating at 80 kV.

**4.3.2 Micro X-ray fluorescence imaging and X-ray absorption spectroscopy analysis.** Samples embedded for TEM observation were also analysed by SR- $\mu\text{XRF}$ , that detects trace element concentrations down to a few ppm, and enabled the mapping of their distribution on ID21 beam line (ESRF, Grenoble, France). Cross-sections (3  $\mu\text{m}$ ) were cut and sandwiched between 4  $\mu\text{m}$ -thick Ultralene® foils (SPEX SamplePrep). The X-ray beam was focussed to  $0.2 \times 0.8 \mu\text{m}^2$  ( $V \times H$ ) by means of a Tungsten Fresnel Zone Plate lens. Ti, K, Ca, P/Os and Cl maps were acquired at fixed energy (5.1 keV), with a  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  step. Data were processed using PyMCA.<sup>43</sup> Cells were identified by mapping P/Os distribution and  $\text{TiO}_2$ -NP by mapping Ti distribution.

## 4.4 Ti intracellular content quantification

Intracellular Ti content was quantified using ICP-MS. After exposure, cells were thoroughly washed 4 times with PBS to remove particles that would be loosely bound to cell membrane. They were then harvested and counted. 360 000 cells were suspended in 200  $\mu\text{L}$  of ultrapure water. These samples were dissolved by microwave-assisted acid decomposition, using conditions adapted from,<sup>44</sup> in 10 mL of 48% (vol/vol) ultrapure grade  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , for 30 min at 1100 W. Samples were then diluted in ultrapure grade 1% (vol/vol)  $\text{HNO}_3$  and

analysed on a Nexion 300X ICP-MS (Perkin Elmer) equipped with a concentric nebulizer and operated in standard mode. Calibration curves were obtained from a certified ionic Ti solution. The concentrations of  $^{47}\text{Ti}$ ,  $^{48}\text{Ti}$  and  $^{49}\text{Ti}$  were analysed; final interpretation of the results was carried out on  $^{47}\text{Ti}$  due to interference of S (from  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) on  $^{48}\text{Ti}$ .

## 4.5 NP impact assessment

**4.5.1 Cytotoxicity assay.** Cells exposed to 0–200  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{TiO}_2$ -NP for 24 h, in cell culture medium containing FBS. Cell metabolic activity, reflecting NPs cytotoxicity, was assessed by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT). After exposure, medium was replaced by 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  MTT; after 2 h at 37 °C formazan crystals were dissolved in DMSO. Plates were centrifuged at 200g for 5 min to allow NPs to settle down, supernatants were then transferred to a new plate and absorbance was measured at 550 nm. Interference of NPs with the MTT assay was monitored, as previously described.<sup>16</sup>

**4.5.2 Genotoxicity assays.** DNA strand breaks and alkali-labile sites were assessed *via* the alkaline comet assay.<sup>45</sup> After exposure to NPs, cells were harvested, centrifuged at 200g for 5 min and suspended in PBS. Cell suspension was mixed with 1% low melting point agarose and deposited onto agarose-coated slides. After solidification on ice, slides were immersed in cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100) for 1 h, at room temperature, in the darkness. After alkaline unwinding (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13), electrophoresis was processed at 0.7 V  $\text{cm}^{-1}$ , 300 mA for 24 min. Slides were neutralized with 0.4 M Tris pH 7.5 and stained with ethidium bromide before observation. Comet analysis was achieved with Comet IV software (Perceptive instruments, Suffolk, UK).

**4.5.3 Redox status assays.** Redox status was first evaluated through measurements of intracellular ROS production, using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester assay ( $\text{H}_2$ -DCF-DA, Invitrogen).<sup>46</sup> After exposure to NPs, cells were washed and incubated 30 min at 37 °C with 80  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , then harvested by scraping. Fluorescence intensity was measured with excitation at 480 nm and emission at 530 nm (Molecular Devices Gemini X fluorescence spectrophotometer) and normalized with respect to the protein concentration. Then reduced glutathione (GSH) content in cells, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were evaluated as described earlier.<sup>47</sup> After exposure, cells were rinsed with PBS, lysed and their volume was normalized with respect to protein content. GSH was measured *via* its oxidation by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Catalase activity was determined by following the disappearance of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 240 nm and comparing to a standard. SOD activity was measured through the inhibition by endogenous SOD of nicotinamide adenine dinucleotide oxidation by superoxide radical anions, produced *in situ* with 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. One unit of SOD activity is defined as the amount causing 50% inhibition of NADH oxidation in this condition.

**4.5.4 Real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR).** Gene expression profiles were analysed by RT-qPCR. RNA was isolated from cells using GenElute™ mammalian total RNA kit (Sigma Aldrich). The A260/A280 ratio ranged between 1.9 and 2, attesting the purity of extracted RNA. 1 µg of RNA was converted into cDNA with random primers (0.4 µM) using the RT2 first strand kit (Superarray Bioscience Corporation, Frederick, USA). Quantitative PCR was performed in a MX3005P multiplex quantitative PCR system (Stratagene) using MESA Blue qPCR Mastermix for SYBR Assay Low ROX. Relative expression values were calculated as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , where  $\Delta C_t$  is the difference between the cycle threshold ( $C_t$ ) values for target and reference, which is then divided by  $\Delta C_t$  of the calibrator (housekeeping) gene in order to obtain  $\Delta\Delta C_t$  values.<sup>48</sup> S18 and GAPDH were chosen as housekeeping genes for normalization and amplified in triplicate for each assay. Variability in the expression of these housekeeping genes among the various conditions was assessed by Bestkeeper, an Excel-based pairwise mRNA correlation tool.<sup>49</sup> RNA level modulation of target genes was computed using the Relative Expression Software Tool (REST)<sup>50</sup> based on  $C_t$  comparison. Data are expressed as percentages of the corresponding control  $\pm$  standard deviation.

**4.5.5 Quantification of protein expression.** Protein expression was quantified by western blot. We used 4 replicates of each exposure conditions and controls. Total proteins were extracted and 20 µg of protein was deposited on 3 independent stain-free 7.5% polyacrylamide gels (Biorad), which migrated at 200 V for 40 min. After transfer on nitrocellulose membranes, ABC transporter proteins were blotted using specific antibodies (MDR1: Abcam ab170904, 1/2500; MRP1: Abcam ab24102, 1/500; MRP2: Abcam ab3373, 1/200; BCRP: Abcam ab108312, 1/2500). For each of the 4 replicates, on each gel, the intensity of the specific band was normalized with respect to total protein content of the lane. Then for each replicate, the normalized intensities of exposed cells were divided by the normalized intensities of unexposed cells. Average and standard deviation of these normalized expressions are presented.

#### 4.6 Statistical analyses

Non-parametric one-way analysis of variance on ranks approach (Kruskal–Wallis) was performed using the Statistica 7.1 software (Statsoft, Chicago, USA). Paired comparisons were run using Mann–Whitney  $U$ -tests and results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## 5. Conclusions

Our results evidenced that agglomerated TiO<sub>2</sub>-NPs, both anatase and rutile, coated with serum proteins, induce no cytotoxicity or genotoxicity but misbalance the redox status of Caco-2 enterocytes. Independently of their crystalline phase, these NPs induce general up-regulation of genes encoding efflux pumps from the ABC transporter family as well as transporters involved in nutrient uptake. This suggests a cellular response to nutrient starvation and oxidative stress. Finally, all

these results may pave the way to future studies related to the impact of TiO<sub>2</sub>-NPs on the gastro-intestinal epithelium, among them perturbation of nutrient and drug absorption, as well as xenobiotic efflux. Note that these experiments have been conducted on *in vitro* cell models, exposed to high concentrations of TiO<sub>2</sub>-NPs. They should now be completed with experiments at lower doses, upon chronic exposure, to real-life food additive.

## Acknowledgements

This work was funded by the region Ile de France through the framework C'nano Ile de France (NanoDIG project), by INERIS in the frame of the post-Grenelle program (NANOTRANS project) by ANSES (NanoGut project) and ADEME and by the CEA Toxicology program (INAGINATOX project). 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 thank the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities at ID21. We thank D. Jaillard (CCME, Orsay, France) and J. Delaroche (GIN, Grenoble, France) for helping in ultramicrotomy, S. Motellier and K. Lhaute for the optimization of sample preparation for ICP-MS and A. Mabondzo (CEA, Saclay, France) for helping in RT-qPCR experiments.

## Notes and references

- Q. Chaudhry, M. Scotter, J. Blackburn, B. Ross, A. Boxall, L. Castle, R. Aitken and R. Watkins, *Food Addit. Contam., Part A*, 2008, **25**, 241.
- US-EPA, National Center for Environmental Assessment-RTP division, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC., November 2010, p. 222.
- A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski and N. von Goetz, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 2242.
- J. J. Powell, N. Faria, E. Thomas-McKay and L. C. Pele, *J. Autoimmun.*, 2010, **34**, 21.
- Y. Yang, K. Doudrick, X. Bi, K. Hristovski, P. Herckes, P. Westerhoff and R. Kaegi, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 6391.
- I. L. Bergin and F. A. Witzmann, *Int. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.*, 2013, **3**, 054515.
- S. Gui, B. Li, X. Zhao, L. Sheng, J. Hong, X. Yu, X. Sang, Q. Sun, Y. Ze, L. Wang and F. Hong, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 8959.
- S. Gui, Z. Zhang, L. Zheng, Y. Cui, X. Liu, N. Li, X. Sang, Q. Sun, G. Gao, Z. Cheng, J. Cheng, L. Wang, M. Tang and F. Hong, *J. Hazard. Mater.*, 2011, **195**, 365.
- X. Zhao, Y. Ze, G. Gao, X. Sang, B. Li, S. Gui, L. Sheng, Q. Sun, J. Cheng, Z. Cheng, R. Hu, L. Wang and F. Hong, *PLoS One*, 2013, **8**, 2.

- 10 A. Lesniak, A. Campbell, M. P. Monopoli, I. Lynch, A. Salvati and K. A. Dawson, *Biomaterials*, 2010, **31**, 9511.
- 11 A. Lesniak, F. Fenaroli, M. P. Monopoli, C. Aberg, K. A. Dawson and A. Salvati, *ACS Nano*, 2012, **6**, 5845.
- 12 K. Gerloff, C. Albrecht, A. W. Boots, I. Forster and R. P. Schins, *Nanotoxicology*, 2009, **3**, 355.
- 13 K. Gerloff, I. Fenoglio, E. Carella, J. Kolling, C. Albrecht, A. W. Boots, I. Forster and R. P. Schins, *Chem. Res. Toxicol.*, 2012, **25**, 646.
- 14 I. De Angelis, F. Barone, A. Zijno, L. Bizzarri, M. T. Russo, R. Pozzi, F. Franchini, G. Giudetti, C. Uboldi, J. Ponti, F. Rossi and B. De Berardis, *Nanotoxicology*, 2013, **1**, early online.
- 15 B. A. Koeneman, Y. Zhang, P. Westerhoff, Y. Chen, J. C. Crittenden and D. G. Capco, *Cell Biol. Toxicol.*, 2009, **26**, 225.
- 16 E. Brun, F. Barreau, G. Veronesi, B. Fayard, S. Sorieul, C. Chaneac, C. Carapito, T. Rabilloud, A. Mabondzo, N. Herlin-Boime and M. Carriere, *Part. Fibre Toxicol.*, 2014, **11**, 1743.
- 17 E. M. Leslie, R. G. Deeley and S. P. Cole, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, **204**, 216.
- 18 X. Alvarez-Hernandez, G. M. Nichols and J. Glass, *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, **18**, 205.
- 19 J. R. Gurr, A. S. Wang, C. H. Chen and K. Y. Jan, *Toxicology*, 2005, **213**, 66.
- 20 V. H. Grassian, P. T. O'Shaughnessy, A. Adamcakova-Dodd, J. M. Pettibone and P. S. Thorne, *Environ. Health Perspect.*, 2007, **115**, 397.
- 21 Z. J. Deng, M. Liang, I. Toth, M. J. Monteiro and R. F. Minchin, *ACS Nano*, 2012, **6**, 8962.
- 22 M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggard, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia and K. Dawson, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7503.
- 23 G. Veronesi, E. Brun, B. Fayard, M. Cotte and M. Carriere, *Appl. Phys. Lett.*, 2012, 100.
- 24 J. M. Maher, X. Cheng, A. L. Slitt, M. Z. Dieter and C. D. Klaassen, *Drug Metab. Dispos.*, 2005, **33**, 956.
- 25 J. M. Maher, M. Z. Dieter, L. M. Aleksunes, A. L. Slitt, G. Guo, Y. Tanaka, G. L. Scheffer, J. Y. Chan, J. E. Manautou, Y. Chen, T. P. Dalton, M. Yamamoto and C. D. Klaassen, *Hepatology*, 2007, **46**, 1597.
- 26 P. Shelton and A. K. Jaiswal, *FASEB J.*, 2013, **27**, 414.
- 27 L. Ji, H. Li, P. Gao, G. Shang, D. D. Zhang, N. Zhang and T. Jiang, *PLoS One*, 2013, **8**, 2013.
- 28 K. V. Kandror and P. F. Pilch, *Traffic*, 2011, **12**, 665.
- 29 M. P. Jedrychowski, C. A. Gartner, S. P. Gygi, L. Zhou, J. Herz, K. V. Kandror and P. F. Pilch, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 104.
- 30 A. W. Cohen, T. P. Combs, P. E. Scherer and M. P. Lisanti, *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.*, 2003, **285**, E1151.
- 31 A. Casey, E. Herzog, F. M. Lyng, H. J. Byrne, G. Chambers and M. Davoren, *Toxicol. Lett.*, 2008, **179**, 78.
- 32 M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.*, 2012, **7**, 779.
- 33 A. Lesniak, A. Salvati, M. J. Santos-Martinez, M. W. Radomski, K. A. Dawson and C. Aberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 1438.
- 34 M. L. Jugan, S. Barillet, A. Simon-Deckers, N. Herlin-Boime, S. Sauvaigo, T. Douki and M. Carriere, *Nanotoxicology*, 2012, **6**, 501.
- 35 A. Simon-Deckers, B. Gouget, M. Mayne-L'hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud and M. Carriere, *Toxicology*, 2008, **253**, 137.
- 36 Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone and M. Dusinska, *Nanotoxicology*, 2013, **2013**, 20.
- 37 H. Shi, R. Magaye, V. Castranova and J. Zhao, *Part. Fibre Toxicol.*, 2013, **10**, 1743.
- 38 Z. Magdolenova, D. Bilanicova, G. Pojana, L. M. Fjellsbo, A. Hudecova, K. Hasplova, A. Marcomini and M. Dusinska, *J. Environ. Monit.*, 2012, **14**, 455.
- 39 P. M. Hinderliter, K. R. Minard, G. Orr, W. B. Chrisler, B. D. Thrall, J. G. Pounds and J. G. Teeguarden, *Part. Fibre Toxicol.*, 2010, **7**, 36.
- 40 C. Aberg, J. A. Kim, A. Salvati and K. A. Dawson, *EPL*, 2013, 101.
- 41 J. A. Kim, C. Aberg, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.*, 2011, **7**, 62.
- 42 B. Pignon, H. Maskrot, Y. Leconte, S. Coste, C. Reynaud, N. Herlin-Boime, M. Gervais, V. Guyot Ferreol, T. Pouget and J. F. Tranchant, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, **6**, 883.
- 43 V. A. Sole, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter and J. Susini, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2007, **62**, 63.
- 44 F. E. Smith and E. A. Arsenault, *Talanta*, 1996, **43**, 1207.
- 45 N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider, *Exp. Cell Res.*, 1988, **175**, 184.
- 46 Y. Oyama, A. Hayashi, T. Ueha and K. Maekawa, *Brain Res.*, 1994, **635**, 113.
- 47 S. Barillet, M.-L. Jugan, M. Laye, Y. Leconte, N. Herlin-Boime, C. Reynaud and M. Carrière, *Toxicol. Lett.*, 2010, **198**, 324.
- 48 K. J. Livak and T. D. Schmittgen, *Methods*, 2001, **25**, 402.
- 49 M. W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet and T. P. Neuvians, *Biotechnol. Lett.*, 2004, **26**, 509.
- 50 M. W. Pfaffl, G. W. Horgan and L. Dempfle, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, e36.

*Annexe 2 : Image parue dans le journal Le Monde*

Des nanoparticules dans nos assiettes

LE MONDE | 15.06.2016 à 06h38 • Mis à jour le 15.06.2016 à 15h20 | Par Pierre Le Hir



Source : Nanoparticules, COLCANOPA

### *Annexe 3 : communications scientifiques*

- présentation orale lors du colloque nano-agro à l'ANSES (Maisons-Alfort, France) - 2016
- présentation orale pour le programme toxicologie du CEA, (Pertuis, France) - 2016
- présentation orale pour le Labex SERENADE, (Carry-le Rouet, France) - 2015
  
- poster : journée du programme toxicologie du CEA (Saclay, France) - 2016
- poster : conférence internationale Nanotoxicology, (Boston, USA) - 2016
- poster : conférence internationale Nanosafe 2014, (Grenoble, France) - 2014
- poster : nouveaux doctorants ADEME, (Angers, France) – 2014

## Résumé

Le colorant alimentaire E171 est composé de particules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) dont 10 à 43 % présentent un diamètre inférieur à 100 nm, i.e. sont des nanoparticules (NPs). Néanmoins, du point de vue de la définition européenne, ce n'est pas un nanomatériau. Les études *in vivo* et *in vitro* publiées à ce jour démontrent que les NPs de TiO<sub>2</sub> sont peu toxiques mais l'impact du E171 sur la santé humaine après ingestion n'est pas clairement documenté. L'objectif ici, est d'étudier sa toxicité ainsi que celle de deux NPs de TiO<sub>2</sub>, A12 et P25, *in vitro*, sur des modèles cellulaires intestinaux. Le modèle d'épithélium composé d'entérocytes i.e. Caco-2, et le modèle d'épithélium sécrétant une couche de mucus, i.e. Caco-2/HT-29MTX, sont exposés de façon aiguë (6 h, 24 h et 48 h) ou chronique (21 jours) aux particules de TiO<sub>2</sub>. Nos résultats montrent que le E171 et les NPs de TiO<sub>2</sub> sont modérément toxiques. Ils n'engendrent pas de mortalité cellulaire ni de cassures à L'ADN. Néanmoins, ils provoquent une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires et modulent certains marqueurs impliqués dans le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique et l'inflammation. Ils impactent également la sécrétion et la composition de la couche de mucus, l'expression des transporteurs ABC, qui sont des paramètres impliqués dans la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, le rendant possiblement plus vulnérable aux agressions extérieures.

## Abstract

E171 food additive is made up of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) particles and contains up to 43 % of nanoparticles (NPs). Still, it is not a nanomaterial as described in the European definition. E171 is present in a wide range of food products while little is known about its toxicological impact to human health. The toxicity of ingested TiO<sub>2</sub>, either nano- or micro-sized, is increasingly documented, but E171 itself is rarely used in these studies. Here, we aimed at improving knowledge on the toxicity of E171. To this purpose, its impact and the impact of two TiO<sub>2</sub>-NPs, A12 and P25 were evaluated on *in vitro* cell models representative of the human intestinal epithelium, i.e. a model of differentiated Caco-2 enterocytes and a model of mucus-secreting epithelium obtained by coculture of Caco-2 and HT29-MTX. Cell models were either acutely exposed for 6 h, 24 h and 48 h or chronically exposed for 21 days to TiO<sub>2</sub> particles. Our results show that E171 and TiO<sub>2</sub>-NPs induced no overt cell mortality but significant oxidative stress, and that they oxidatively damage DNA. They modulate the expression of genes involved in oxidative stress and endoplasmic reticulum stress regulation. They also modulate the expression of genes, as well as the content of proteins from mucus, ABC transporters and inflammatory markers, which are the main players of the intestinal barrier function and presumably increase epithelium sensitivity to xenobiotics.